



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN CIENCIA BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Producción de embriones *in vitro* de *Bos taurus* a partir de ovocitos identificados con Azul de Cresil Brillante de folículos de diferente tamaño.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

M. en B. E. M.V.Z. José Luis Rodríguez Suastegui

Comité Tutorial:

Dr. Filiberto Fernández Reyes (Director)

Dr. José Miguel Betancourt Rule (Codirector)

Dr. Eduardo Casas Hernández (Asesor)

CIUDAD DE MÉXICO, JULIO 2020



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Doctorado.CBS.110.20

Ciudad de México a 19 de febrero de 2020.

José Luis Rodríguez Suástegui

Presente

En respuesta a su solicitud, le comunico que la Comisión Académica del Doctorado nombró como sinodales de su **Pre-examen Doctoral** a los Doctores:

Función	Nombre
Presidente	Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez
Secretario	Dr. Daniel Mota Rojas
Revisor	Dr. Salvador Romo García
Revisor	Dr. José Ernesto Hernández Pichardo
Vocal	Dr. Eduardo Casas Hernández

Se le solicita, de la manera más atenta, ponerse de acuerdo con el Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez para fijar la fecha y hora del Pre-examen Doctoral. Una vez establecida la fecha, favor de comunicarla a la coordinación para realizar los trámites correspondientes.

Sin más por el momento, aprovecho para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
Casa abierta al tiempo

Por la Comisión Académica


Dr. Rafael Bojalil Parra



UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe, Cuajimalpa de
Morelos, C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6530

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIDAD IZTAPALAPA
Av. San Rafael Atlixco N0 186,
Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P.
09340, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461
UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón, C.P. 52005
Lerma de Villada, Méx.
72 8282 7002 ext. 2002
correo-e: doctocb@correo.xoc.uam.mx

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1000,
Col. Villa Quietud, Coyoacán, C.P.
04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504 y 3185

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de “Manejo de la Reproducción” del Departamento de Producción Agrícola y Animal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, bajo la dirección del Dr. Filiberto Fernández Reyes del Departamento de Producción Agrícola y Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco y del Dr. José Miguel Betancourt Rule del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo del Dr. Eduardo Casas Hernández.

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 224661, que comprendió del periodo de 1 de septiembre de 2013 al 31 de agosto de 2016. El doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del Conacyt y, además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

Los miembros del Jurado designado por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, aprobaron la Tesis:

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO* DE *BOS TAURUS* A PARTIR DE OVOCITOS
IDENTIFICADOS CON AZUL DE CRESIL BRILLANTE DE FOLÍCULOS DE DIFERENTES
TAMAÑOS

Que presentó el

M. en B.E. José Luis Rodríguez Suastegui

El día 15 de julio de 2020.

Presidente: Dr. Filiberto Fernández Reyes

Secretario: Dr. José Miguel Betancourt Rule

Vocal: Dr. Eduardo Casas Hernández

Vocal: José Ernesto Hernández Pichardo

Vocal: Dr. Salvador Romo García

COMITÉ TUTORAL

Co-director UAM-X:

Dr. Filiberto Fernández Reyes

Departamento de Producción Agrícola y

Animal

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

Co-director UAM-I:

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Asesor:

Dr. Eduardo Casas Hernández

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

SINODALES

Dr. José Ernesto Hernández

Pichardo

Departamento de Producción Agrícola y

Animal.

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco.

Dr. Salvador Romo García

Departamento de Reproducción

Facultad de Estudios Superiores

Cuautitlán.

Universidad Nacional Autónoma de

México.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue realizada por el apoyo del Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud perteneciente a la Universidad Autónoma Metropolitana y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

A mi Familia, esposa e hijo por su apoyo durante el tiempo que me llevo concluir el presente Doctorado.

Al Dr. Filiberto Fernández por el apoyo durante la investigación y sus recomendaciones.

Al Dr. José Miguel Betancourt por su invaluable contribución durante la investigación, redacción del artículo y presentaciones ante la Comisión del Doctorado, así como sus enseñanzas y estímulos para concluir el Doctorado.

Al Dr. Eduardo Casas por sus aportaciones, enseñanzas, dedicación y consejos durante la investigación, redacción del artículo y presentaciones ante la Comisión del Doctorado.

Al Dr. Salvador Romo García por la revisión de la presente tesis y sus contribuciones. Además, agradecemos su participación durante el Pre examen y Disertación Pública.

A la Dra. Fahiel Casillas por su contribución en la redacción del Artículo científico.

A la Comisión del Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud por sus diversas recomendaciones.

A mi amigo Dr. Ernesto Hernández Pichardo por sus innumerables contribuciones y recomendaciones durante la investigación, escritura de la tesis y durante las presentaciones.

ÍNDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN	1
2 MARCO TEORICO	4
2.1 Ciclo estral y foliculogénesis en bovino	4
2.2 Maduración del ovocito	8
2.2.1 Maduración nuclear	8
2.2.2 Maduración citoplasmática	10
2.2.3 Importancia de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en la maduración citoplasmática	11
2.2.4 Importancia de los lípidos en la maduración citoplasmática	12
2.3 Determinación de la calidad del ovocito de bovino	14
2.3.1 Especie y Raza	16
2.3.2 Edad	19
2.3.3 Estacionalidad y condiciones ambientales	19
2.3.4 Estado nutricional	20
2.3.5 Evaluación del espesor del cúmulo y homogeneidad del citoplasma	20
2.3.6 Tamaño folicular	22
2.3.7 Diámetro del ovocito	23
2.3.8 Determinación de la viabilidad de ovocitos	25
2.3.9 Tinción del azul de cresil brillante (BCB)	25
2.3.9.1 Tinción de BCB en bovino	28
2.3.9.2 Relación entre BCB y el diámetro del ovocito	32
2.3.10 Estado de la meiosis	33
2.4 Técnicas de obtención de ovocitos de bovino	34
2.5 Producción <i>in vitro</i> de embriones de bovino	35
2.5.1 Maduración <i>in vitro</i>	36
2.5.2 Fertilización <i>in vitro</i>	38
2.5.3 Desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	40
3 JUSTIFICACIÓN	43
3.1 Planteamiento del problema	43
3.2 Preguntas de investigación	44
4 HIPÓTESIS GENERAL	44
4.1 Hipótesis específicas	45
5 OBJETIVO GENERAL	45
5.1 Objetivos específicos	45
6 MATERIAL Y MÉTODOS	45
6.1 Obtención de los ovocitos de Holstein	46
6.2 Tinción BCB	46
6.3 Diámetro de los ovocitos	47

6.4	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos BCB+, BCB- y control	47
6.5	Capacitación espermática	48
6.6	Fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos BCB+, BCB- y control	48
6.7	Desarrollo embrionario <i>in vitro</i> BCB+, BCB- y control	48
6.8	Evaluación de la viabilidad y estado de la meiosis	49
6.9	Análisis estadístico	50
6.10	Diseño experimental	50
	7 RESULTADOS	51
7.1	Tinción BCB	51
7.2	Diámetros de los ovocitos de Holstein identificados por la tinción BCB	52
7.3	Viabilidad antes de la MIV y después de la FIV de ovocitos de Holstein Identificados con la tinción BCB	53
7.4	Estado de la meiosis antes de la MIV y después de la FIV de ovocitos de Holstein identificados con la tinción BCB	53
7.5	Desarrollo embrionario y blastocisto de ovocitos de Holstein identificados con la tinción BCB	54
	8 DISCUSIÓN	56
8.1	Tinción BCB	57
8.2	Diámetros de los ovocitos de Holstein identificados por la tinción BCB	58
8.3	Viabilidad antes de la MIV y después de la FIV de ovocitos de Holstein Identificados con BCB	59
8.4	Estado de la meiosis antes de la MIV y después de la FIV de ovocitos de Holstein identificados con BCB	60
8.5	Desarrollo embrionario y producción de blastocisto de ovocitos identificados con BCB	62
	9 CONCLUSIONES	67
	10 IMPLICACIONES	69
	11 PERSPECTIVAS	69
	12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	13 ANEXOS	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Porcentaje de blastocistos obtenidos de ovocitos identificados con la tinción BCB en diferentes especies _____	<u>27</u>
Tabla II. Porcentaje de identificación de ovocitos de bovino con la tinción BCB en relación al método de obtención del ovocito _____	<u>29</u>
Tabla III. Porcentaje de división embrionaria y de blastocistos de ovocitos de bovino identificados por la tinción de BCB en relación al método de obtención del ovocito _____	<u>30</u>
Tabla IV. Diámetros de ovocitos identificados con BCB en diferentes especies _____	<u>33</u>
Tabla V. Ovocitos de Holstein identificados por la tinción BCB en dos tamaños de folículos _____	<u>52</u>
Tabla VI. Diámetro de ovocitos BCB+ y BCB- de dos tamaños de folículos de Holstein _____	<u>52</u>
Tabla VII. Viabilidad antes de la MIV y después de la FIV de ovocitos BCB+ y BCB- de dos tamaños de folículos de Holstein _____	<u>53</u>
Tabla VIII. Estado de la meiosis antes MIV y después FIV de ovocitos viables de Holstein identificados con BCB de dos tamaños de folículos _____	<u>55</u>
Tabla IX. División embrionaria y desarrollo de blastocistos de ovocitos identificados con BCB en dos tamaños de folículos _____	<u>56</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo folicular en diferentes especies _____	<u>7</u>
Figura 2. Vía de señalización de la LH a través de las células foliculares _____	<u>9</u>
Figura 3. Ovocitos BCB+ y BCB- _____	<u>46</u>
Figura 4. Programa ImageJ para determinar el diámetro del ovocito _____	<u>47</u>
Figura 5. Desarrollo embrionario de bovino _____	<u>49</u>
Figura 6. Tinción de MTT _____	<u>49</u>
Figura 7. Estado de la Meiosis _____	<u>50</u>

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BCB	Azul de cresil brillante
BMPs	Proteína morfológica del hueso
BSA	Albumina sérica bovina
COCs	Complejo ovocito cumulus
CO ₂	Bióxido de carbono
DEIV	Desarrollo embrionario <i>in vitro</i>
DPBSm	Solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco modificada
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
F	Fertilizado
FG	Folículo grande
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
FP	Folículo pequeño
FSH	Hormona folículo estimulante
G6PDH	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
h	Horas
IETS	Sociedad internacional de tecnología de embriones
IGF-I	Factor de crecimiento insulínico I
LH	Hormona luteinizante
M	Molar
MI	Metafase I
MII	Metafase II
min	Minutos

MOET	Ovulación múltiple y transferencia de embriones
MPF	Factor promotor de la maduración
MTT	Azul de tiazolil
NCSS	Software estadístico number cruncher
ng	Nanogramos
NADPH	Dinucleótido de Nicotinamida adenina difosfato
OPU	Aspiración de folículos por vía transvaginal guiada por ultrasonografía
PIVE	Producción <i>in vitro</i> de embriones
SCNT	Transferencia nuclear de células somáticas
SFB	Suero Fetal Bovino
SOF	Fluido Oviductal Sintético
TALP	Medio Tyrode con Piruvato, Lactato y Albumina
TBMm	Medio amortiguado con tris modificado
μg	Microgramos
μm	Micrómetros
μM	Micromolar
VG	Vesícula germinal

RESUMEN

La calidad del ovocito es importante para el éxito de la producción de embriones *in vitro*. Las características morfológicas como tamaño folicular, diámetro del ovocito, apariencia del citoplasma y la integridad de la zona pelúcida pueden determinar la capacidad de desarrollo del ovocito. Además, las evaluaciones de viabilidad, estado de la meiosis y metabólico, pueden ser complementarias para determinar la calidad de los ovocitos. La especie de bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*) es otro parámetro que determina la eficiencia de la producción de embriones *in vitro*. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue elucidar si los ovocitos de Holstein Friesian (*Bos taurus*) de diferentes tamaños, identificados por la tinción de azul de cresil brillante (BCB) muestran mejor desarrollo embrionario *in vitro*. Los ovocitos de folículos pequeños (FP: 2.0-4.9 mm) y grandes (FG: 5.0-10.0 mm) fueron clasificados por su coloración del citoplasma: azul (BCB+) y sin coloración (BCB-). Los parámetros analizados en los ovocitos fueron el diámetro, viabilidad antes de la maduración y después de la fertilización, evaluación del estado de la meiosis, desarrollo embrionario y formación de blastocisto. Los resultados variaron de acuerdo a la clasificación de los ovocitos; los ovocitos BCB+ de FG mostraron mayor porcentaje comparados con los BCB+ de FP ($P < 0.05$). Los diámetros de los ovocitos fueron similares en los BCB+ y BCB- de ambos tamaños de folículos ($P > 0.05$). La viabilidad fue similar en los grupos BCB+, BCB- y control de ambos tamaños de folículos, tanto antes de la maduración como después de la fertilización ($P > 0.05$). Los porcentajes de maduración aumentaron en BCB+ y BCB- de FP comparados con el control ($P < 0.05$) y fueron similares en todos los grupos de FG ($P > 0.05$). Los porcentajes de fertilización fueron mejores en BCB+ que BCB- de FP ($P < 0.05$); contrariamente a este resultado, los BCB- mostraron mayor proporción de fertilización que los BCB+ de FG ($P < 0.05$). El desarrollo embrionario aumentó en los BCB+ en comparación con los BCB- de FP ($P < 0.05$) y fueron similares en todos los grupos de FG ($P > 0.05$). La producción de blastocistos fue mejor en BCB+ de FP ($P < 0.05$) y en todos los grupos de FG fue similar ($P > 0.05$). Se concluye que la tinción de BCB permite seleccionar a los ovocitos de FP que son competentes para desarrollar el estado de blastocisto en ganado Holstein.

Palabras clave: azul de cresil brillante, viabilidad del ovocito, diámetro del ovocito, estado de la meiosis, producción de embriones *in vitro*, *Bos taurus*.

ABSTRACT

Oocyte quality is important for *in vitro* embryo production success. Morphological features such as follicular size, oocyte diameter, cytoplasm appearance, and zona pellucida integrity determine oocyte's developmental competence. Also, evaluations at the viability, meiotic stage and metabolic state, may be complementary to oocyte quality determination. Bovine specie (*Bos taurus* y *Bos indicus*) is other parameter *in vitro* embryo production efficiency. Therefore, the aim of this study was to elucidate if Holstein Friesian (*Bos taurus*) oocytes from follicles of different sizes, identified by the brilliant cresyl blue staining (BCB), show improved *in vitro* embryo development. Oocytes from small (SF: 2.0-4.9 mm) and large (LF: 5.0-10.0 mm) follicles were classified according to their cytoplasm appearance, blue (BCB+) and colorless (BCB-). The analyzed parameters in the oocyte were diameter, viability before maturation and after fertilization, assessment of the meiotic stage, embryo development and blastocyst formation. The results varied according to the classification of oocyte; BCB+ oocytes percentage from LF was higher in comparison with BCB+ from SF ($P<0.05$). Diameters of oocyte were similar in the BCB+ and BCB- from both follicular sizes ($P>0.05$). Viability was similar in the BCB+, BCB- and control groups from both follicular types, before maturation as well as after fertilization ($P>0.05$). Maturation percentages increased in both BCB+ and BCB- compared to control from SF ($P<0.05$) and similar in all groups from LF ($P>0.05$). The percentages of fertilization were greater in BCB+ than BCB- from SF ($P<0.05$); contrary to this result, BCB- showed mayor fertilization proportion that BCB+ from LF ($P<0.05$). Embryo development increased in the BCB+ compared to BCB- from SF ($P<0.05$), and all groups was similar from LF ($P>0.05$). Blastocyst production was best in BCB+ from SF ($P<0.05$) and in all groups from LF was similar ($P>0.05$). We conclude that BCB staining allows the selection of oocytes from SF that are competent of reaching the blastocyst stage in *Bos taurus*.

Key words: Brilliant cresyl blue, oocytes viability, oocytes diameter, meiosis state, *in vitro* embryo production.

1 INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos, es una tecnología manejada por varias compañías internacionales, causando un aumento en el número de transferencias de embriones *in vitro* a nivel mundial del 2003 (42,000 embriones) (Gonella *et al.*, 2013) al 2013 (400,000 embriones) (Gilchrist *et al.*, 2016). Además, la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS: siglas en inglés) reportó un aumento (500%) en la PIVE bovinos entre el 2001 (109,205 embriones) al 2015 (630,202 embriones) (Vélez *et al.*, 2017). Esta tendencia se ha mantenido mundialmente, ya que en el 2017 se menciona que se produjeron 992,289 embriones *in vitro* de bovino, pero lo más importante es que esta cantidad indica un aumento del 48.9% con respecto a la producción del año 2016 (Viana, 2018). Actualmente, la PIVE bovino aumentó 2.6% a nivel mundial en el 2018 (1,029,400 embriones) con respecto a la reportado en el 2017 (992,289 embriones) (Viana, 2019).

El país que inició con la producción de embriones *in vitro* de bovino fue Brasil (Gonella *et al.*, 2013), aportando hasta el 50% de la producción mundial (Caixeta & Dode, 2010). Este país empezó a utilizar la PIVE en bovinos desde el año 2000 donde se transfirieron 12,597 embriones, reportando 196,000 embriones transferidos para el 2006 (Giraldo, 2011). Estados Unidos de América y Brasil fueron los países que reportaron mayor número de embriones producidos *in vitro*, los cuales registran el 95.5% y 76.2% de la PIVE de bovino en América del Norte y Sur, respectivamente (Viana, 2018). Actualmente, Estados Unidos de América es el país con mayor número de embriones producidos *in vitro* de bovino con 451,661 y Brasil se ha posicionado como en segundo reportando 345,126 embriones. La diferencia entre estos dos países fue de 106,535 (Viana, 2019).

Se tiene registro de otros países como Canadá que reporta 127,000 embriones desarrollados *in vitro* de ganado lechero (Colazo & Mapletoft, 2007). En Nueva Zelanda, la industria lechera considera que la PIVE y el sexado de embriones son tecnologías que poseen una relación positiva en términos de costo-beneficio, representando ingresos adicionales de más de 800,000 dólares por año (Urrego *et al.*, 2008).

La PIVE a nivel internacional es considerada como una técnica muy productiva, ya que se estima que una vaca al nacimiento puede tener aproximadamente 150,000 ovocitos (Gonella

et al., 2013), pero menos del 0.1% llegan a ovular (Quispe *et al.*, 2015) y se obtienen durante la vida productiva de la vaca entre 4 a 5 crías por monta natural o inseminación artificial, por lo que se está subutilizando el potencial genético. Los ovocitos inmaduros pueden ser recuperados y mediante la producción *in vitro* generar embriones (Gonella *et al.*, 2013), que al ser transferidos a receptoras se obtengan nacimientos con la mejor genética (Sagirkaya *et al.*, 2006; López *et al.*, 2007; Gonella *et al.*, 2013). Además, los embriones desarrollados *in vitro* pueden ser criopreservados con fines de comercialización (López *et al.*, 2007; Rodríguez-Villamil *et al.*, 2016), siendo una alternativa para aquellos lugares que se encuentran retirados de un centro local de transferencias de embriones.

Además, la PIVE bovinos es un buen método para la investigación de procesos metabólicos, genéticos y del desarrollo de embriones de otras especies, incluso para humanos (Báez *et al.*, 2010; Gonella *et al.*, 2013).

Generalmente, en la PIVE de bovino se obtiene solo el 40% de blastocistos (Opiela *et al.*, 2008) y se considera que este problema está relacionado con la calidad del ovocito (Alm *et al.*, 2005; Ghoneimy *et al.*, 2017).

Siendo que son dos los factores que están relacionados con la calidad del ovocito: biológicos y técnicos (Bols *et al.*, 2012), los aspectos biológicos están vinculados con la fisiología de la donadora y los técnicos con los métodos de obtención de los ovocitos (Bols *et al.*, 2012).

De acuerdo a lo anterior es esencial determinar y seleccionar a los ovocitos de mejor calidad, por lo que se han descrito varios parámetros visuales para evaluar la calidad del ovocito como el tamaño folicular (Salimi *et al.*, 2014), diámetro del ovocito (Karami Shabankareh *et al.*, 2014), el espesor del cúmulo y la homogeneidad del citoplasma (Bhardwaj *et al.*, 2016). Otros indicadores que se consideran para determinar la calidad del ovocito incluyen la viabilidad (Fernández *et al.*, 2013), concentración de glutatión (Salimi *et al.*, 2014), la fase de crecimiento del ovocito determinada por la tinción de Azul de Cresil Brillante (Karami-Shabankareh *et al.*, 2014), el estado de la meiosis (Torner *et al.*, 2008), el número de mitocondrias y las concentraciones de lípidos (Castaneda *et al.*, 2013; Fakruzzaman *et al.*, 2013).

La eficiencia en la PIVE puede ser diferente dependiendo de la especie del bovino, ya que se ha observado que la cantidad de embriones obtenidos por fertilización *in vitro* está determinada por la especie de la donadora, por esta razón se han diseñado diferentes programas de PIVE en *Bos taurus* y *Bos indicus*, respectivamente (Valderrama *et al.*, 2011).

Se ha mencionado que en *B. indicus* se obtienen mayor número de ovocitos viables y de mejor calidad, por lo tanto, se obtiene mejor desarrollo de embriones *in vitro* que aquellos obtenidos de *B. taurus* (Valderrama *et al.*, 2011; Sales *et al.*, 2015). Sin embargo, la mayor cantidad de leche, se obtiene de razas *B. taurus* especializadas en la producción de leche como Holstein, Jersey y Pardo Suizo (Ríos *et al.*, 2015), de ahí la importancia de esta especie en México que es responsable aproximadamente del 50.6% de la producción nacional de leche (Villamar & Olivera, 2005).

El aprovechamiento de la PIVE en bovinos aumenta si se asocia con la aspiración folicular vía transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU: siglas en inglés) (Gimenes *et al.*, 2015), ya que con OPU se obtienen ovocitos por imagen en tiempo real de vacas con un potencial genético específico (carne y leche) (Denis, 2008). A partir de este material, y utilizando la PIVE se pueden generar embriones de un semental con cualidades diferentes que aumentaría el potencial genético o vigor híbrido (Watanabe *et al.*, 2017).

Actualmente es frecuente la asociación entre la OPU y PIVE como una alternativa en la producción de embriones, debido a que los programas de ovulaciones múltiples y transferencia de embriones (MOET: siglas en inglés) presentan deficiencias y son pocas las aplicaciones comerciales que se obtienen (Gimenes, *et al.*, 2015). Los beneficios de dicha asociación entre OPU y PIVE puede contribuir a la ganadería mexicana, especialmente en el ganado lechero, donde la producción nacional de leche en 2017, fue alrededor de 11 billones de litros (SAGARPA, 2018).

Además, la OPU y PIVE contribuyen a rescatar aquellas hembras genéticamente privilegiadas que presentan alguna anomalía que impiden la reproducción de manera natural (Báez *et al.*, 2010; Gonella *et al.*, 2013).

Brasil impulso y reemplazó las MOET por los programas de OPU/PIVE en bovino, además fomentó aquellas investigaciones enfocadas en aumentar la eficiencia de la OPU/PIVE en ganado Nelore, una raza de *B. indicus* que representa el 80% del rebaño brasileño (200 millones de animales) logrando con esta estrategia, una mayor cantidad de ovocitos recuperados por OPU con respecto a ganado *B. taurus* (Pontes *et al.*, 2010). La OPU/PIVE ha logrado que el 70% de embriones bovinos sean producidos *in vitro* en Brasil (Mota *et al.*, 2010); demostrando que la PIVE puede ser una alternativa para la producción de embriones de bovino para México.

2 MARCO TEORICO

2.1 Ciclo estral y foliculogénesis en bovino.

En la mayoría de las especies de mamíferos, el desarrollo del folículo y del ovocito es determinado por una secuencia de eventos que inicia desde la formación del ovario durante la organogénesis y culmina con la liberación de un ovocito en la etapa reproductiva (Picton *et al.*, 2008).

El ciclo estral del bovino generalmente tiene una duración de 21 días (intervalo: 17-24 días) (Sirard, 2011; Colazo & Mapletoft, 2014) y está conformado por una fase folicular (6-7 días) y una fase lútea (15 días) (Sirard, 2011). El ciclo se divide en cuatro etapas:

Proestro: la producción de prostaglandinas $F2\alpha$, disminuye la concentración de progesterona e inicia el aumento de FSH y LH (Maldonado *et al.*, 1997; Colazo & Mapletoft, 2014); estas gonadotropinas inician el desarrollo y crecimiento de folículos destinados a madurar, además aumenta la actividad de los órganos reproductivos (Motta *et al.*, 2011).

Estro: aumenta la concentración de LH que conduce a la maduración final del folículo ovulatorio, además aumenta la concentración de estrógenos. Las concentraciones preovulatorias de GnRH inducen el pico de FSH y LH, la ovulación se lleva a cabo después de 27 h de iniciado el estro (Maldonado *et al.*, 1997; Colazo & Mapletoft, 2014). Esta etapa es la de aceptación del semental para la cópula (Motta *et al.*, 2011).

Metaestro: se forma el cuerpo hemorrágico y a partir de éste, el cuerpo lúteo, además aumenta la producción de progesterona (Maldonado *et al.*, 1997; Motta *et al.*, 2011; Colazo & Mapletoft, 2014).

Diestro: es el periodo de reposo sexual (Motta *et al.*, 2011). Las células luteinizadas de la granulosa y de la teca interna producen cantidades constantes de progesterona (Maldonado *et al.*, 1997; Colazo & Mapletoft, 2014). Al final del diestro se inicia la producción de prostaglandina F_{2α}, la cual causa la lisis del cuerpo lúteo y da inicio a un nuevo ciclo estral.

La “dinámica folicular” se lleva a cabo durante el ciclo estral, la cual involucra los mecanismos de crecimiento, regresión y atresia de los folículos por medio de tres procedimientos:

Reclutamiento: grupo de folículos que son seleccionados para que inicien su maduración en respuesta a un estímulo de gonadotropinas.

Selección: a partir de un grupo de folículos, uno es seleccionado el cual continúa su desarrollo y no entra en atresia.

Dominancia: el folículo seleccionado domina el crecimiento folicular e induce la atresia de los demás folículos (Maldonado *et al.*, 1997).

El crecimiento folicular de la hembra bovina está regulado por medio de oleadas, las cuales se caracterizan por presentar un pico en la concentración de FSH (Henaó, 2010; Colazo & Mapletoft, 2014). El 95% de ciclos estrales del bovino se componen de 2 o 3 (Maldonado *et al.*, 1997; Colazo & Mapletoft, 2014) o hasta 4 oleadas (Maldonado *et al.*, 1997).

Las oleadas foliculares se generan durante la fase lútea (Bó *et al.*, 2003; Sirard *et al.*, 2006; Sirard, 2011), y dependiendo del número de oleadas foliculares puede acortarse o alargarse el ciclo estral; en vacas con dos, tres y cuatro oleadas, la duración es de 18, 21 y 24 días, respectivamente (Maldonado *et al.*, 1997).

El pico en la concentración de FSH circulante durante la oleada folicular causa dos eventos importantes: el reclutamiento de tres a seis folículos de 4-5 mm (Fortune *et al.*, 2001; Tabandeh *et al.*, 2012) y estimula al folículo dominante para que continúe su desarrollo, diferenciándose hasta alcanzar su máximo diámetro. El folículo dominante produce una mayor cantidad de

estradiol (Fortune *et al.*, 2001) y ejerce un efecto inhibitorio en el desarrollo de los folículos subordinados causando en ellos un proceso de atresia (Ghanem *et al.*, 2007; Sirard, 2011).

El crecimiento y desarrollo del ovocito depende de las células foliculares (Skinner 2005; Gilchrist *et al.*, 2008; Picton *et al.*, 2008), esta regulación se lleva a través de uniones comunicantes entre el ovocito, las células de la teca y de la granulosa (Skinner, 2005; Picton *et al.*, 2008).

El desarrollo folicular se inicia a partir de los folículos primordiales que se desarrollarán a folículos primarios, secundarios y terciarios. El ovario contiene una reserva de folículos primordiales inactivos con diámetros de $34.6 \pm 3.7 \mu\text{m}$, cada uno contiene un pequeño ovocito que no está en crecimiento, así como una capa de pre-granulosa y de células foliculares (Hyttel, 2011). Cada día se activa un cierto número de folículos primordiales (Rodgers & Irving-Rodgers, 2010), el ovocito no solo inicia su crecimiento, también experimenta modificaciones de orden ultra estructural (citoesqueleto) y bioquímico con la finalidad de adquirir la capacidad de desarrollo (Gonella *et al.*, 2013).

El folículo primario ($46.1 \pm 6.1 \mu\text{m}$) contiene al ovocito que está rodeado por una simple capa de células de la granulosa; ocasionalmente se puede observar entre el ovocito y las células de la granulosa pequeñas porciones de zona pelúcida (Hyttel, 2011).

El folículo secundario ($101.7 \pm 41.8 \mu\text{m}$) se desarrolla cuando las células de la granulosa comienzan a dividirse, aumentando el número de capas de células (membrana de la granulosa o epitelio folicular) alrededor del ovocito (Rodgers & Irving-Rodgers, 2010); también se observan alrededor del ovocito porciones de zona pelúcida asociada con microvellosidades (Hyttel, 2011).

El ovocito y las células de la granulosa durante el crecimiento folicular sintetizan y secretan elementos relacionados con la regulación del desarrollo folicular (Arashiro *et al.*, 2013), dentro de los cuales se pueden mencionar varios tipos de factores de crecimiento como: insulínico (IGF-I: siglas en inglés), epidérmico (EGF: siglas en inglés), fibroblástico, transformante β , factor 9 de crecimiento de diferenciación y proteína morfogenética del hueso (BMPs: siglas en inglés) especialmente BMP4, BMP7 y BMP15 (Picton *et al.*, 2008).

En el folículo terciario (>1 mm) se observa al ovocito con la zona pelúcida completa y con numerosas células de la granulosa, se forma el cúmulo y sus proyecciones terminan invaginadas en el oolema (microvellosidades) formando uniones de tipo adherentes y comunicantes con el ovocito (Hyttel, 2011), además se empieza a formar el antro y las capas del estroma especializadas; la teca interna y externa (Rodgers & Irving-Rodgers, 2010) (Figura 1).

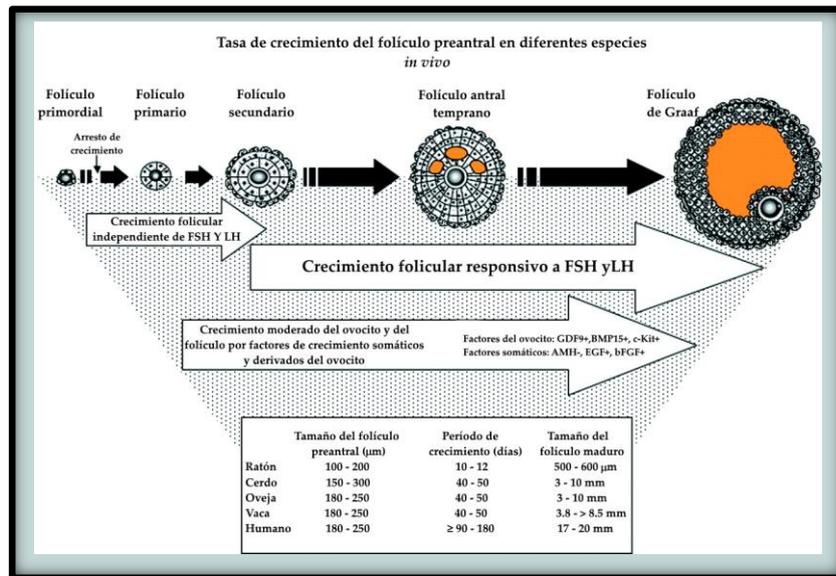


Figura 1. Desarrollo folicular en diferentes especies. Picton *et al.*, 2008

El sistema de IGF-I puede tener un papel clave en la selección del folículo dominante, debido a que estimula la proliferación celular y promueve la diferenciación de las células de la granulosa y de la teca, aquel folículo con mayor concentración de IGF-I en el líquido folicular, tiende a convertirse en el folículo dominante (Colazo & Mapletoft, 2014). Por otra parte, si la concentración de IGF-I circulante es baja, se observa una reducción del diámetro del folículo dominante y también es menor el tiempo de persistencia de este folículo dominante (Motta *et al.*, 2011).

El folículo dominante tiene más receptores de LH en las células de la granulosa y por eso tiene una ventaja competitiva sobre los folículos subordinados (Colazo & Mapletoft, 2014); dicho folículo ovula en respuesta al pico de LH. Las células de la teca y granulosa se diferencian en

pequeñas células luteales formando el cuerpo lúteo. Los folículos que no ovulan entran en regresión y sufren atresia (Rodgers & Irving-Rodgers, 2010).

El desarrollo folicular tiene como finalidad la maduración del ovocito, durante este crecimiento los ovocitos adquieren gradual y secuencialmente la capacidad de reanudar la meiosis, adquiriendo la maquinaria molecular y citoplasmática necesaria para el desarrollo embrionario (Gilchrist *et al.*, 2008).

2.2 Maduración del ovocito.

El ovocito madurado debe tener la capacidad de completar la meiosis y convertirse en una célula haploide, prepararse citoplasmáticamente para la fertilización, reprogramar la cromatina del espermatozoide y su propia cromatina para formar dos pronúcleos funcionales, permitir el desarrollo embrionario temprano e inducir la activación del genoma embrionario (Gonella *et al.*, 2013). El ovocito para adquirir esta habilidad debe entrar en un proceso de maduración que abarca dos fases: la maduración nuclear y la citoplasmática (Sirard *et al.*, 2006; Gonella *et al.*, 2013; Thompson & Gilchrist, 2013).

El ovocito durante la foliculogénesis se somete a cambios a nivel cromosómico (maduración nuclear) y modificaciones citoplasmáticas (maduración citoplasmática) para adquirir la capacidad de desarrollo (Coticchio *et al.*, 2015; Gilchrist *et al.*, 2016). Al final del proceso de maduración *in vivo*, un ovocito es liberado con la capacidad de llevar a cabo la fertilización y el desarrollo embrionario (Fulka *et al.*, 1998).

2.2.1 Maduración nuclear.

El ovocito debe madurar a una célula haploide, lo que implica una serie de eventos a nivel cromosómico como son la ruptura de la vesícula germinal (VG), la condensación de los cromosomas, alcanzar el estadio de metafase I (MI), la expulsión del cuerpo polar y el subsiguiente arresto meiótico en metafase II (MII) (Gonella *et al.*, 2013).

El pico de LH pre ovulatorio induce la maduración, de tal forma que un ovocito inmaduro en estado de diploteno (profase I) continúe con la meiosis hasta completar la MII (Mehlmann,

2005; Coticchio *et al.*, 2015); este proceso tarda 24 h a partir del pico de LH (Hyttel, 2011). La LH induce una señal a través de las células de la granulosa mural (Mehlmann, 2005; Dunning *et al.*, 2014), induciendo un pico de AMPc (Adenosín Monofosfato cíclico) en las células de la granulosa y del cúmulo, y a su vez el AMPc migra desde estas células al ovocito, activando la cinasa de proteínas A y el factor promotor de la maduración (MPF: siglas en inglés) (Gilchrist *et al.*, 2016), un complejo proteico compuesto por ciclina B1 y p32cdc2 (Sirard *et al.*, 2006). El MPF induce el rompimiento de la VG para continuar con la meiosis (Figura 2) (Mehlmann, 2005; Gilchrist *et al.*, 2016).

El rompimiento de la VG se observa de 9 a 12 h después del pico de LH y la cromatina gradualmente se condensa, después de 15 h los ovocitos han alcanzado la MI y 20 h después adquieren la MII (Hyttel, 2011).

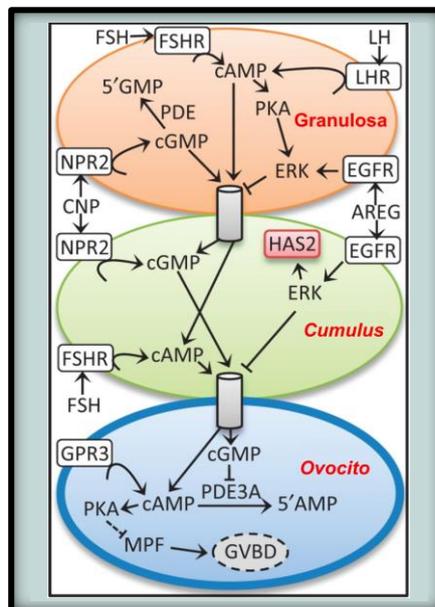


Figura 2. Vía de señalización de la LH a través de las células foliculares.
Gilchrist *et al.*, 2016

Se menciona que la maduración nuclear de ovocitos de bovino puede llevarse a cabo espontáneamente, este fenómeno es causado cuando el ovocito es separado del líquido folicular, eliminando factores inhibitorios que están presentes, ocasionando que la meiosis avance hasta alcanzar la MII, sin un estímulo hormonal (Mehlmann, 2005; Sirard, 2011).

2.2.2 Maduración citoplasmática.

La capacidad de desarrollo del ovocito es un término que se utiliza para nombrar a la maduración citoplasmática (Thompson & Gilchrist, 2013). El ovocito adquiere gradualmente la maduración citoplasmática durante la ovogénesis y foliculogénesis donde aumenta su volumen y diámetro por acumulación de agua, iones, carbohidratos, lípidos (Karami-Shabankareh & Mirshamsi, 2012), ARNm, ADN mitocondrial, glutatión sintetasa y proteínas que ayudan tanto a la maduración nuclear como a la citoplasmática para llevar a cabo la transición del genoma materno al embrionario (Mota *et al.*, 2010).

La maduración citoplasmática del ovocito implica modificaciones como el aumento de la actividad de la cinasa de proteínas activada por mitógenos y del MPF; se implementan los mecanismos necesarios para controlar y regular el aumento de la concentración de Ca^{2+} , fundamental para la descondensación de la cromatina del espermatozoide (Gonella *et al.*, 2013).

En el proceso de la maduración se requiere de energía metabólica. Los ovocitos muestran baja actividad de la ruta glucolítica, pero en las células del cúmulo dicha actividad es mayor proporcionando al ovocito productos del catabolismo de la glucosa como el piruvato y lactato (Cetica *et al.*, 2002). Similarmente, la actividad de glucosa -6- fosfato deshidrogenasa (G6PDH: siglas en inglés) es mayor en las células del cúmulo y de la misma manera facilita metabolitos como el dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfatado (NADPH: siglas en inglés) al ovocito (Cetica *et al.*, 2002).

La primera evidencia de maduración citoplasmática se observa cuando el ovocito disminuye la actividad transcripcional por la condensación del núcleo (Sirard *et al.*, 2006). Además, la LH contribuye a la maduración induciendo la redistribución de mitocondrias, ribosomas, reducción del aparato de Golgi, aumento en el contenido de lípidos (Sirard *et al.*, 2006; Caixeta & Dode, 2010; Hyttel, 2011), alineamiento de los gránulos corticales hacia la membrana plasmática (Sirard *et al.*, 2006; Caixeta & Dode, 2010; Hyttel, 2011; Silva *et al.*, 2011) y aumenta el número de mitocondrias en el ovocito (Dunning *et al.*, 2014).

Los cambios moleculares para adquirir la capacidad de desarrollo del ovocito involucran síntesis, degradación y modificaciones de ARNm, así como de proteínas para la fertilización y el desarrollo embrionario (Sirard *et al.*, 2006; Caixeta & Dode, 2010). La transcripción disminuye cuando el ovocito completa la maduración; este evento se observa en ovocitos de folículos de 3 mm, donde la transcripción del ovocito continúa a niveles inferiores, sugiriendo que las proteínas son degradadas y los transcritos son traducidos, al momento de la activación del genoma embrionario (Caixeta & Dode, 2010).

Los ovocitos de folículos antrales tienen mecanismos únicos para sintetizar y almacenar ARNm, pero esta acumulación no se observa en los ovocitos primarios (Sirard, 2011). Los ARNs *de novo* que se sintetizan en una célula somática permanecen durante 2-3 h y después son degradados, en cambio algunos ARNs de ovocitos de mamíferos pueden permanecer alrededor de 7 días para la activación del genoma embrionario (Sirard, 2011).

Las concentraciones de algunos ARNm aumentan en folículos de gran tamaño (>8 mm): PSMB2, SKIIP, CDC5L, RGS16, PRDX1, CCNB2, PTTG1 y CKS1. Estos genes están relacionados con la regulación del ciclo, metabolismo y señalización celular, lo que indica que los ovocitos competentes almacenan mayor cantidad de ARNm que codifican para proteínas involucradas en el ciclo celular para garantizar las primeras divisiones durante el desarrollo embrionario (Caixeta & Dode, 2010).

2.2.3 Importancia de la Glucosa -6- fosfato deshidrogenasa en la maduración citoplasmática.

La G6PDH es la principal reguladora de la vía de las pentosas fosfato y su función es proveer unidades de ribosa fosfato para la síntesis de nucleótidos y proporcionar NADPH (Bhojwani *et al.*, 2007; Mota *et al.*, 2010; Karami-Shabankareh & Mirshamsi, 2012; Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2012; Karami-Shabankareh *et al.*, 2014). La vía de las pentosas fosfato también está involucrada en la fertilización (Mota *et al.*, 2010) encargándose de la reducción del glutatión (Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2011, Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2012) proceso necesario para la descondensación del espermatozoide.

Los EGF y IGF-I estimulan la actividad de la G6PDH y existe una relación entre el aumento de la actividad de la vía pentosas fosfato y el crecimiento celular que puede durar horas o hasta días (Tian *et al.*, 1998).

El NADPH es fundamental para el crecimiento celular, debido a que es el principal agente reductor intracelular, además es importante para la regulación REDOX (Tain *et al.*, 1998). Las concentraciones de NADPH en el ovocito son mantenidas por dos mecanismos: mediante la G6PDH del ovocito y a través de las células del cúmulo que transfieren este metabolito al ovocito por medio de las uniones celulares. Tales concentraciones de NADPH son necesarias para la síntesis de lípidos y regeneración del glutatión reducido (Cetica *et al.*, 2002).

El papel de la G6PDH es trascendental durante el crecimiento folicular (Mota *et al.*, 2010), además la enzima es sintetizada en la ovogénesis a lo largo del desarrollo del ovocito (Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2012; Karami-Shabankareh *et al.*, 2014; Bhardwaj *et al.*, 2016). La actividad de la G6PDH aumenta durante la etapa de crecimiento y disminuye cuando el ovocito ha completado este proceso (Opiela *et al.*, 2008; Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2011; Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2012; Karami-Shabankareh & Mirshamsi, 2012; Su *et al.*, 2012; Karami-Shabankareh *et al.*, 2014; Bhardwaj *et al.*, 2016). La actividad de la G6PDH en el crecimiento del ovocito del bovino puede tener una duración de hasta 6 meses (Gonella *et al.*, 2013).

La baja actividad de la G6PDH se relaciona con varios indicadores de maduración citoplasmática como la organización de los gránulos corticales, actividad de las mitocondrias, concentraciones de lípidos y glutatión citoplasmático (Yang *et al.*, 2016).

2.2.4 Importancia de los lípidos en la maduración citoplasmática.

Los lípidos son moléculas hidrofóbicas y anfipáticas con diversas funciones biológicas como fuente de energía, mediadores de señalización celular y forman parte de moléculas estructurales de la membrana plasmática y organelos (Dunning *et al.*, 2014), además tienen un papel importante en la formación de las propiedades físicas y funcionales de las membranas biológicas (Tsuji *et al.*, 2001; Dunning *et al.*, 2014), así como en las interacciones entre célula y célula, en la proliferación celular y transporte intracelular e intercelular (Tsuji *et al.*, 2001).

Los ácidos grasos de mayor relevancia en el útero de bovino son el oleico, palmítico, linoleico y araquidónico, estos tienen un papel especial en el desarrollo embrionario, por lo tanto, la presencia de estos ácidos grasos en ovocitos de bovino es diferente. El ácido oleico (33.2%) es el más abundante del total de ácidos grasos, seguido del palmítico (24.1%), linoleico (16.8%) y araquidónico (15.1%) (Tsuji *et al.*, 2001).

Los ácidos grasos son almacenados intracelularmente como triglicéridos en gotas lipídicas (Dunning *et al.*, 2014). El papel biológico de los triglicéridos es de almacenaje de energía metabólica (Tsuji *et al.*, 2001; Sturme *et al.*, 2009), por lo que proveen una gran cantidad de energía ante una demanda importante. La oxidación del ácido palmítico puede generar 106 moléculas de ATP (Dunning *et al.*, 2014) comparada con la oxidación de la glucosa de la que sólo se obtiene 38 moléculas de ATP (Ramos *et al.*, 2006).

El número de gotas lipídicas presentes en el citoplasma del ovocito varía de acuerdo a la especie, observándose mayor cantidad en ovocitos con predominancia fenotípica *Bos taurus* que en ovocitos con predominancia fenotípica *Bos indicus*, pero este efecto se invierte cuando se desarrollan los embriones *in vitro*, donde se observa mayor número de gotas lipídicas en *Bos indicus* y sus cruza (*Bos indicus* X *Bos taurus*) que *Bos taurus* (Ordoñez *et al.*, 2014). Se desconoce el mecanismo de la acumulación de las gotas lipídicas en el citoplasma, pero se cree que poder ser resultado de dos posibles causas: a) los embriones son capaces de adsorber lípidos del medio de cultivo, especialmente de aquellos con abundante cantidad de lípidos (suero), b) la acumulación de lípidos es causada por una deficiente capacidad mitocondrial para metabolizar los lípidos vía β -oxidación (De la Torre *et al.*, 2006).

La actividad de la G6PDH no solo se relaciona con la maduración citoplasmática, sino también hay una correlación entre la actividad mitocondrial y la cantidad de lípidos presentes en el citoplasma (Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2014; Ghoneimy *et al.*, 2017). Los lípidos son necesarios para los estados iniciales de desarrollo embrionario, síntesis de proteínas y ARNm, además las mitocondrias pueden aumentar la producción de ATP a partir de los ácidos grasos (Dunning *et al.*, 2014), proporcionando la energía que se requiere durante la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario (Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2014).

Los ovocitos de bovino contienen numerosas gotas lipídicas, las cuales están asociadas con el retículo endoplásmico y las mitocondrias (Cetica *et al.*, 2002). La cantidad de lípidos presentes se ha asociado con el color del citoplasma del ovocito de bovino: transparente, café y oscuro. Los ovocitos con citoplasma oscuro tienen mayor capacidad de desarrollo que aquellos que son transparentes (Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2014).

El citoplasma transparente contiene mayor concentración de ácidos oleico y linoleico, pero la concentración del ácido palmítico es similar en ovocitos con citoplasma de color transparente y oscuro. Solo se observó mayor cantidad de ácido esteárico saturado en los citoplasmas oscuros (Dunning *et al.*, 2014). Recientemente el contenido de lípidos del ovocito es considerado como un parámetro esencial para la maduración citoplasmática y el desarrollo embrionario en bovinos (Ghoneimy *et al.*, 2017).

Las concentraciones de triglicéridos y colesterol de los ovocitos de bovino disminuyen progresivamente durante la maduración *in vitro* (MIV), fertilización *in vitro* (FIV) y desarrollo embrionario *in vitro* (DEIV) (Castaneda *et al.*, 2013); antes de la maduración se reportan concentraciones de 50-59 ng de triglicéridos, después de la MIV de 37-46 ng y post-fertilización de 34 ng (Sturmey *et al.*, 2009). Existen diferentes factores que modifican la concentración de lípidos en el ovocito, líquido y células foliculares, como son: la dieta, la condición corporal, la edad (novillas ó vacas adultas), lactación (Dunning *et al.*, 2014) y la especie (*B. taurus*, *B. taurus/B. indicus* y *B. indicus*) (Ordoñez *et al.*, 2014).

2.3 Determinación de la calidad del ovocito de bovino.

La calidad de los ovocitos es el principal factor que afecta en la PIVE (Opiela *et al.*, 2008; Gonella *et al.*, 2013; Bhardwaj *et al.*, 2016), el 60% de los ovocitos de bovino recuperados fallan en alcanzar el estado de blastocisto después de la fertilización (Alm *et al.*, 2005; Opiela *et al.*, 2008). Este problema está relacionado con la calidad del ovocito al inicio de la MIV (Alm *et al.*, 2005; Ghoneimy *et al.*, 2017).

El bovino es una especie mono-ovulatoria por lo que la mayor parte de los folículos y ovocitos obtenidos están destinados a degenerar (Blondin & Sirard, 1995; Herradón *et al.*, 2007), por ello es necesario identificar al ovocito con la capacidad para reanudar la meiosis, dividirse

después de la fertilización, desarrollarse al estado de blastocisto, inducir la gestación y llevar a término el nacimiento (Hasan *et al.*, 2013; Bhardwaj *et al.*, 2016; Ghoneimy *et al.*, 2017). La calidad de los ovocitos de bovino puede estar determinada por varios aspectos, los cuales se agrupan en factores biológicos y técnicos (Bols *et al.*, 2012). En cuanto a los biológicos están contemplados, el estado clínico y fisiológico de las donadoras (Gonella *et al.*, 2013) así como el estado del ciclo estral en el momento que son aspirados los ovocitos (Bols *et al.*, 2012; Quezada-Casasola *et al.*, 2018), la fisiología del folículo, la estimulación hormonal (Bols *et al.*, 2012), la especie y raza (Camargo *et al.*, 2006; Bols *et al.*, 2012; Gimenes *et al.*, 2015; Quispe *et al.*, 2015; Ghoneimy *et al.*, 2017), la edad (Caixeta & Dode, 2010; Labrecque & Sirard, 2014; Ghoneimy *et al.*, 2017; Quezada-Casasola *et al.*, 2018), la estacionalidad (Bó *et al.*, 2003; Ghoneimy *et al.*, 2017), las condiciones ambientales (Camargo *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2014; Quispe *et al.*, 2015; Ghoneimy *et al.*, 2017) y el estado nutricional (Valderrama *et al.*, 2011; Bols *et al.*, 2012; Quispe *et al.*, 2015; Ghoneimy *et al.*, 2017).

Mientras que los factores técnicos que determinan la calidad del ovocito están relacionados con los procedimientos de recuperación: visualización del folículo, agujas empleadas, el método de aspiración y obtención del ovocito (Bols *et al.*, 2012).

Se han descrito algunos parámetros para predecir la calidad del ovocito, en un intento por determinar su capacidad de desarrollo. La más frecuente es la evaluación de las características morfológicas como: el espesor del cúmulo y la homogeneidad del citoplasma (Caixeta & Dode, 2010; Heleil & Fayed, 2010; Gonella *et al.*, 2013; Karami-Shabankareh *et al.*, 2014; Salimi *et al.*, 2014; Bhardwaj *et al.*, 2016; Ghoneimy *et al.*, 2017), el tamaño folicular de donde es obtenido el ovocito (Karami Shabankareh *et al.*, 2014; Labrecque & Sirard, 2014; Salimi *et al.*, 2014; Ghoneimy *et al.*, 2017) y el diámetro del ovocito (Pujol *et al.*, 2004; Heleil & Fayed, 2010; Karami Shabankareh *et al.*, 2014; Salimi *et al.*, 2014; Ghoneimy *et al.*, 2017); además el momento en que se da la primera división embrionaria, se ha considerado como indicativo de la calidad (Caixeta & Dode, 2010).

Evaluaciones de tipo celular y molecular se han utilizado para determinar la calidad del ovocito tales como pruebas de viabilidad con MTT (azul de tiazolil) para evaluar la actividad de la mitocondrias (Fernández *et al.*, 2013), las concentraciones de glutatión intracelular, el cual es un biomarcador de la maduración citoplasmática (Salimi *et al.*, 2014, la tinción de Azul de Cresil

Brillante que determina la fase de crecimiento del ovocito (Karami-Shabankareh *et al.*, 2014; Muasa *et al.*, 2015; Ghoneimy *et al.*, 2017) el estado de la meiosis antes de la MIV (Torner *et al.*, 2008), el número de mitocondrias y la distribución de lípidos (Castaneda *et al.*, 2013; Fakruzzaman *et al.*, 2013; Ghoneimy *et al.*, 2017).

Las evaluaciones de la calidad del ovocito tienen como objetivo determinar la capacidad de desarrollo del mismo, por lo que es necesario describir en que se basan cada una de ellas y sus implicaciones en la PIVE.

2.3.1 Especie y Raza.

Se obtienen ovocitos de mejor calidad, mayor número de ovocitos viables y mejor desarrollo de embriones *in vitro* en *B. indicus* que aquellos obtenidos de *B. taurus* (Valderrama *et al.*, 2011; Sales *et al.*, 2015).

La fisiología reproductiva entre *B. taurus* y *B. indicus* es diferente en algunas características, tales como la duración del estro, dinámica folicular, concentraciones de hormonas esteroideas y la estacionalidad (Sales *et al.*, 2015).

La duración del estro es diferente en *B. indicus* y *B. taurus* (Bó *et al.*, 2003); incluso se manifiesta en animales prepúberes, siendo más corto y menos manifiesto en *B. indicus* (Reynolds *et al.*, 1963). Sin embargo, esta característica puede estar sujeta a la raza y no a la especie; la duración del estro no mostró diferencia entre Angus (*B. taurus*) y Brahman (*B. indicus*): 19 ± 2 h y 17 ± 2 h, respectivamente (Bó *et al.*, 2003).

Los procesos que se llevan a cabo durante la dominancia folicular son similares entre las especies de ganado bovino, sin embargo hay diferencias en el tamaño del folículo dominante, siendo de mayor diámetro en *B. taurus* que *B. indicus* (Robles *et al.*, 2000; Bó *et al.*, 2003; Henao, 2010; Motta *et al.*, 2011; Colazo & Mapletoft, 2014; Muasa *et al.*, 2015), siendo de 8.5-20 mm y 6.2-12 mm, respectivamente (Bó *et al.*, 2003; Motta *et al.*, 2011). Consecuentemente, el diámetro del cuerpo lúteo es mayor en *B. taurus* (20-30 mm) que *B. indicus* (17-21 mm), lo que conlleva a que la concentración de progesterona sea menor en esta última especie (Bó *et al.*, 2003; Colazo & Mapletoft, 2014).

En vaquillas de Pardo Suizo presentaron folículos dominantes con mayor diámetro en comparación con vaquillas Cebú (no se especifica la raza) (Calderón *et al.*, 2000). Las tasas de crecimiento del folículo dominante y de otros folículos es mayor en las razas europeas (1.1-2.0 mm/día) que en la raza Nelore (0.9 mm/día) (Valencia *et al.*, 2017).

La diferencia más notable desde el punto de vista reproductivo entre las especies de bovino son el número de ondas foliculares por ciclo estral. Se ha mencionado que en *B. taurus* se presentan 2 oleadas foliculares (81%) y 3 oleadas en *B. indicus* (50-60%) (Henaó, 2010; Motta *et al.*, 2011), incluso ocasionalmente hasta 4 oleadas (5%) en esta última (Bó *et al.*, 2003; Colazo & Mapletoft, 2014; Valencia *et al.*, 2017). En novillas Nelore, vacas Gyr y Brahman predominan ciclos estrales de 3 oleadas (Valencia *et al.*, 2017). Esta diferencia en el número de oleadas causa que *B. indicus* (Nelore y Gyr) pueda reclutar un mayor número de folículos (33.4 ± 3.2) que *B. taurus* (24.4 ± 2.5) (Holstein y Angus) (Henaó, 2010; Motta *et al.*, 2011; Colazo & Mapletoft, 2014; Valencia *et al.*, 2017). Por esta razón, en *B. indicus* se observa una mayor población folicular (<5 mm) (Colazo & Mapletoft, 2014; Quispe *et al.*, 2015). En un estudio llevado a cabo en más de 100 vaquillas Nelore se registraron 41.5 de folículos ≥ 3 mm en promedio, además se detectaron un número mayor de folículos pequeños en novillas Brahman que en Angus (Valencia *et al.*, 2017). Esta diferencia se hace más evidente cuando se utiliza la OPU para obtener los ovocitos, donde se recuperaron 17.1 y 11.4 ovocitos de ganado Gyr y Holstein, respectivamente (Pontes *et al.*, 2010). Similarmente, en otro estudio se obtuvo mayor cantidad de ovocitos de Nelore (35.2 ± 4.8 , 37.5 ± 4.4 y 38.5 ± 4.3) que Holstein (13.8 ± 1.8 , 16.2 ± 2.2 y 16.2 ± 2.3) durante tres recuperaciones diferentes, respectivamente (Gimenes *et al.*, 2015). Aunque, esta diferencia también se observa entre razas de la misma especie, se obtuvieron 5.2, 7.0 y 9.1 ovocitos de ganado Holstein, Pardo Suizo y Simmental, respectivamente (Quispe *et al.*, 2015).

Una posible explicación de la diferencia del desarrollo folicular entre las especies de bovino puede estar relacionada con las concentraciones de IGF-I que son diferentes entre *B. indicus* y *B. taurus* (Bó *et al.*, 2003), ya que el mayor desarrollo folicular que se observa en *B. indicus* está asociado con un aumento en los niveles sanguíneos de IGF-I (Gimenes *et al.*, 2015). Se ha demostrado que IGF-I y la folistatina pueden regular el reclutamiento folicular, además la

administración de la hormona de crecimiento aumenta la concentración de IGF-I, lo que reclutó mayor cantidad de folículos por oleada folicular (Valencia *et al.*, 2017).

Además, existen algunas diferencias del DEIV entre las especies de bovinos, incluso suele ser diferente, si es ganado de carne o leche. Los ovocitos de razas especializadas en la producción de carne, son más competentes y desarrollan a blastocisto con más frecuencia que aquellos ovocitos obtenidos de razas lecheras (Camargo *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2013). Por lo que el DEIV es menor en Jersey (raza lechera) que en Nelore y Angus (razas cárnicas) (Silva *et al.*, 2013). Similarmente, obtuvieron mayor desarrollo de blastocisto (53.4%) de Hereford comparado con Holstein (39.5%) (Fischer *et al.*, 2000).

La especie de la donadora es un factor importante en la cantidad de embriones desarrollados por FIV, pero esta cualidad está determinada por las condiciones climáticas y de zona donde habitan las donadoras. El DEIV es mejor en *B. indicus* bajo condiciones tropicales (Camargo *et al.*, 2007). En cambio, la proporción de blastocisto en *B. taurus* fue mejor en clima templado (14°C) (Valderrama *et al.*, 2011).

Se ha reconocido ampliamente que en *B. taurus*, es muy sensible al estrés calórico, adaptándose mejor en clima templado (Camargo *et al.*, 2007; Valderrama *et al.*, 2011). Los embriones de Nelore y Brahman tienen mejor resistencia al estrés calórico (41°C durante 6 h) que embriones de Jersey, Holstein y Angus (Silva *et al.*, 2013). Esta resistencia ayuda a que los embriones se desarrollen bajo condiciones estresantes; en investigaciones previas, han obtenido mejor desarrollo de blastocisto (41%) de la raza Brahman durante la época de calor (22-36 °C) que la raza Holstein (0%) (Rocha *et al.*, 1998). Similarmente, en otro estudio observaron mejor desarrollo de blastocisto en otras razas de *B. indicus* como Nelore y Gyr (28%), en comparación con la raza Holstein (15%) (Gimenes *et al.*, 2015).

Esta resistencia al estrés calórico puede ser transmitida a través del ovocito y espermatozoide de *B. indicus*. Los embriones obtenidos con ovocitos de Brahman y espermatozoide Angus fueron más termorresistentes que embriones desarrollados a partir de ovocitos Holstein y espermatozoide Angus (Báez *et al.*, 2010).

Se ha determinado que las peores épocas para implementar los programas de transferencia de embriones de *B. indicus* es el otoño e invierno, siendo la mejor época en verano, en cambio en *B. taurus* se obtiene un mayor número de embriones transferibles durante la época fría (Gutierrez *et al.*, 2014).

2.3.2 Edad.

La edad de las donadoras puede influir sobre la calidad del ovocito (Torner *et al.*, 2008; Ghoneimy *et al.*, 2017; Quezada-Casasola *et al.*, 2018). Las vacas de 13 a 16 años disminuyen su fertilidad en comparación con las jóvenes de 3 a 6 años (Labrecque & Sirard, 2014). Las novillas *B. indicus* de 4-7 meses desarrollan blastocistos *in vitro* en proporción similar que las de vacas adultas, en cambio la calidad del ovocito es similar entre novillas Holstein de 7-11 meses y vacas adultas (Camargo *et al.*, 2006).

2.3.3 Estacionalidad y condiciones ambientales.

La duración del día está ligada al desempeño reproductivo del bovino, los mecanismos por los cuales los días largos modifican la reproducción en bovinos aún no están claros, pero al parecer esta condición tiene un mayor efecto en ganado *B. indicus* que *B. taurus* (Bó *et al.*, 2003). El desempeño reproductivo de ganado *B. indicus* fue mejor durante el verano (Camargo *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2017) que en invierno (Bó *et al.*, 2003); el 61% de preñez en ganado Brahman (*B. indicus*) fue obtenido durante el verano y el 36% en otoño (Bó *et al.*, 2003). Por otra parte, la eficiencia reproductiva en *B. taurus* es mejor durante el otoño-invierno (Camargo *et al.*, 2006) que primavera-verano (Bó *et al.*, 2003), pero este efecto se le atribuye más al estrés calórico que al fotoperiodo.

Las condiciones ambientales pueden modificar algunas funciones básicas y reproductivas del bovino (Ghoneimy *et al.*, 2017). El ganado *B. taurus* es muy sensible a los cambios ambientales y al estrés calórico (Silva *et al.*, 2013) causando un inmediato deterioro en el desarrollo folicular (Baéz *et al.*, 2010). El aparato reproductor femenino expuesto a temperaturas elevadas puede afectar la foliculogénesis, disminuye el flujo de sangre hacia el útero y las concentraciones de progesterona (Silva *et al.*, 2013). Se ha reportado que el estrés calórico modifica negativamente la comunicación intracelular entre las células de la granulosa,

cúmulo y el ovocito, y este daño puede modificar la capacidad del ovocito para ser fecundado y el desarrollo embrionario (Rocha *et al.*, 1998; Baéz *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013). Además, compromete la viabilidad de las células de la granulosa y de la teca interna provocando cambios en la esteroidogénesis (Baéz *et al.*, 2010).

El ganado *B. indicus* tienen la habilidad especial para controlar su temperatura corporal, esta característica puede ser una adaptación genética a nivel celular que permite a esta especie sobrevivir en climas calurosos (Camargo *et al.*, 2006). Además, el *B. indicus* poseen características anatómicas y funcionales que le permite adaptarse a los cambios climáticos y mayor resistencia a enfermedades (Báez *et al.*, 2010). Por lo que en regiones tropicales predominan el *B. indicus* debido a su mejor adaptabilidad al estrés calórico y enfermedades parasitarias, en cambio, *B. taurus* tiene una mejor adaptación en regiones templadas (Bó *et al.*, 2003; Báez *et al.*, 2010; Ríos *et al.*, 2015).

2.3.4 Estado nutricional.

La condición corporal es importante, debido a que refleja el estado de nutrición del animal. La condición corporal puede influir en la liberación y síntesis de hormonas metabólicas y reproductivas, la calidad del ovocito y el desarrollo folicular (Sales *et al.*, 2015; Maia *et al.*, 2017). La dieta tiene estrecha relación con la capacidad de desarrollo del ovocito *in vivo*. Las fórmulas de las dietas para novillas y vacas, que exceden los requerimientos nutricionales para el crecimiento y mantenimiento respectivamente, resultan perjudiciales para la fertilización (Sales *et al.*, 2015). Por otra parte, se relaciona una mala nutrición con baja calidad de los ovocitos, problemas para continuar con la meiosis y número de folículos reclutados (Maia *et al.*, 2017). El desarrollo folicular es alterado por las bajas concentraciones de IGF-I circulante, causando una reducción del diámetro del folículo dominante (Motta *et al.*, 2011).

2.3.5 Evaluación del espesor del cúmulo y homogeneidad del citoplasma.

La selección de los ovocitos para la PIVE en ambas especies del bovino, se basa principalmente en la evaluación a través del microscopio de la cantidad y compactación de las células del cúmulo alrededor del ovocito, además de la homogeneidad del citoplasma (Caixeta & Dode, 2010; Mirshamsi *et al.*, 2013; Bhardwaj *et al.*, 2016).

Los ovocitos con mayor viabilidad presentan citoplasma homogéneo con granulaciones finas, de coloración marrón y completamente envueltos por varias capas de células del cúmulo dispuesta en forma compacta (Herradón *et al.*, 2007; Gonella *et al.*, 2013). Se ha demostrado que existe una relación entre la apariencia de las células del cúmulo y del citoplasma con la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro*. Generalmente esta evaluación describe 4 categorías (Herradón *et al.*, 2007; Caixeta & Dode, 2010; Bols *et al.*, 2012; Gonella *et al.*, 2013):

- Grado 1: Son los complejos-ovocitos-cumulus (COCs) con citoplasma homogéneo con granulaciones finas y múltiples capas compactas de células del cúmulo (Caixeta & Dode, 2010). Los COCs deben presentar por arriba de 3 capas de células. La zona pelúcida llena, completa y de color marrón (Gonella *et al.*, 2013).
- Grado 2: COCs que presentan citoplasma con pequeñas áreas mostrando irregularidades y cúmulo compacto menor que la categoría 1 (Caixeta & Dode, 2010), al menos 3 capas de células (Gonella *et al.*, 2013). Estas irregularidades pueden estar concentradas más en el centro, distribuidas en la periferia o condensadas en una sola zona aparentando una mancha oscura (Gonella *et al.*, 2013).
- Grado 3: Ovocito con citoplasma heterogéneo/vacuolizado (Caixeta & Dode, 2010) con espacios entre la membrana celular y la zona pelúcida (Gonella *et al.*, 2013) cubierto por pocas capas de células de cúmulo o con pequeñas áreas desnudas (Caixeta & Dode, 2010; Gonella *et al.*, 2013).
- Grado 4: Ovocito con citoplasma heterogéneamente pigmentado y cúmulo completamente o parcialmente ausente o expandido (Caixeta & Dode, 2010; Gonella *et al.*, 2013).

Los COCs clasificados como grado 1 son considerados como los más competentes para el desarrollo embrionario y los COCs de grado 4 son comúnmente descartados para la PIVE (Caixeta & Dode, 2010; Bols *et al.*, 2012).

La abundancia de las células del cúmulo es importante debido a las comunicaciones a través de proyecciones del cúmulo que penetran la zona pelúcida y mediante uniones comunicantes al oolema (Bols *et al.*, 2012). Las células del cúmulo, no solo juegan un papel importante para la maduración y fertilización, sino también para alcanzar el estadio de blastocisto (Janowski *et al.*, 2012).

Sin embargo, la selección del ovocito mediante este método aporta un vago criterio de elección (Mirshamsi *et al.*, 2013; Bhardwaj *et al.*, 2016). Se menciona que ovocitos con apariencia morfológica normal pueden encontrarse en un estado temprano de degeneración (Karami-Shabankareh *et al.*, 2014; Sadeesh *et al.*, 2014), por lo que la evaluación morfológica no es un criterio suficiente para identificar a los ovocitos con las mejores cualidades para el cultivo *in vitro* y garantizar el desarrollo hasta blastocisto (Opiela *et al.*, 2008).

2.3.6 Tamaño folicular.

El desarrollo folicular es un proceso clave en donde existe una relación positiva entre el tamaño folicular y el DEIV (Caixeta & Dode, 2010; Catalá *et al.*, 2011; Ghoneimy *et al.*, 2017). Varios estudios han reportado que los ovocitos de folículos grandes poseen mayor capacidad de desarrollo que aquellos obtenidos de folículos pequeños (Caixeta & Dode, 2010; Karami Shabankareh *et al.*, 2014; Labrecque & Sirard, 2014). Se obtuvo el 17.1%, 29.8% y 46.2% de blastocistos de bovino a partir de folículos <2 mm, entre 2 y 6 mm, y >6 mm, respectivamente (Lonergan *et al.*, 1994).

Los ovocitos de bovino provenientes de folículos pequeños (<2-5 mm) poseen menores tasas de MIV, FIV y producción de blastocistos que los ovocitos provenientes de folículos de mayor tamaño (>5 mm) (Gonella *et al.*, 2013). Aunque, los ovocitos de folículos de 2 y 3 mm pueden tener buenos porcentajes de desarrollo embrionario (Camargo *et al.*, 2006) y de blastocisto (Karami Shabankareh *et al.*, 2014), probablemente estos ovocitos provengan de pequeños folículos atrésicos, los cuales tienen la capacidad de dividirse, incluso desarrollar un blastocisto (Muasa *et al.*, 2015). Se menciona que para que el ovocito adquiera su capacidad de desarrollo tiene que pasar por la fase de pre-maduración que normalmente se lleva a cabo durante la

última fase pre-ovulatoria justo antes del pico de LH, similarmente estos cambios suceden durante la atresia folicular (Hendriksen *et al.*, 2004).

Por otra parte, se han reportado que los ovocitos obtenidos de folículos >5 mm poseen mayor cantidad de transcritos de los genes GDF9, Oct4, Ciclina A y SLBP comparados con los ovocitos de folículos <2 mm. El transcrito de SLBP tiene la función de estabilizar, activar y la traducción del ARNm de histonas durante la maduración del ovocito y fertilización (Caixeta & Dode, 2010).

Se ha demostrado que en diferentes tamaños de folículos (<3; 3-5; 5-8 y >8 mm) existe una acumulación gradual de ARNm específicos, importantes para la capacidad de desarrollo del ovocito a medida que se incrementa el tamaño folicular; la mayoría de estos genes fueron relacionados con el ciclo celular (Mourot *et al.*, 2006). Aunque en otro estudio se encontraron muy pocas diferencias en la cantidad de ARNm de H1Foo, H3A, GHR, GDF9, BMP15, OOSP1 a partir de diferentes tamaños de folículos (1.0-3.0, 3.1-6.0, 6.1-8.0 y >8.1 mm), y solo el ARNm H2A aumentó gradualmente en relación al tamaño folicular; esta diferencia fue más evidente en ovocitos de folículos >8.1 mm (Caixeta *et al.*, 2009). Algunos investigadores concluyen que la capacidad de desarrollo depende de unos pequeños cambios cuantitativos de algunos ARNm específicos (Labrecque & Sirard, 2014).

La selección de los ovocitos basados en el tamaño folicular no garantiza el desarrollo de embriones durante un programa de PIVE, debido a que folículos con diámetros idénticos pueden tener diferentes características fisiológicas a partir de un mismo individuo (Sugulle *et al.*, 2008).

2.3.7 Diámetro del ovocito.

El diámetro del ovocito es importante para completar la meiosis y adquirir la capacidad de desarrollo en bovino (Ghoneimy *et al.*, 2017), caprino (Wang *et al.*, 2012) y ovino (Karami-Shabankareh & Mirshamsi, 2012; Ghoneimy *et al.*, 2017).

El tamaño del ovoplasma de bovino está relacionado con el desarrollo folicular. Se reportan diámetros de $31.6 \pm 4.3 \mu\text{m}$, $45.6 \pm 14.0 \mu\text{m}$ y $>110 \mu\text{m}$, obtenidos de folículos primario,

secundario y terciario, respectivamente (Hyttel, 2011). Existe una relación entre el tamaño folicular, diámetro del ovocito y DEIV de bovino (Catalá *et al.*, 2011). El diámetro “crítico” en el que los ovocitos adquieren la capacidad de desarrollo, es de 110-120 μm ; este tamaño corresponde en aquellos ovocitos recuperados de folículos >3 mm (Herradón *et al.*, 2007; Gonella *et al.*, 2013; Muasa *et al.*, 2015); esta afirmación corresponde al hecho de que el ovocito de bovino completa su fase de crecimiento cuando se encuentra en un folículo de 3 mm (Fair *et al.*, 1995; Iwata *et al.*, 2004; Janowski *et al.*, 2012). Asimismo, se han observado ovocitos con baja actividad de G6PDH obtenidos de folículos <3 mm (Muasa *et al.*, 2015); todo lo anterior demuestra que la selección de ovocitos de folículos de 3 mm puede ser esencial para el PIVE de bovino.

Estudios previos han determinado diferentes diámetros del ovoplasma de ovocitos de bovino con relación a su tamaño folicular: se mencionan 122 μm en folículos ≥ 2 mm, (Castaneda *et al.*, 2013); 110 μm en folículos de 3 mm (Muasa *et al.*, 2015); 114.45 μm en folículos de 2 a 4 mm y 117 μm en folículos ≥ 4 mm (Fair *et al.*, 1995).

Los ovocitos con diámetro del ovoplasma entre 110 μm (Castaneda *et al.*, 2013) y 115 μm (Otoi *et al.*, 1997) pueden continuar con la meiosis y alcanzar la MII. Los ovocitos con diámetros de 110, 119 (Pujol *et al.*, 2004) y 135 μm (Armstrong *et al.*, 2001) tienen la capacidad para desarrollarse al estado de blastocisto.

Un factor importante para determinar el diámetro del ovocito de bovino es el método que se elija para calcularlo (Castaneda *et al.*, 2013), se han reportado dos métodos: utilizando un ocular con regla micrométrica, se realiza la medición en forma directa (Pujol *et al.*, 2004; Manjunatha *et al.*, 2007; Karami-Shabankareh & Mirshamsi, 2012) y el otro método es la aplicación de softwares computacionales (Catalá *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Castaneda *et al.*, 2013). Además, hay que considerar otros factores: el número de mediciones a realizar e incluir o excluir la zona pelúcida en los cálculos (Castaneda *et al.*, 2013).

2.3.8 Determinación de la viabilidad de ovocitos.

La determinación de la viabilidad de los ovocitos es otra evaluación esencial antes de la MIV, proporcionando un panorama sobre la calidad de los ovocitos que son utilizados para la PIVE.

El azul de tiazolil ó MTT [3-(4,5-dimetiliazol-2-y1)-2,5- bromuro difeniltetrazolio] (Perks *et al.*, 2003) se ha usado para determinar la viabilidad de ovocitos de porcinos (Fernández *et al.*, 2013), espermatozoides (Iqbal *et al.*, 2010), células de la granulosa en humanos (Perks *et al.*, 2003) y linfocitos (Mosmann, 1983).

La actividad mitocondrial del ovocito puede ser evaluada con azul de tiazolil ó MTT (Perks *et al.*, 2003), un colorante de tetrazolio soluble en agua, que es convertido a un compuesto púrpura insoluble de formazán por el sistema succinato deshidrogenasa de la mitocondria activa, donde se lleva a cabo una fragmentación reductora del anillo de tetrazolio (Mosmann, 1983; Iqbal *et al.*, 2010). Los ovocitos viables presentarán una coloración púrpura y en los ovocitos no viables no se observará esta coloración (Fernández *et al.*, 2013).

2.3.9 Tinción del azul de cresil brillante (BCB).

La búsqueda de una prueba que logre evaluar la calidad del ovocito sin modificar su viabilidad y que además le permita al ovocito continuar con su desarrollo para mejorar la PIVE (Bols *et al.*, 2012) ha sido motivo de varias investigaciones. Dicha prueba debe ser económica, fácil de implementar, que permita evaluar un gran número de COCs, confiable y sobre todo no invasiva (Goovaerts *et al.*, 2010).

En 1993 surge el primer reporte que describe el uso del azul de cresil brillante (BCB: siglas en inglés) para identificar a los mejores ovocitos para la maduración y fertilización *in vitro* de porcino (Bols *et al.*, 2012).

El BCB es un colorante de fenoxazina (Azari-Dolatabad *et al.*, 2016) que tiene como base al ácido gálico que se utiliza para colorantes azules (Beyer & Walter, 1987). El BCB es un compuesto aceptor de electrones (Alm *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2011; Karami-Shabankareh *et*

al., 2012; Karami-Shabankareh *et al.*, 2014) transformando la fenoxazina a un componente sin color, la Leuco-fenoxazina (Azari-Dolatabad *et al.*, 2016).

La intensidad de la tinción de BCB está determinada por la actividad intracelular de la G6PDH, ya sea conservando la tonalidad de color azul o convertirlo a una sustancia incolora (Alm *et al.*, 2005; Bhojwani *et al.*, 2007; Manjunatha *et al.*, 2007; Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2011; Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2012; Mirshamsi *et al.*, 2013; Pawlak *et al.*, 2014; Karami-Shabankareh *et al.*, 2014). Cuando el ovocito completa su fase de crecimiento la actividad de la G6PDH disminuye y por la captación del BCB, el citoplasma del ovocito permanece de color azul (BCB+), por otra parte si el ovocito se encuentra en el periodo de crecimiento, la actividad de la G6PDH es intensa por lo que metaboliza el BCB y consecuentemente se observa un citoplasma incoloro (BCB-) (Goovaerts *et al.*, 2010; Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2011; Karami-Shabankareh & Mirshamsi, 2012; Karami-Shabankareh *et al.*, 2014). Además, la tinción de BCB es considerada como una tinción de viabilidad, debido a sus propiedades en determinar la actividad de la G6PDH (Pujol *et al.*, 2004; Manjunatha *et al.*, 2007; Heleil *et al.*, 2010; Goovaerts *et al.*, 2010; Bols *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2015).

La tinción de BCB es modificada por la G6PDH, pero aún no han quedado muy claras las bases bioquímicas que expliquen a este hecho. Sin embargo, varias interpretaciones han intentado describir la acción de la G6PDH: la enzima reduce directamente el BCB (Pujol *et al.*, 2004; Heleil *et al.*, 2010; Opiela *et al.*, 2010; Catalá *et al.*, 2011; Catalá *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2013; Ashry *et al.*, 2015; Bhardwaj *et al.*, 2016; Rodriguez-Villamil *et al.*, 2016), la G6PDH degrada al BCB (Spikings *et al.*, 2007; Sugulle *et al.*, 2008; Egerszegi *et al.*, 2010; Mota *et al.*, 2010; Kempisty *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2012; Kumar & Malakar, 2013; Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2014; Mohapatra *et al.*, 2015), la G6PDH neutraliza el color azul de la tinción causando que el ovocito no muestre alguna coloración (Duarte *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011), porque el BCB es reducido por el NADPH, un producto de la acción de la G6PDH (Alm *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013; Azari-Dolatabad *et al.*, 2016). De acuerdo a argumentos anteriores, pareciera que tanto la G6PDH y NADPH pueden reducir al BCB debido a las propiedades que posee el colorante de ser un aceptor de electrones.

Se han publicado diversas revisiones bibliográficas que han descrito la utilidad del BCB (Goovaerts *et al.*, 2010; Bols *et al.*, 2012; Opiela & Kątska-Książkiewicz, 2013; Ghoneimy *et al.*, 2017) y sus aplicaciones en bovino, caprino, porcino y ovino (Bols *et al.*, 2012; Opiela & Kątska-Książkiewicz, 2013), así como sus desventajas (Ghoneimy *et al.*, 2017). La concentración de 26 μM de BCB se recomienda para evaluar ovocitos de bovino (Ghanem *et al.*, 2007; Goovaerts *et al.*, 2010; Mota *et al.*, 2010; Opiela *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Janowski *et al.*, 2012; Tabyeh *et al.*, 2012; Fakruzzaman *et al.*, 2013; Karami-Shabankareh *et al.*, 2014; Ashry *et al.*, 2015; Karami-Sabankareh *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2015; Mohapatra *et al.*, 2015; Muasa *et al.*, 2015; Bhardwaj *et al.*, 2016; Rodríguez-Villamil *et al.*, 2016; Ghoneimy *et al.*, 2017), ovino (Catalá *et al.*, 2011; Catalá *et al.*, 2012; Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2012; Karami-Shabankareh & Mirshamsi, 2012; Wang *et al.*, 2012; Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2014; Azari-Dolatabad *et al.*, 2016), caprino (Rodríguez-González *et al.*, 2002; Kumar & Malakar, 2013; Abrazari-Kia *et al.*, 2014), equino (Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2011), canino (Rodrigues *et al.*, 2009), ratón (Yan-Guang *et al.*, 2007; Salimi *et al.*, 2014), rata (Duarte *et al.*, 2011) y humano (Duarte *et al.*, 2013). En cambio, en porcinos se recomienda una concentración de 13 μM (Egerszegi *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2013; Pawlak *et al.*, 2014; Ghoneimy *et al.*, 2017).

Los ovarios recuperados en rastro, representan la mayor fuente disponible de ovocitos inmaduros, pero la calidad de éstos es heterogénea (Bhojwani *et al.*, 2007). La evaluación de la actividad G6PDH por medio de la tinción BCB puede convertirse en una herramienta de gran utilidad para la PIVE (Bhojwani *et al.*, 2007), además no es invasiva, lo que permite continuar con la MIV y FIV después de la selección (Goovaerts *et al.*, 2010).

La identificación de los ovocitos con BCB, ha aumentado la producción de blastocistos con respecto a un control en bovino (Pujol *et al.*, 2004; Alm *et al.*, 2005; Bhojwani *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2012; Mirshamsi *et al.*, 2013; Karami-Shabankarek *et al.*, 2014), y búfalo (Heleil & Fayed, 2010; Mohapatra *et al.*, 2015), además, en animales prepúberes de bovino se observan estos beneficios (Opiela & Kątska-Książkiewicz, 2013). Sin embargo, algunas investigaciones en bovino reportan que no hay diferencia en la formación de blastocisto entre BCB+ con su respectivo control (Mota *et al.*, 2010; Opiela *et al.*, 2010; Fakruzzaman *et al.*, 2013; Opiela & Kątska-Książkiewicz, 2013) (Tabla I).

Tabla I. Porcentaje de blastocistos obtenidos de ovocitos identificados con la tinción BCB en diferentes especies.

Especie	Control %	BCB+ %	BCB- %	Referencia
Vaquilla	5.2	12.3*	1.6	Pujol <i>et al.</i> , 2004
Bovino	19.2	34.1*	3.9	Alm <i>et al.</i> , 2005
Bovino	21.0	39.0*	4.0	Bhojwani <i>et al.</i> , 2007
SCNT				
Bovino	13.2	14.2**	7.6	Opiela <i>et al.</i> , 2008
Bovino	22.7	20.3**	16.2	Opiela <i>et al.</i> , 2010
Bovino	25.0	28.7**	16.4	Mota <i>et al.</i> , 2010
Bovino	28.0	35.0*	10.0	Silva <i>et al.</i> , 2011
Bovino	ND	19.3	7.4	Janowski <i>et al.</i> , 2012
Bovino	28.6	39.0*	12.1	Su <i>et al.</i> , 2012
SCNT				
Bovino	28.2	30.9**	13.0	Fakruzzaman <i>et al.</i> , 2013
Bovino	25.7	35.7*	16.5	Mirshamsi <i>et al.</i> , 2013
Bovino	G: 19.75 M: 19.15 P: 11.23	G: 26.65* M: 25.69* P: 14.76	G: 10.66 M: 13.25 P: 5.84	Karami-Shabankareh <i>et al.</i> , 2014
Búfalo	G: 25.8 M: 21.2 P: 11.2	G: 39.1* M: 35.2* P: 18.3*	G: 12.9 M: 10.8 P: 5.7	Heleil & Fayed, 2010
Búfalo	14.63	43.41	22.74	Mohapatra <i>et al.</i> , 2015
Búfalo	17.22	31.58*	7.73	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2016

*Significa diferencia con respecto al control.

**Significa diferencia con respecto a BCB-.

SCNT: Transferencia nuclear de células somáticas; ND: No determinado.

P: Folículo Pequeño; M: Folículo Mediano; G: Folículo Grande.

2.3.9.1 Tinción BCB en bovino

Existen dos métodos para la obtención de ovocitos de bovino: la aspiración directa del ovocito a partir de folículos visibles de diferentes tamaños y la liberación mecánica del ovocito en un medio por cortes en la superficie del ovario. Estos métodos de obtención pueden ser un factor en la identificación de ovocitos con BCB, debido a que el tamaño folicular determina el grado de crecimiento del ovocito (Salviano *et al.*, 2016). Por lo tanto, se obtienen de 48% a 76% de ovocitos BCB+ recuperados por aspiración de folículos (2 a 8 mm) y 58% en promedio por corte del ovario (Tabla II).

Tabla II. Porcentaje de identificación de ovocitos de bovino con la tinción BCB en relación al método de obtención del ovocito.

Método Obtención	BCB+ %	BCB- %	Referencia
P: 2-6 mm	66.5	33.5	Pujol <i>et al.</i> , 2004
P: ≥ 3 mm	57.2	40.8	Manjunatha <i>et al.</i> , 2007
P: 2-8 mm	70.0	30.0	Opiela <i>et al.</i> , 2008
P: 2-6 mm	71.7	28.3	Sugulle <i>et al.</i> , 2008
P: 3-8 mm	60.4	39.6	Mota <i>et al.</i> , 2010
P: 2-8 mm	48.6	51.4	Koester <i>et al.</i> , 2011
P: 3-8 mm	65.0	35.0	Silva <i>et al.</i> , 2011
P: 3-5 mm	66.2	33.8	Janowski <i>et al.</i> , 2012
P: 3-8 mm	54.3	45.7	Mirshamsi <i>et al.</i> , 2013
P: <3 mm	45.14	54.86	Karami Shabankareh <i>et al.</i> , 2014
3-6 mm	64.56	35.44	
>6 mm	59.30	40.70	
P: 1-3 mm	73.1	26.8	Muasa <i>et al.</i> , 2015
3-6 mm	76.5	23.4	
>6 mm	88.1	11.8	
P: 3-8 mm	67.5	32.5	Salviano <i>et al.</i> , 2016
P:3-8 mm	V: 58.9	41.1	Maia <i>et al.</i> , 2017
	I: 51.1	48.9	
P: 2-8 mm	54.0	46.0	Otero <i>et al.</i> , 2017
P: 2-8 mm	70.8	29.2	Quezada-Casasola <i>et al.</i> , 2018
C	57.9	42.1	Alm <i>et al.</i> , 2003
C	59.4	40.6	Bhojwani <i>et al.</i> , 2007

P: Punción folicular; C: Corte del ovario; V: Verano; I: Invierno.

En el bovino se ha estudiado la eficiencia de la selección con BCB en la MIV y la FIV. La evaluación de la MIV demostró que ovocitos identificados con BCB mostraron mayor porcentaje de MII en ovocitos BCB+ que BCB- (Lekola *et al.*, 2016), alcanzando el 72.5% (Alm *et al.*, 2005), 86.2% (Manjunatha *et al.*, 2007), 65% (Silva *et al.*, 2011), 75% (Su *et al.*, 2012), 73.5% (Otero *et al.*, 2017) y 78% (Maia *et al.*, 2017).

En cuanto a la eficiencia en la fertilización de ovocitos identificados con BCB, se ha mostrado mayor porcentaje en los ovocitos BCB+ comparado con los BCB-, alcanzando el 81.6% vs 55.4% (Manjunatha *et al.*, 2007) y 61.7% vs 41.5% (Mirshamsi *et al.*, 2013).

Los porcentajes de división embrionaria y blastocistos de bovino identificados con el BCB fueron similares independientemente del método de obtención de los ovocitos. El porcentaje de división embrionaria en ovocitos BCB+ obtenidos por punción folicular alcanzó un máximo de 85% y un mínimo de 64%. Por corte del ovario la división embrionaria fue de 78% y 72%, respectivamente. La producción de blastocistos con ovocitos BCB+ obtenidos por punción folicular consiguieron máximos de 39% y mínimos de 1.5%, y por corte de ovarios fueron de 39% y 33%, respectivamente (Tabla III).

Tabla III. Porcentaje de división embrionaria y de blastocistos de ovocitos de bovino identificados por la tinción de BCB en relación al método de obtención del ovocito.

Método de Obtención	BCB+		BCB-		Referencias
	División %	Blastocisto %	División %	Blastocisto %	
P: ≥3 mm	71.2	33.4	52.2	5.2	Manjunatha <i>et al.</i> , 2007
P: 5-8 mm	64.4	18.5	51.3	8.4	Mota <i>et al.</i> , 2010
P: 2-8 mm	74.4	1.5	56.6	8.8	Opiela <i>et al.</i> , 2010
P: 3-8 mm	75.0	35.0	75.0	10.0	Silva <i>et al.</i> , 2011
P: 3-5 mm	65.4	19.3	55.8	7.8	Janowski <i>et al.</i> , 2012
P: 2-8 mm	71.08	39.03	47.84	12	Su <i>et al.</i> , 2012
P: 2-8 mm	79.6	30.9	72.0	13.0	Fakruzzaman <i>et al.</i> , 2013
P: <3 mm	82.93	14.76	39.31	5.84	Karami
3-6mm	83.51	25.69	42.45	13.25	Shabankareh <i>et al.</i> , 2014
>6 mm	85.70	26.65	41.46	10.66	
P: 1-3 mm	72.18	18.94	67.91	9.7	Muasa <i>et al.</i> , 2015
3-6 mm	67.87	19.45	66.66	13.72	
>6 mm	80.64	29.03	-	-	
P: 3-8 mm	68.2	31.1	51.4	10.5	Salviano <i>et al.</i> , 2016
C	72.8	34.1	71.6	3.9	Alm <i>et al.</i> , 2005
C	78	39	51	4	Bhojwani <i>et al.</i> , 2007
C	78.4	33.1	75	12.1	Torner <i>et al.</i> , 2008

P: Punción folicular; C: Corte del ovario.

Se ha demostrado de distintas maneras la eficiencia de la selección de ovocitos BCB+ de bovino comparados con su respectivo control, el hallazgo más importante es el aumento en el desarrollo embrionario y la producción de blastocistos (Pujol *et al.*, 2004; Alm *et al.*, 2005; Bhojwani *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2012; Mirshamsi *et al.*, 2013; Karami-

Shabankareh *et al.*, 2014; Salviano *et al.*, 2016; Rodríguez-Villamil *et al.*, 2016). Además, es mejor la viabilidad de los blastocistos obtenidos a partir de ovocitos BCB+ (Fakruzzaman *et al.*, 2013). Asimismo, con BCB+ aumentó el 10% (Su *et al.*, 2012) y 18% (Bhojwani *et al.*, 2007) de embriones clonados, observándose este aumento de blastocistos también en animales prepúberes (9.2%) (Pujol *et al.*, 2004), pero solo aumentó en un 3% de blastocistos cuando los ovocitos BCB+ fueron vitrificados (Rodríguez-Villamil *et al.*, 2016).

Las investigaciones para determinar las propiedades de ovocitos BCB+ de bovino, revelaron que contienen mayor cantidad de lípidos que los BCB-. Los ácidos grasos son importantes durante la maduración y el desarrollo embrionario (Castaneda *et al.*, 2013), además se ha encontrado mayor cantidad de ARNm relacionada con la capacidad de desarrollo en los ovocitos BCB+ (Ashry *et al.*, 2015). También han encontrado diferencias en el número de células por blastocisto, donde fue mayor en ovocitos BCB+; se considera que el número de células está relacionado con la implantación y el desarrollo fetal (Fakruzzaman *et al.*, 2013).

Estudios realizados en búfalo también revelan los beneficios obtenidos con los ovocitos BCB+, donde aumentan los porcentajes de MII, división embrionaria y blastocisto (Heleil & Fayed, 2010; Bhardwaj *et al.*, 2016), además el número de células por blastocisto fue mayor en ovocitos BCB+ que BCB- (71.15 vs 52.89; 31.58 vs 7.73 y 93.14 vs 71.42) (Bhardwaj *et al.*, 2016), así como también aumentó 28.78% de blastocistos clones con respecto al control (Mohapatra *et al.* 2015).

Sin embargo, algunas investigaciones han cuestionado la eficiencia de la tinción BCB para mejorar los estándares en la PIVE en bovinos (Opiela & Kątska-Książkiewicz, 2013). Existen investigaciones que no encontraron diferencias en las proporciones de MII en ovocitos BCB+ con respecto al control (Alm *et al.*, 2005; Lekola *et al.*, 2016; Maia *et al.*, 2017; Ghoneimy *et al.*, 2017; Otero *et al.*, 2017), e incluso, algunos autores no recomiendan el uso de la selección con la tinción de BCB para mejorar la maduración nuclear de bovino (Alm *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2015; Salviano *et al.*, 2016; Maia *et al.*, 2017; Otero *et al.*, 2017).

Algunos estudios reportan grandes similitudes en el desarrollo embrionario entre los ovocitos BCB+ y su control (Bhojwani *et al.*, 2007; Sugulle *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2011; Fakruzzaman *et al.*, 2013; Karami-Shabankareh *et al.*, 2014; Salviano *et al.*, 2016). Además,

otros afirman que los porcentajes de blastocistos de ovocitos BCB+ no fueron diferentes al control (Opiela *et al.*, 2008; Mota *et al.*, 2010; Opiela *et al.*, 2010; Fakruzzaman *et al.*, 2013, Opiela & Kątska Książkiewicz, 2013). Estos resultados generan cierta duda de la eficiencia de BCB para identificar a los ovocitos con la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro* de Bovino (Karami-Shabankareh *et al.*, 2014; Pawlak *et al.*, 2014).

Se ha sugerido que la tinción de BCB puede provocar cierta toxicidad en los ovocitos, debido al tiempo de incubación que requiere (90 min) (Pawlak *et al.*, 2014). Algunas investigaciones reportan indicios de apoptosis en los ovocitos BCB+ (Opiela *et al.*, 2008; Ghoneimy *et al.*, 2017) y sus respectivas células del cúmulo (Janowski *et al.*, 2012). Además, afirman que disminuye la expresión de genes anti-apoptóticos como Bcl-2 en los ovocitos BCB+ y BCB- después de la MIV (Opiela *et al.*, 2008). Asimismo, en ovocitos madurados de porcinos, se ha observado que la tinción de BCB afecta la función de las mitocondrias, disminuyendo el potencial de membrana y los niveles de ATP (Santos *et al.*, 2013).

Estos efectos secundarios negativos también se han observado en los blastocistos obtenidos de ovocitos BCB+, los cuales mostraron actividad de caspasa-3 (enzima asociada a procesos apoptóticos), pero este efecto no se manifiesta en BCB- y en los controles (Opiela & Kątska Książkiewicz, 2013).

2.3.9.2 Relación entre BCB y el diámetro del ovocito.

Estudios previos han demostrado que los ovocitos BCB+ tienen mayor diámetro que los ovocitos BCB- de bovino (Pujol *et al.*, 2004; Castaneda *et al.*, 2013), búfalo (Manjunatha *et al.*, 2007; Bhardwaj *et al.*, 2016), ovino (Karami-Shabankareh & Mirshamsi, 2012; Wang *et al.*, 2012) y caprino (Rodríguez-González *et al.*, 2002). Similarmente, este efecto se manifestó en animales prepúberes de bovino (Pujol *et al.*, 2004), ovino (Catalá *et al.*, 2011) y caprino (Rodríguez-González *et al.*, 2002). Los ovocitos de mayor diámetro de ovino son obtenidos de folículos >5 mm (Karami-Shabakareh & Mirshamsi, 2012) (Tabla VIII). El diámetro del ovocito es muy importante para continuar con la meiosis y alcanzar la MII (Otoi *et al.*, 1997), así como el desarrollo de blastocisto (Amstrong *et al.*, 2001; Pujol *et al.*, 2004).

Tabla IV. Diámetros de ovocitos identificados con BCB en diferentes especies.

Especie	Donadora	Tamaño Folicular	Zona Pelúcida		BCB+ $\bar{x} \pm DE^1$	BCB- $\bar{x} \pm DE^1$	Referencia
			con	sin			
Bovino	Prepúber	2-6 mm	✓		152±5*	147±5	Pujol <i>et al.</i> , 2004
Búfalo	Adulta	>3 mm	✓		144±4*	136±4	Manjunatha <i>et al.</i> , 2007
Búfalo	Adulta	2-8 mm	✓		145±1*	132±1	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2016
Bovino	Adulta	>2 mm		✓	121±1	120±1	Castaneda <i>et al.</i> , 2013
Ovino	Adulta	2-6 mm	✓		163±3*	159±7	Wang <i>et al.</i> , 2012
Ovino	Adulta	>5 mm	✓		156±7*	153±4	Karami-
		3-5 mm	✓		154±5*	148±6	Shabakareh &
		>3 mm	✓		150±5*	145±5	Mirshamsi, 2012
Ovino	Adulta	Corte Ovárico	✓		147±7*	130±8	Mohammadi-Sangcheshmeh <i>et al.</i> , 2012
Ovino	Prepúber	Corte ovárico		✓	123±2*	106±2	Catalá <i>et al.</i> , 2011
Caprino	Prepúber	Corte ovárico					Rodríguez-
		Grado 1		✓	136±5*	127±9	González <i>et al.</i> ,
		Grado 2		✓	136±5*	128±9	2002
		Grado 3		✓	135±8*	123±10	

¹ Valores en micrómetros, *Significa diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los diámetros BCB+ y BCB-.

2.3.10 Estado de la meiosis.

La evaluación del estado de la cromatina es considerada como una evaluación de la calidad del ovocito (Torner *et al.*, 2008); el estado de la meiosis se relaciona con la capacidad de desarrollo del ovocito en varias especies y la condensación de la cromatina se asocia a la actividad transcripcional (Labrecque & Sirard, 2014).

La VG tiene un papel importante para que el citoplasma del ovocito adquiera su completa capacidad de desarrollo (Fulka *et al.*, 1998; Coticchio *et al.*, 2015), debido a que la cromatina en este estadio está dispersa y descondesada para que la maquinaria transcripcional tenga

acceso a múltiples sitios de transcripción (Coticchio *et al.*, 2015). Los ovocitos de bovino presentan particularmente cuatro estados distintos y progresivos de VG (VG0, VG1, VG2 y VG3); el análisis de estos estadios refleja la dinámica en la transcripción durante la remodelación de la cromatina (Labrecque & Sirard, 2014).

Los aspectos importantes para el establecimiento del desarrollo embrionario después de la fertilización: son el estado apropiado de la cromatina y el ensamblaje de la maquinaria transcripcional. Los cambios en la estructura de la cromatina, juegan un papel importante en la reprogramación de la expresión de los genes durante la activación del genoma embrionario (Torner *et al.*, 2008).

2.4 Técnicas de obtención de ovocitos de bovino.

Los métodos de obtención del ovocito de bovino pueden tener influencia en la calidad de los ovocitos obtenidos (Bols *et al.*, 2012). Generalmente se describen cuatro métodos: laparotomía, laparoscopia, OPU y aspiración directa del folículo a partir de ovarios recuperados en rastro.

La laparotomía ventral o medial para obtención de los ovocitos tiene algunos inconvenientes: requiere anestesia general, la necesidad de un médico veterinario cirujano, ciertas instalaciones, equipo y un operario para su ejecución, además de las complicaciones inherentes a toda cirugía; sin embargo, se sigue utilizando en animales prepúberes de bajo peso y talla que no pueden ser aspirados por OPU (Gonella *et al.*, 2013).

La laparoscopia vía flanco es considerada como una técnica con alto grado de repetibilidad, pero la visualización del ovario suele ser complicada y requiere de personas expertas para realizar la recolección debido al riesgo de presentar adherencias en el sitio de la punción y de peritonitis (Gonella *et al.*, 2013).

La OPU fue desarrollada en la época de los 80s con el fin de recolectar los ovocitos de una manera menos traumática que la cirugía o la laparoscopia. Entre sus principales ventajas, se puede mencionar que es menos invasiva y su aplicación no requiere de estímulo hormonal,

aunque con un tratamiento hormonal se observa un mayor número de folículos, y aumenta la posibilidad de ser utilizada en cualquier momento del ciclo estral, incluso en gestaciones tempranas. Además, es rápida y requiere una anestesia mínima. Actualmente la OPU es la más utilizada para la PIVE de donadoras de alto potencial genético, ya sea con propósitos comerciales o de investigación (Herradón *et al.*, 2007; Bols *et al.*, 2012; Gonella *et al.*, 2013).

La aspiración de los folículos de ovarios recuperados en rastro es el método más comúnmente utilizado en bovino, cuando no se requiere de animales genéticamente privilegiados (Herradón *et al.*, 2007; Heleil *et al.*, 2010; Bols *et al.*, 2012; Gonella *et al.*, 2013), debido a que constituyen una mayor abundancia de ovocitos para la investigación y producción de embriones de forma económica (Gonella *et al.*, 2013). La aspiración se realiza de manera directa de los folículos visibles utilizando una aguja y jeringa. Sin embargo, estos ovarios contienen varios tipos y tamaños de folículos antrales (Sirard, 2011), por lo que este material es extremadamente heterogéneo en términos de calidad y DEIV (Heleil *et al.*, 2010; Gonella *et al.*, 2013; Muasa *et al.*, 2015). Tal diversidad no puede ser benéfica para optimizar programas de PIVE (Sirard, 2011). Por lo que es necesario estandarizar un protocolo de selección de ovocitos para obtener resultados consistentes (Heleil & Fayed, 2010).

La recuperación de los ovarios en rastro puede contribuir a recuperar cierto lote de animales donde se reconoce su mérito genético (recuperación genética “beef from dairy”) (Gonella *et al.*, 2013).

2.5 Producción *in vitro* de embriones de bovino.

Los ovocitos inmaduros obtenidos son sometidos a programas de PIVE para generar embriones y obtener nacimientos con mejor potencial genético (Sagirkaya *et al.*, 2006; López *et al.*, 2007; Gonella *et al.*, 2013). Estos programas dependen en gran medida de la raza, tanto *B. taurus* como en *B. indicus* (Valderrama *et al.*, 2011). Pero también del fin productivo (carne o leche) (Silva *et al.*, 2013). La PIVE se ha implementado principalmente en novillas *B. taurus*, aunque en Brasil utiliza estratégicamente esta biotecnología para mejorar su rebaño de *B. indicus* (Nelore) (Muasa *et al.*, 2015), ya que el DEIV de *B. indicus* es mayor que en *B. taurus*, pero bajo condiciones de trópico (Valderrama *et al.*, 2011; Sales *et al.*, 2015).

Independientemente de la especie de bovino, las ventajas que se obtienen al implementar un programa de PIVE son (Herradón *et al.*, 2007):

- Aumenta el rendimiento de programas para la producción de embriones a partir de hembras con alto valor genético.
- Permite producir embriones a muy bajo costo.
- Recuperación genética de animales sacrificados en rastro (por edad avanzada, infertilidad o enfermedad).
- Permite el aprovechamiento de aquellas hembras con alteraciones estructurales o funcionales del aparato reproductor.
- Facilita la utilización de semen sexado.

La PIVE es una biotecnología que consta de tres técnicas fundamentales: primera, la recuperación del ovocito a partir del ovario y su subsecuente cultivo para su MIV, segunda, la capacitación del espermatozoide y la FIV; y tercera, el cultivo *in vitro* del cigoto para el desarrollo del blastocisto (Lekola *et al.*, 2016; Quezada-Casasola *et al.*, 2018). Estos procesos se llevan a cabo en 24 h, 48 h y 9 días después de la obtención y selección de los ovocitos, respectivamente (Quezada-Casasola, *et al.*, 2018).

2.5.1 Maduración *in vitro*.

La MIV es una etapa decisiva en el rendimiento de la PIVE y junto a la calidad del ovocito tienen un papel importante en la capacidad de desarrollo (Opiela & Kątska-ksiązkiewicz, 2013). La MIV es fundamental para que un ovocito pueda continuar con la meiosis hasta la MII, requisito necesario para ser fertilizado y se desarrolle un embrión. Una vez obtenidos los ovocitos madurados pueden someterse a la FIV o pueden ser almacenados en nitrógeno líquido por medio de la vitrificación para su posterior uso y de esta manera preservar el material genético (Thompson & Gilchrist, 2013).

La maduración nuclear del ovocito bovino requiere un periodo de cultivo de 18 a 22 h y comprende el reinicio de la meiosis desde la profase de la primera división meiótica hasta la MII (segunda división meiótica) (Gonella *et al.*, 2013). De acuerdo a lo anterior, la MIV se define

como la maduración meiótica de COCs inmaduros (VG) para alcanzar el estadio de MII (Thompson & Gilchrist, 2013).

La MIV aumenta los porcentajes de maduración nuclear en especies como el ratón, ovino (Thompson & Gilchrist, 2013) y porcino (López, 2018); en cambio, se obtiene menos del 50% en mono Rhesus y Humano lo que significa que la especie puede ser un factor en el éxito de la MIV (Thompson & Gilchrist, 2013). El 90% de los ovocitos de bovino alcanzan la MII (Mucci *et al.*, 2006), por lo que la tasa de maduración nuclear de ovocitos cultivados *in vitro* puede ser similar a la que se encuentra *in vivo* (Caixeta & Dode, 2010).

Sin embargo, hay que mencionar que existen diferencias en la MIV entre las especies, observándose que en *B. indicus* (Mestizas) se obtiene mayor porcentaje de ovocitos madurados (51.47%) en comparación con *B. taurus* (Mestizas) (39.62%) (Baéz *et al.*, 2010).

La composición de los medios que se utilizan para la MIV de bovino son diferentes, siendo el más común el medio de cultivo de tejidos 199 (TCM-199) con sales de Earle, suplementado con hormonas LH y FSH (Krisher *et al.*, 1999; Gandhi *et al.*, 2000; Herradón *et al.*, 2007; Manjunatha *et al.*, 2007; Heleil & Fayed, 2010; Gonella *et al.*, 2013; Muasa *et al.*, 2015; Bhardwaj *et al.*, 2016). El medio con fluido oviductal sintético (SOF) es otro medio que se puede utilizar para la MIV de ovocitos de bovino, pero no muestra diferencia en el porcentaje de MII comparado con el TCM-199 (Gandhi *et al.*, 2000).

Es frecuente que el medio de MIV se suplemente con una fuente de proteína como suero fetal bovino (SFB) y factores de crecimiento que ayudan para alcanzar una óptima expansión del cúmulo y consecuentemente mejore la maduración del ovocito (Herradón *et al.*, 2007; Gonella *et al.*, 2013).

La composición del suero es compleja, indefinida y variable lo que ocasiona que los resultados en la MIV sean diferentes; similarmente este problema se presenta en las hormonas de origen hipofisarias que presentan variaciones en el grado de pureza. Una posible alternativa es el uso de FSH y LH recombinantes, cuyo grado de pureza es mayor (Herradón *et al.*, 2007).

2.5.2 Fertilización *in vitro*.

En la fecundación *in vitro* existen varios factores que son importantes, pero un paso esencial es la adecuada maduración del ovocito. Además, se menciona que puede haber diferencias de la FIV entre las especies de bovinos, así lo demostraron Baez *et al.* (2010), donde obtuvieron mayor proporción de fertilización evaluada por la presencia de dos pronúcleos (14.28%) en ovocitos con predominancia *B. indicus*, en comparación con *B. taurus* (10.22%).

El espermatozoide para que tenga la capacidad de fecundar a un ovocito tiene que pasar por un proceso llamado capacitación espermática, tal evento se lleva a cabo por dos fases simultáneas: la remoción de factores descapacitantes y estímulos capacitantes presentes en el aparato reproductor de la hembra, los cuales producen modificaciones bioquímicas tales como la desestabilización-fluidez de la membrana plasmática y la hiperactivación espermática. Ambas fases son esenciales para la reacción del acrosoma y la posterior penetración del espermatozoide al ovocito, para ello es importante la presencia de calcio extracelular (Gonella *et al.*, 2013).

Se menciona que algunos glucosaminoglicanos presentes en el aparato reproductor femenino son los responsables de la eliminación de componentes adheridos a la membrana del espermatozoide, alteran la composición lipídica de su membrana, aumentan la permeabilidad de los iones de calcio y el metabolismo. Los glucosaminoglicanos son polímeros lineales constituidos por unidades de disacáridos formados generalmente por un ácido urónico y una hexosamida (Gonella *et al.*, 2013).

El medio de fertilización debe proporcionar un ambiente óptimo para la capacitación espermática y la fecundación. Es fundamental mantener el correcto metabolismo del ovocito y las células del cúmulo, así como la función espermática (Gonella *et al.*, 2013). La revisión bibliográfica que realizaron Wrigth & Bondioli en 1981, describe que desde 1974 se ha estudiado la FIV de bovino con diferentes medios de fertilización (TCM-199, solución de Ringer, fluido folicular, medio Tyrode y medio Ham's F10). Actualmente se utiliza el medio Tyrode suplementado con fuentes energéticas (piruvato y lactato) y albúmina sérica (TALP) (Coy *et al.*, 2002; Alm *et al.*, 2005; Herradón *et al.*, 2007; Bassiouni & Masoud, 2010; Mota *et al.*, 2010; Janowski *et al.*, 2012; Mirshamsi *et al.*, 2013). El medio TALP se suplementa con

penicilamina (20 μ M), hipotaurina (10 μ g) y epinefrina (1 μ g) para estimular la reacción acrosomal (Mota *et al.*, 2010; Gonella *et al.*, 2013; Mirshamsi *et al.*, 2013) y aumentar la eficiencia en la FIV.

El medio amortiguado con Tris modificado (TBMm) frecuentemente es utilizado para la FIV en porcinos, (Park & Niwa, 2009; Egerszegi *et al.*, 2010), pero también puede ser utilizado para bovinos, obteniendo porcentajes de fertilización de 87-98% (Park & Niwa, 2009). Además, el TBMm promueve la monospermia en bovino (80%) en comparación con TALP (40%) (Coy *et al.*, 2002).

La capacitación espermática del bovino mejora por la incorporación de heparina al medio de fertilización (Alm *et al.*, 2005; Herradón *et al.*, 2007; Janowski *et al.*, 2012). La heparina es el glucosaminoglicano más frecuentemente utilizado para capacitar los espermatozoides bovinos (Gonella *et al.*, 2013). La concentración de heparina necesaria para la capacitación espermática varía desde 2 μ g/mL (Gonella *et al.*, 2013) hasta 200 μ g/mL (Alm *et al.*, 2005; Herradón *et al.*, 2007; Janowski *et al.*, 2012). La catecolamina, adrenalina y el aminoácido hipotaurina son sustancias que han sido utilizadas en los medios para realizar el proceso de capacitación *in vitro*, aumentando la motilidad espermática y la penetración del ovocito (Gonella *et al.*, 2013).

Las técnicas más utilizadas para la separación de los espermatozoides vivos de los demás componentes seminales y de los crioprotectores son: *swim up*, gradientes de percoll y lavado espermático. El protocolo de *swim up* consiste en que los espermatozoides vivos son separados de los muertos, plasma seminal y de los componentes diluyentes por motilidad ascendente. En la técnica de Percoll, el semen se centrifuga, pasándolo por diferentes gradientes de concentración, para permitir la separación de los espermatozoides vivos de los demás constituyentes del semen basándose en la diferencia de densidades (Gonella *et al.*, 2013).

Generalmente, el co-cultivo del espermatozoide con el ovocito es realizado por un periodo de 18 y 22 h, a una temperatura de 39 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ (Gonella *et al.*, 2013).

2.5.3 Desarrollo embrionario *in vitro*.

El objetivo de esta técnica es permitir que los ovocitos fertilizados se desarrollen hasta un estadio embrionario en el que se pueda realizar la transferencia a una hembra receptora (Gonella *et al.*, 2013).

Es importante considerar el medio de cultivo embrionario que será utilizado durante el DEIV, el cual proporcionará los nutrientes necesarios durante el periodo de cultivo (Dorado *et al.*, 2006). Los medios de cultivo de embriones tratan de simular los nutrientes presentes desde el oviducto hasta el útero (Dorado *et al.*, 2006): electrólitos, carbohidratos, lípidos, aminoácidos y proteínas (Gonella *et al.*, 2013).

En el bovino se ha evaluado el DEIV usando una variedad de medios de cultivo (Gandhi *et al.*, 2000) cuya composición va desde una solución simple de sales balanceada y carbohidratos; dentro de éstos se tiene al medio Charles Rosenkrans 1 (CR1), SOF y medio optimizado de potasio (Sagirkaya *et al.*, 2006; Herradón *et al.*, 2007; Aguirre *et al.*, 2009), hasta componentes más complejos como TCM-199 suplementado con suero y/o con una monocapa de células somáticas (Sagirkaya *et al.*, 2006).

Los medios de cultivo embrionario pueden ser clasificados dependiendo de su composición en tres sistemas de cultivo: indefinido, semi definido y definido (Camargo *et al.*, 2006; Dorado *et al.*, 2006; Herradón *et al.*, 2007; Gonella *et al.*, 2013).

Sistema Indefinido. Son aquellos medios que son suplementados con SFB que provee de sustancias que beneficia al DEIV, entre las cuales se encuentran: aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento y sustratos energéticos que pueden estimular el desarrollo de los estadios más avanzados (Gonella *et al.*, 2013). Por otra parte, también contiene compuestos tóxicos que inhiben las divisiones iniciales del embrión (Camargo *et al.*, 2006; Gonella *et al.*, 2013). Las propiedades del SFB pueden variar de un lote a otro, lo que puede influir directamente en la producción de embriones (Gardner & Lane, 1998).

Los embriones desarrollados con SFB pueden presentar alteraciones ultraestructurales, aumentan la acumulación de lípidos citoplasmáticos, anormalidades en la expresión génica,

defectos en la compactación y blastulación (Gonella *et al.*, 2013), además estos embriones tienen menor resistencia a la criopreservación (Herradón *et al.*, 2007).

El co-cultivo es otro método del sistema indefinido, comúnmente usado en laboratorios comerciales de Brasil para producir embriones de bovino (Camargo *et al.*, 2006). Las células somáticas ayudan al desarrollo embrionario, debido a que eliminan sustancias tóxicas como metales pesados o hipoxantinas que pueden inducir bloqueo en dos blastómeros (Dorado *et al.*, 2006; Herradón *et al.*, 2007; Gonella *et al.*, 2013), también metabolizan parte del oxígeno evitando la producción de especies reactivas de oxígeno (López *et al.*, 2007; Gonella *et al.*, 2013), secretan compuestos embriotróficos como factores de crecimiento (Camargo *et al.*, 2006; Dorado *et al.*, 2006; Herradón *et al.*, 2007; Gonella *et al.*, 2013), proteínas, carbohidratos y piruvato (López *et al.*, 2007). Sin embargo, el co-cultivo tiene algunas desventajas, ya que las células somáticas pueden ser una fuente de variación en los lotes de producción de embriones, debido a los diferentes tipos de células que se utilizan (Camargo *et al.*, 2006; Gonella *et al.*, 2013).

Sistema semidefinido. En este sistema no se utiliza co-cultivo y el suero es remplazado por la albúmina sérica bovina (BSA: siglas en inglés) (Gonella *et al.*, 2013). La BSA es una de las proteínas más abundantes en el aparato reproductivo de los mamíferos y tiene un papel nutritivo durante el desarrollo embrionario post compactación, también provee de aminoácidos para el metabolismo del embrión (Camargo *et al.*, 2006; Gonella *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que la BSA logra mejores tasas de criopreservación embrionaria comparada con el SFB, sin embargo, la BSA es también un componente biológico sujeto a posible contaminación que puede causar efectos contraproducentes durante la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario (Gonella *et al.*, 2013).

Sistema definido. Es un sistema libre de proteínas, la albúmina es remplazada por macromoléculas tales como alcohol de polivinilo y polivinilpirrolidona (Gardner & Lane, 1998; Camargo *et al.*, 2006; Gonella *et al.*, 2013). La ventaja del sistema es que elimina los factores desfavorables del suero, co-cultivo y albúmina en los embriones producidos *in vitro*. Este sistema logra un mejor control de las condiciones de cultivo, facilitando los estudios enfocados a evaluar los requerimientos en el cultivo embrionario, sin embargo, es menor la producción

de blastocistos que en sistemas semidefinidos (Camargo *et al.*, 2006; Gonella *et al.*, 2013). Es por ello, que aún es limitado para su uso comercial (Gonella *et al.*, 2013).

La fuente de energía es esencial en los diferentes sistemas de cultivo. El metabolismo del embrión durante los primeros estadios, justo antes de la activación del genoma embrionario (8 a 16 blastómeros), utiliza preferentemente piruvato, lactato y glutamina (Gardner & Lane, 1998; Camargo *et al.*, 2006; Mucci *et al.*, 2006; Gonella *et al.*, 2013; Graf *et al.*, 2014), pero aumenta considerablemente la utilización de la glucosa en los estadios más avanzados del desarrollo embrionario (Mucci *et al.*, 2006).

La falta del metabolismo de la glucosa durante los primeros estadios del embrión estaría dada por la baja actividad de la enzima fosfofructocinasa, que estimula la glucólisis catalizando la fructosa-6-fosfato para formar fructosa 1-6 bifosfato. Durante los estadios iniciales del desarrollo embrionario existen suficientes concentraciones de ATP-ADP, ejerciendo un control directo sobre la actividad de la enzima fosfofructocinasa (Mucci *et al.*, 2006) y de esta manera regular el metabolismo de la glucosa.

Al iniciar el cultivo embrionario del bovino si se utiliza un medio con elevadas concentraciones de glucosa, además de no ser metabolizada por el embrión, produce un efecto inhibitorio sobre el desarrollo embrionario (Camargo *et al.*, 2006; Mucci *et al.*, 2006; Gonella *et al.*, 2013). Los estadios iniciales del desarrollo son inhibidos por concentraciones de glucosa >3 mM (Gandhi *et al.*, 2000), debido a que la glucosa inhibe la cadena respiratoria (Takahashi & First, 1992) y la fosforilación oxidativa (Camargo *et al.*, 2006), causando un déficit en la producción de ATP (Takahashi & First, 1992).

Los embriones bovinos después de la activación embrionaria (8 a 16 blastómeros) (Graf *et al.*, 2014) aumentan la demanda de energía para la compactación y la formación del blastocele, disminuyen las concentraciones de ATP-ADP y con ello, la inhibición de la fosfofructocinasa, dando lugar un aumento de la glucólisis y el consumo de glucosa en la masa celular interna (Tsuji *et al.*, 2001; Mucci *et al.*, 2006). Es recomendable aumentar la concentración de glucosa (5 mM) después del cuarto día de cultivo para el desarrollo del blastocisto (Gandhi *et al.*, 2000).

Los aminoácidos en los medios de cultivo son importantes para el desarrollo embrionario, debido a que proporcionan energía (Camargo *et al.*, 2006; Mucci *et al.*, 2006; Gonella *et al.*, 2013), actúan como amortiguadores intracelulares (Gardner & Lane, 1998) y son esenciales para la síntesis de proteínas (Takahashi & First, 1992; Mucci *et al.*, 2006; Gonella *et al.*, 2013). La alanina, glutamato, glutamina, glicina, prolina y serina son más abundantes en el oviducto de bovino (Takahashi & First, 1992; Gardner & Lane, 1998). Los aminoácidos no esenciales favorecen el desarrollo en estadios de 2 y 4 blastómeros, mientras que los aminoácidos esenciales estimulan el desarrollo de embriones de 8 blastómeros (Mucci *et al.*, 2006).

Algunos autores sugieren que los medios con aminoácidos, debe ser remplazado cada tres días, debido al metabolismo de los aminoácidos aumenta las concentraciones de amonio (Gandhi *et al.*, 2000; Gonella *et al.*, 2013). Sin embargo, también se ha observado que no se afecta el desarrollo embrionario si no es remplazado el medio de cultivo, incluso se puede obtener embriones de mejor calidad (Rodríguez *et al.*, 2017).

3 JUSTIFICACIÓN

3.1 Planteamiento del problema

Las razas de *B. taurus* como Holstein, Jersey y Pardo Suizo son las mayores productoras de leche por lactancia (Ríos *et al.*, 2015). Por ello, esta especie es importante para México, debido a que poco más de la mitad de la producción nacional de leche es obtenida de ganado *B. taurus* (Villamar & Olivera, 2005). Esta es una especie económicamente importante debido a que se obtiene mayor producción de carne y leche comparada con *B. indicus* (Arce Recinos *et al.*, 2017).

Los ovocitos de *B. taurus* obtenidos a partir de ovarios recuperados en rastro, constituyen una importante fuente de material biológico para la PIVE con fines de investigación y producción embrionaria (Gonella *et al.*, 2013). Aunque los ovarios que son obtenidos por esta vía tienen varios tipos y tamaños de folículos antrales (Sirard, 2011), la calidad de los ovocitos es heterogénea (Heleil *et al.*, 2010; Gonella *et al.*, 2013; Muasa *et al.*, 2015), siendo necesario el establecimiento de un protocolo de selección de ovocitos *B. taurus* para obtener resultados consistentes (Heleil & Fayed, 2010).

La tinción BCB identifica a los ovocitos con la capacidad de desarrollar blastocistos en varias especies incluyendo al bovino (Pujol *et al.*, 2004; Alm *et al.*, 2005; Bhojwani *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2012; Mirshamsi *et al.*, 2013; Karami-Shabankarek *et al.*, 2014). Sin embargo, la tinción de BCB en el bovino ha tenido resultados contradictorios (Opiela *et al.*, 2008; Mota *et al.*, 2010; Opiela *et al.*, 2010; Fakruzzaman *et al.*, 2013; Opiela & Kańska Książkiewicz, 2013). Es probable que la especie puede tener una participación importante en estos resultados, debido a que es un factor clave en la calidad de los ovocitos y en el DEIV (Valderrama *et al.*, 2011; Sales *et al.*, 2015). Algunos estudios no especifican la especie y la raza de bovino que utilizaron (Janowski *et al.*, 2012; Mirshamsi *et al.*, 2013; Karami-Shabankareh *et al.*, 2014). Por consiguiente, es necesario un estudio que determine los parámetros de calidad del ovocito de *B. taurus*, específicamente de la raza Holstein identificados con la tinción de BCB, evaluando la viabilidad, estado de la meiosis, diámetro del ovocito, tamaño folicular, desarrollo embrionario y la producción de blastocistos.

3.2 Preguntas de investigación

- ¿Los ovocitos BCB+ de Holstein serán de mayor diámetro que los ovocitos BCB-?
- ¿Los ovocitos BCB+ de Holstein se encontrarán en vesícula germinal y serán viables antes de someterlos a la MIV?
- ¿Una mayoría de ovocitos BCB+ de Holstein llegarán a la MII y estarán viables después de la FIV?
- ¿Los ovocitos BCB+ de folículos grandes de Holstein se desarrollarán en mayor proporción al estado de blastocisto que aquellos BCB+ de folículos pequeños?

4 HIPÓTESIS GENERAL

La tinción con BCB identificará a los ovocitos de Holstein con las condiciones adecuadas (mayor diámetro, viabilidad, estado de la meiosis) para la maduración nuclear y citoplasmática, aumentando la eficiencia en el desarrollo embrionario de ovocitos de folículos de mayor tamaño.

4.1 Hipótesis específicas.

1. Los ovocitos BCB+ de Holstein se encontrarán viables y en vesícula germinal antes de la MIV.
2. Los ovocitos de BCB+ de Holstein tendrán una correlación con el diámetro de los ovocitos y tamaño folicular.
3. Los ovocitos BCB+ de folículos grandes de Holstein permanecerán viables después de la FIV, lo que permitirá un mejor desarrollo embrionario.

5 OBJETIVO GENERAL

Determinar la viabilidad, estado de la meiosis y diámetro de ovocitos de Holstein identificados con BCB y su relación en la MIV, FIV y DEIV a partir de folículos de dos tamaños diferentes.

5.1 Objetivos específicos.

- Evaluar la viabilidad y el estado de la meiosis antes de la MIV de ovocitos Holstein identificados con la tinción de BCB a partir de dos tamaños de folículos.
- Determinar el diámetro de los ovocitos Holstein identificados con la tinción BCB a partir de dos tamaños de folículos.
- Evaluar la viabilidad y el estado de la meiosis después de la FIV de ovocitos Holstein identificados con la tinción de BCB a partir de dos tamaños de folículos.
- Evaluar el desarrollo embrionario y formación de blastocistos de ovocitos Holstein identificados con la tinción de BCB a partir de dos tamaños de folículos.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

Los ovarios de *B. taurus*, específicamente de la raza Holstein, fueron obtenidos en un rastro ubicado en el municipio de Temamatla, Estado de México. El semen congelado fue de un semental Holstein comercial (Semex®, México). A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos utilizados fueron Marca Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Las condiciones de incubación en todos los procesos fueron de 38.5 °C con una atmósfera de 5% de CO₂, 95% aire y humedad a saturación.

6.1 Obtención de los ovocitos de Holstein.

Los ovarios de Holstein fueron transportados en una solución de 0.157 M NaCl a 37 °C con antibióticos (7.5 UI/mL ampicilina, 7.5 µg/mL estreptomicina y 0.015 µg/mL anfotericina) (Pichardo *et al.*, 2016). Los folículos fueron medidos con un vernier y clasificados en pequeños (FP: 2-4.9 mm) y grandes (FG: 5-10 mm). El líquido folicular fue aspirado con una aguja de calibre 18 y una jeringa de 10 mL, que contenía 1 mL de medio de Tyrode modificado (Anexo I), suplementado con 10 mM de lactato de sodio, 0.50 mM HEPES y 0.01% de alcohol polivinílico (TL-HEPES-PVA) con pH de 7.3-7.4 (Krisher *et al.*, 1999; Pichardo *et al.*, 2016).

6.2 Tinción BCB

Los COCs de los dos tamaños de folículos fueron expuestos individualmente a la tinción de BCB (B-5388 Sigma) diluido en solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco modificado (DPBSm) a una concentración 26 µM y suplementado con 0.4% de BSA, durante 90 min en incubación. Los COCs se clasificaron de acuerdo a la coloración del citoplasma: con coloración azul (BCB+) y sin coloración (BCB-) (Figura 3) (Janowski *et al.*, 2012). El grupo control se mantuvo en DPBSm el mismo tiempo que la tinción BCB.

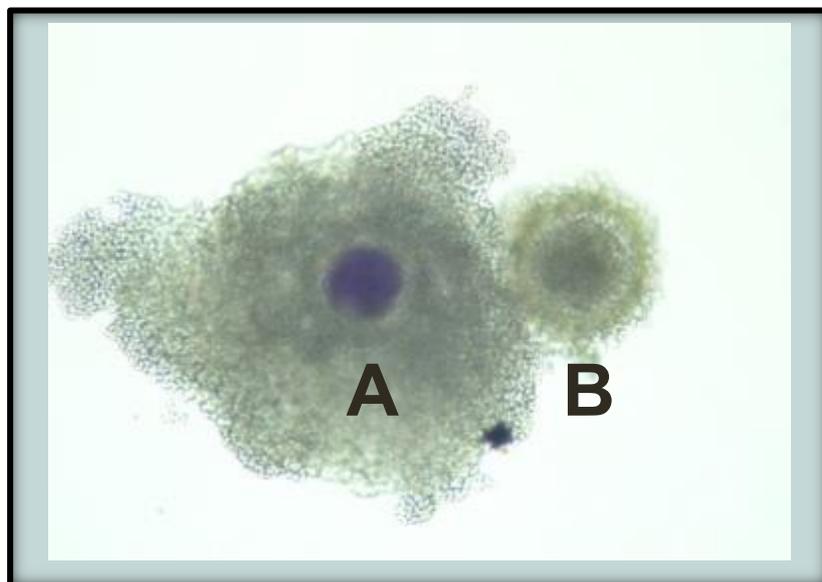


Figura 3. Ovocitos: A) BCB+; B) BCB-. 200a

6.3 Diámetro de los ovocitos.

Para determinar el diámetro de los ovocitos identificados con BCB fue necesario retirar las células del cúmulo. Cada ovocito fue fotografiado mediante una cámara Nikon (COOLPIX S4), y todas las medidas se obtuvieron con el programa de procesamiento de imágenes ImageJ (Figura 4) (Castaneda *et al.*, 2013) tomando en cuenta el centro y dos ejes perpendiculares; la zona pelúcida fue incluida en las mediciones.

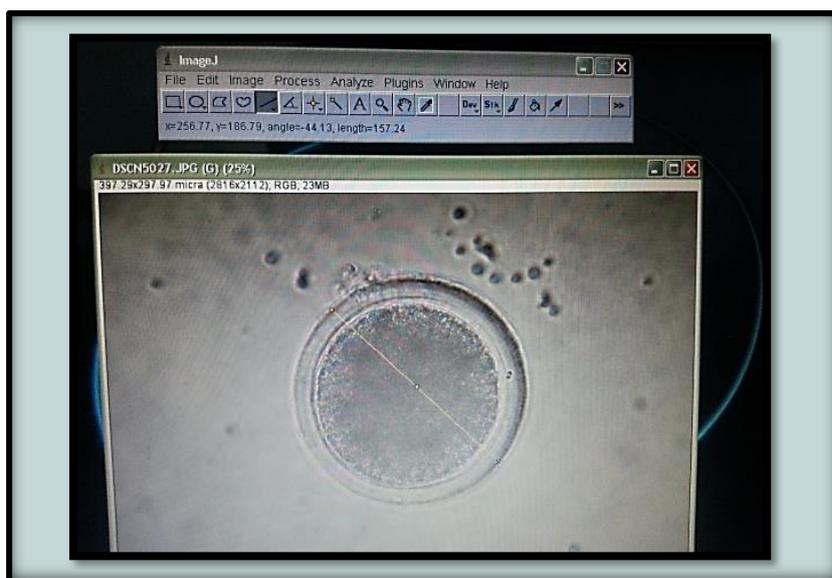


Figura 4. Programa ImageJ para determinar el diámetro del ovocito.

6.4 Maduración *in vitro* de ovocitos BCB+, BCB- y control.

Los ovocitos BCB+, BCB- y control fueron lavados tres veces en 500 μ L de medio de maduración (In Vitro, México) compuesto por TCM-199 suplementado (Anexo II) (Pichardo *et al.*, 2016). Los ovocitos fueron madurados en 45 μ L de medio de maduración (1 ovocito/10 μ L) con 10% de SFB y 0.075 UI/mL de gonadotropina menopáusica humana (Su *et al.*, 2012), incubados en las condiciones previamente descritas durante 24 h (Torner *et al.*, 2008).

6.5 Capacitación espermática.

El semen descongelado fue diluido 1:3 con medio TBMm (Anexo III) (Park & Niwa, 2009) y centrifugado a 500 X g por 7 min (Alm *et al.*, 2005).

El pellet fue suspendido en 1 mL TBMm suplementado con 8 mg/mL de BSA e incubado por 1 h utilizando la técnica de *swim up*; se recuperó el sobrenadante (0.5 mL) y se diluyó con TBMm para obtener una concentración de 5×10^6 espermatozoides/mL.

6.6 Fertilización *in vitro* de ovocitos BCB+, BCB- y control.

Las células del cúmulo se retiraron parcialmente de los ovocitos BCB+, BCB- y control después de la MIV y fueron transferidos al medio de fertilización (45 μ L; 10 ovocitos) compuesto por el medio de Tyrode con 6 mg/mL de BSA, lactato y piruvato (TALP) (Opiela *et al.*, 2010). Los ovocitos fueron incubados con 5×10^6 espermatozoides/mL (Sugulle *et al.*, 2008) durante 21 h (Opiela *et al.*, 2010).

6.7 Desarrollo embrionario *in vitro* BCB+, BCB- y control.

A los cigotos BCB+, BCB- y control se les retiraron de forma mecánica las células del cúmulo y fueron cultivados en co-cultivo con células de la granulosa y medios SOF1-SOF2 (In vitro, México) por 168 h (Gandhi *et al.*, 2000). Al inicio del cultivo se utilizó SOF1 (50 μ L) por 48 h y SOF2 (50 μ L) para las restantes 120 h. Los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de SFB (Gandhi *et al.*, 2000). La división embrionaria fue evaluada a las 72 h de incubación tomando en cuenta embriones de 2, 4, 8 blastómeros y mórulas. La producción de blastocistos fue evaluada a las 168 h (Figura 5). El porcentaje de blastocistos fue calculado del total de embriones divididos por cada grupo.

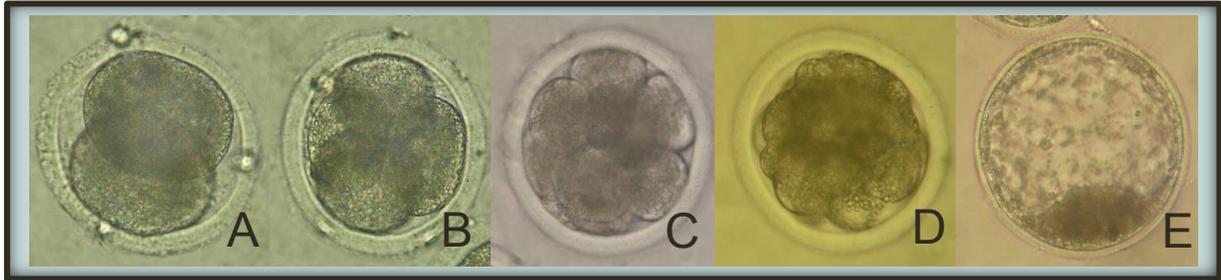
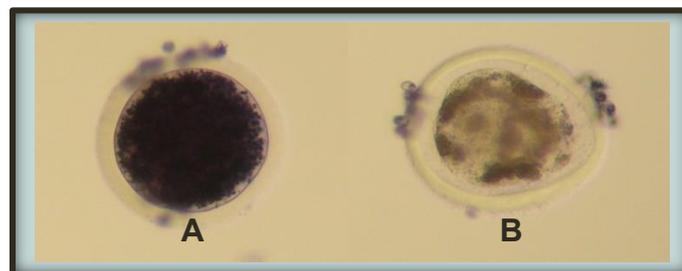


Figura 5. Desarrollo embrionario de bovino: **A)** Embrión de 2 blastómeros; **B)** Embrión de 4 blastómeros; **C)** Embrión de 8 blastómeros; **D)** Mórula; **E)** Blastocisto. 400a

6.8 Evaluación de la viabilidad y estado de la meiosis.

Para estas evaluaciones se utilizó una doble tinción (MTT/bisbenzimidida); con la primera se determinó la viabilidad de los ovocitos incubándolos con MTT (0.5 mg/mL) por 2 h. Se consideró como viable a aquel ovocito con citoplasma de color violeta y no viable sin coloración (Figura 6) (Fernández *et al.*, 2013). Los porcentajes de viabilidad se calcularon a partir del número de ovocitos analizados.

La segunda tinción fue para evaluar el estado de la meiosis utilizando la bisbenzimidida (40 µg/mL) diluida en PBS por 45 min. Para la evaluación se consideraron los estadios de Vesícula Germinal (VG): cromatina dispersa; Metafase I (MI): cromatina compacta; Metafase II (MII): cromatina compacta con cuerpo polar; y Fertilizado (F): presencia de dos pronúcleos y cuerpos polares (Figura 7) (Heleil & Fayed, 2010). Las observaciones se realizaron en el microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600) a 400X. Los porcentajes de VG, MI, MII y F fueron calculados a partir del número de ovocitos analizados. Los ovocitos en MII + F fueron considerados como madurados.



Tinción de MTT: **A)** Ovocito viable; **B)** Ovocito no viable. 400a.

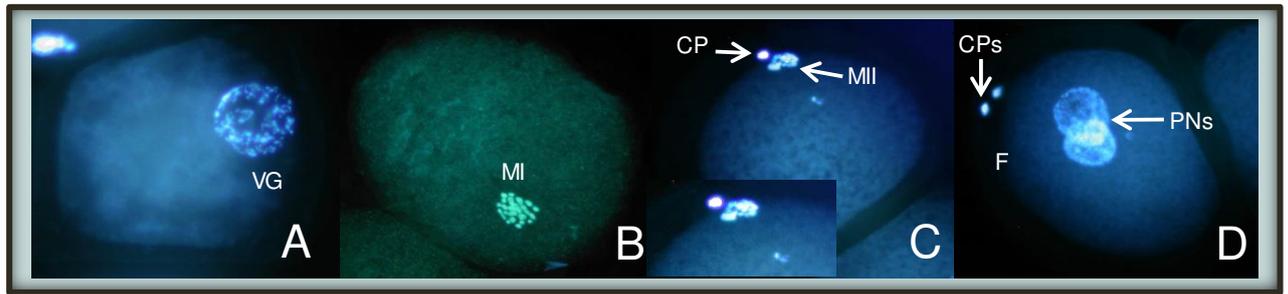


Figura 7. Estados de la meiosis: **A)** Vesícula Germinal (VG); **B)** Metafase I (MI); **C)** Madurado: Metafase II (MII) y Cuerpo Polar (CP); **D)** Fertilizado (F): Dos Pronúcleos (PNs) y con dos cuerpos polares (CPs). 400a

6.9 Análisis estadístico.

Para comparar los porcentajes de los ovocitos identificados con la tinción de BCB, viabilidad, estado de la meiosis, desarrollo embrionario y la producción de blastocistos de ambos tamaños de folículos, se utilizó una prueba de comparaciones múltiples de Duncan (Wong, 2010) y fueron analizados usando Number Cruncher Statistical Software (NCSS¹¹). Los diámetros de los ovocitos seleccionados con BCB fueron analizados con la prueba de *t* de Student (Daniel & Cross, 2013). Se consideró un valor de significancia de $P < 0.05$.

6.10 Diseño Experimental.

Se llevaron a cabo cuatro experimentos independientes para determinar la viabilidad, estado de la meiosis, diámetro del ovocito, MIV, FIV y DEIV de ovocitos de Holstein identificados con BCB a partir de folículos pequeños (FP; 2-4.9 mm) y grandes (FG; 5-10 mm) con sus respectivos controles.

Experimento 1. Determinación del diámetro de ovocitos de Holstein identificados con BCB.

Las medidas de los diámetros de ovocitos identificados con BCB fueron obtenidos en 463 ovocitos (4 réplicas) de los cuales 322 corresponden a FP y 141 ovocitos a FG.

Experimento 2. Evaluación de la viabilidad de ovocitos de Holstein identificados con BCB antes de la MIV y después de la FIV.

Se evaluaron con MTT 406 ovocitos teñidos con BCB (4 réplicas) antes de la MIV: 263 y 143 de FP y FG, respectivamente. En el grupo control fueron evaluados 166 ovocitos (4 réplicas): 96 y 70 de FP y FG, respectivamente. Después de la FIV se evaluaron con MTT 389 ovocitos teñidos con BCB (6 réplicas): 275 y 114 ovocitos de FP y FG, respectivamente. En el control se evaluaron 138 ovocitos (6 réplicas): 103 y 35 de FP y FG, respectivamente.

Experimento 3. Evaluación del estado de la meiosis de ovocitos de Holstein identificados con BCB antes de la MIV y después de la FIV.

Se evaluaron con bisbenzimidida 388 ovocitos teñidos con BCB (4 réplicas) antes de la MIV: 248 y 140 de FP y FG, respectivamente. En el control 160 ovocitos fueron evaluados con bisbenzimidida (4 réplicas): 92 y 68 de FP y FG, respectivamente. Después de la FIV se evaluaron con bisbenzimidida 343 ovocitos teñidos con BCB (6 réplicas): 244 y 99 ovocitos de FP y FG, respectivamente. En el control se evaluaron 128 ovocitos que fueron teñidos con bisbenzimidida (6 réplicas): 97 y 31 ovocitos de FP y FG, respectivamente.

Experimento 4. Evaluación del desarrollo embrionario y formación de blastocistos de ovocitos de Holstein identificados con BCB.

Se cultivaron 262 ovocitos teñidos con BCB para evaluar el desarrollo embrionario (4 réplicas): 193 y 69 de FP y FG, respectivamente. Para el control se cultivaron 161 ovocitos (4 réplicas): 87 y 74 de FP y FG, respectivamente.

7 RESULTADOS

En el presente estudio 1,520 ovocitos de Holstein se tiñeron con BCB, el 69% fueron obtenidos de FP (n=1,053) y el 31% de FG (n=467). Para los grupos controles se utilizaron 475 y 278 ovocitos de FP y FG, respectivamente.

7.1 Tinción BCB

Los ovocitos de Holstein identificados por la tinción BCB mostraron un mayor porcentaje de ovocitos BCB+ en FG en comparación con FP ($P<0.05$). También se observó un mayor porcentaje de ovocitos BCB- en FP ($P<0.05$) (Tabla IX).

Tabla V. Ovocitos de Holstein identificados por la tinción BCB en dos tamaños de folículos.

Tamaño Folículo	Total n	Grupo	n (%±DE)
Pequeño	1053	BCB+	221(21±17) ^a
		BCB-	832(79±19) ^b
Grande	467	BCB+	220(47±18) ^c
		BCB-	247(53±21) ^c

n: número de ovocitos analizados.

Los porcentajes fueron calculados a partir de los ovocitos analizados.

Diferente Literal en columna significa diferencia significativa entre BCB+ y BCB- ($P<0.05$).

7.2 Diámetros de los ovocitos de Holstein identificados por la tinción BCB.

Los diámetros de los ovocitos fueron similares en los grupos BCB+ y BCB- de FP y FG ($P>0.05$) (Tabla X).

Tabla VI. Diámetro de ovocitos BCB+ y BCB- de dos tamaños de folículos de Holstein.

Tamaño Folículo	Total n	Grupo	n($\bar{X}\pm DE$) [*]
Pequeño	322	BCB+	61(154±7)
		BCB-	261(151±7)
Grande	141	BCB+	61(153±5)
		BCB-	80(150±6)

^{*}Valores en micrómetros.

n: número de ovocitos analizados.

$\bar{X}\pm DE$: Media aritmética y desviación estándar.

El diámetro en los grupos de estudio no mostraron diferencia significativa entre BCB+ y BCB- ($P>0.05$).

7.3 Viabilidad antes de la MIV y después de la FIV de ovocitos de Holstein identificados con la tinción BCB.

La viabilidad antes de la MIV entre los grupos BCB+, BCB- y control de ambos tamaños de folículos, no mostró diferencias ($P>0.05$). Además, después de la fertilización no se observaron diferencias entre los grupos ($P>0.05$). La comparación entre los resultados de viabilidad antes de la MIV y después de la FIV fueron similares ($P>0.05$). (Tabla XI).

Tabla VII. Viabilidad antes de la MIV y después de la FIV de ovocitos BCB+ y BCB- de dos tamaños de folículos de Holstein.

Tamaño Folículo	Grupo	Antes MIV		Después FIV	
		n	Viables n(%±DE)	n	Viables n(%±DE)
Pequeño	Control	96	92(95±9)	103	97(94±11)
	BCB+	50	44(88±11)	53	45(85±15)
	BCB-	213	204(96±4)	222	199(89±11)
Grande	Control	70	68(97±4)	35	31(88±13)
	BCB+	71	70(98±4)	61	54(88±13)
	BCB-	72	70(97±3)	53	45(85±21)

n: número de ovocitos analizados.

Los porcentajes fueron calculados a partir del número de ovocitos analizados.

Estos resultados no mostraron diferencia significativa entre BCB+, BCB- y control ($P>0.05$)

7.4 Estado de la meiosis antes de la MIV y después de la FIV de ovocitos de Holstein identificados con la tinción BCB.

Los porcentajes de ovocitos en los estadios de VG y MI antes de la MIV fueron similares entre los grupos BCB+, BCB- y control de ambos tamaños de folículos ($P>0.05$).

El grupo control de FP mostró mayor porcentaje de MI comparadas con los ovocitos BCB+ y BCB- ($P<0.05$) después de la FIV. Todos los grupos de FG fueron similares en las proporciones de MI ($P>0.05$). Los porcentajes de ovocitos madurados (MII+F) de FP, fueron

significativamente mayores en los grupos BCB+ y BCB- comparados con el control ($P<0.05$), sin embargo, fueron similares en todos los grupos de FG ($P>0.05$)

Los porcentajes de fertilización fueron mayores en BCB+ de FP comparados con los grupos BCB- y control ($P<0.05$). Sin embargo, la proporción de fertilización fue mayor en BCB- de FG comparado con los grupos de BCB+ y control ($P<0.05$) (Tabla XII).

7.5 Desarrollo embrionario y blastocisto de ovocitos de Holstein identificados con BCB.

El desarrollo embrionario de los grupos BCB+ y control de FP no mostró diferencia ($P>0.05$), pero ambos grupos fue mayor el desarrollo que en el grupo BCB- ($P<0.05$). Por otro lado, en todos los grupos de FG fue similar ($P>0.05$) (Tabla XIII).

La producción de blastocistos fue mayor en el grupo BCB+ de FP comparado con los BCB- y control ($P<0.05$). El desarrollo de blastocistos de FG fue similar entre los grupos BCB+, BCB- y control ($P>0.05$) (Tabla XIII).

Tabla VIII. Estado de la meiosis antes MIV y después FIV de ovocitos viables de Holstein identificados como de folículos.

Tamaño Folículo	Grupo	Antes MIV n(%±DE)			Después FIV n(%±DE)			
		n	VG	MI	n	MI	MII	F
Pequeño	Control	92	53(58±12)	39(42±12)	97	21(21±19) ^a	25(25±16) ^a	51(53)
	BCB+	44	28(64±22)	16(36±22)	45	4(9±6) ^b	6(13±0) ^b	35(78)
	BCB-	204	134(66±10)	70(34±10)	199	28(14±14) ^b	57(28±17) ^a	114(57)
Grande	Control	68	44(65±15)	24(35±15)	31	3(10) ^b	7(22±8) ^a	21(68)
	BCB+	70	42(60±10)	28(40±5)	54	7(13±10) ^b	13(24±23) ^a	34(63)
	BCB-	70	42(60±20)	28(40±20)	45	5(11±8) ^b	8(18±8) ^a	32(71)

n: número de ovocitos analizados. Estado de la meiosis: Vesícula Germinal (VG), Metafase I (MI), Metafase II (MII) y F fueron identificados por la presencia del pronúcleo femenino y masculino.

*Los ovocitos MII+F en conjunto, fueron considerados como madurados.

Los porcentajes fueron calculados en base a los ovocitos analizados.

Diferente literal en columna significa diferencia significativa entre BCB+, BCB- y control ($P<0.05$).

Tabla IX. División embrionaria y desarrollo de blastocistos de ovocitos identificados con BCB en dos tamaños de folículos.

Tamaño Folículo	Grupo	n	División n(%±DE)	Blastocisto n(%±DE)
Pequeño	Control	87	50(57±6) ^a	8(16±1) ^a
	BCB+	57	35(61±20) ^a	7(26±21) ^b
	BCB-	136	73(54±15) ^b	9(12±4) ^a
Grande	Control	74	47(64±19) ^a	7(24±15) ^b
	BCB+	27	17(63±21) ^a	3(21±11) ^b
	BCB-	42	32(76±13) ^a	5(25±12) ^b

n: número de ovocitos analizados.

Diferente Literal en columna significa diferencia entre BCB+, BCB- y control ($P<0.05$).

8 DISCUSIÓN

Las tecnologías reproductivas son importantes para el desarrollo de la industria ganadera, especialmente en *B. taurus* (Muasa *et al.*, 2015) del que se obtiene mayor producción de carne y leche comparada con *B. indicus* (Arce Recinos *et al.*, 2017). En México, el ganado *B. taurus* aporta el 50.6% de la producción de leche (Villamar & Olivera, 2005), de ahí la importancia en el país de la presencia de la raza Holstein porque produce mayor cantidad de leche por lactancia (Mohamed *et al.*, 2017).

La tinción BCB se ha utilizado en varias especies incluyendo al bovino, para identificar a los ovocitos maduros y así obtener una mayor producción de blastocistos (Pujol *et al.*, 2004; Alm *et al.*, 2005; Bhojwani *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2012; Mirshamsi *et al.*, 2013; Karami-Shabankarek *et al.*, 2014). Aunque en la mayoría de los estudios no se especifican la especie o la raza de bovino que utilizaron para la investigación (Alm *et al.*, 2005; Bhojwani *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011; Janowski *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2012; Mirshamsi *et al.*, 2013; Karami-Shabankareh *et al.*, 2014; Salviano *et al.*, 2016; Maia *et al.*, 2017; Quezada-Casasola *et al.*, 2018), lo que dificulta elucidar conclusiones definitivas acerca de la eficiencia de la tinción BCB en bovino.

El genotipo es un factor importante para la PIVE de bovino, porque existen diferencias en la fisiología reproductiva entre *B. taurus* y *B. indicus* (Sales *et al.*, 2015). Un menor número de folículos se desarrolla por onda durante el reclutamiento folicular en *B. taurus* (Motta *et al.*, 2011), lo que significa que en esta especie se recupera un menor número de ovocitos (Sales *et al.*, 2015). Además, la calidad de los ovocitos es mejor en *B. indicus* que *B. taurus* durante el verano (Camargo *et al.*, 2006). Los ovocitos de razas lecheras desarrollan en menor proporción al estado de blastocisto que aquellos ovocitos de razas cárnicas (Camargo *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2013). Por lo tanto, estas características deben de tomarse en cuenta cuando se evalúa la capacidad de desarrollo de los ovocitos (Muasa *et al.*, 2015), incluso si los ovocitos fueron identificados con la tinción BCB.

Se ha cuestionado la eficiencia de la tinción BCB en bovino, debido a que los porcentajes de blastocistos de BCB+ no fueron mejores que los obtenidos en su respectivo control (Opiela *et al.*, 2008; Mota *et al.*, 2010; Opiela *et al.*, 2010; Opiela & Kańska Książkiewicz, 2013; Fakruzzaman *et al.*, 2013). Evaluar los parámetros de calidad del ovocito de Holstein identificados con BCB, tales como el diámetro, estado de la meiosis y viabilidad, pueden ayudar a aclarar la discusión sobre la eficiencia de la tinción para la MIV, FIV, DEIV y producción de blastocistos.

8.1 Tinción BCB.

Las investigaciones previas de la tinción con BCB realizadas en bovino, mostraron que son mayores los porcentajes de BCB+ que BCB-, independientemente del método de obtención del ovocito, ya sea por aspiración o por corte del ovario (Alm *et al.*, 2003; Bhojwani *et al.*, 2007; Muasa *et al.*, 2015; Koester *et al.*, 2011; Otero *et al.*, 2017; Quezada-Casasola *et al.*, 2018). En el presente estudio se obtuvo mayor número de ovocitos de Holstein provenientes de FP, pero sólo el 21% fueron BCB+; es posible que estos ovocitos puedan tener la capacidad de desarrollo suficiente para alcanzar el estado de blastocisto. Los ovocitos de folículos de 2-3 mm pueden tener buen desarrollo embrionario (Camargo *et al.*, 2006), además de producir blastocistos (Karami Shabankareh *et al.*, 2014); es probable que estos ovocitos provengan de pequeños folículos atrésicos, los cuales tienen la capacidad de desarrollo suficiente para dividirse, incluso desarrollar un blastocisto (Muasa *et al.*, 2015), debido a que los procesos de pre-maduración donde se adquiere la capacidad de desarrollo son muy similares a los

procesos que se llevan a cabo durante la atresia folicular (Hendriksen *et al.*, 2004). De acuerdo a lo anterior se puede justificar la presencia de BCB+ de FP. Por otro lado, los porcentajes de BCB- de FP fueron más altos, esto sugiere que los ovocitos continúan en su fase de crecimiento (Iwata *et al.*, 2004) y que puede ser una característica esperada de los ovocitos de FP.

Una característica que ha sido reportada anteriormente y se observó en el presente estudio fue la menor disponibilidad de FG de la raza Holstein, lo que se sugiere que este efecto es consecuencia de la raza (Calderón *et al.*, 2000; Valencia *et al.*, 2017) y la especie (Colazo & Mapletoft, 2014). Esta afirmación se basa en que el número de folículos que se desarrollan durante cada ciclo en *B. taurus* (Angus y Holstein) es menor que en *B. indicus* (Brahman, Nelore y Gyr) (Colazo & Mapletoft, 2014; Valencia *et al.*, 2017). En el presente estudio, las proporciones de ovocitos BCB+ y BCB- fueron similares de FG, aunque se observó mayor porcentaje de ovocitos BCB+ en comparación con lo observado en BCB+ de FP. Está claro que el crecimiento folicular es esencial para la maduración final del ovocito (Iwata *et al.*, 2004), donde los folículos de mayor tamaño tienen mejor capacidad de desarrollo (Karami-Shabankareh *et al.*, 2014).

Es necesario considerar que la calidad de los ovocitos expresada en aquellos BCB+, puede estar influenciada por otros factores que son consecuencia de los ovocitos recuperados de ovarios obtenidos de rastro, ya que el desconocimiento del estado nutricional y la baja condición corporal de las donadoras, puede influir en la capacidad de desarrollo del ovocito *in vivo* (Sales *et al.*, 2015; Maia *et al.*, 2017); también la edad es desconocida, las vacas adultas (13-16 años) disminuyen su fertilidad en comparación con las jóvenes (3-6 años) (Labrecque & Sirard, 2014).

8.2 Diámetros de los ovocitos de Holstein identificados por la tinción de BCB.

El diámetro del ovocito es considerado como un indicador de la calidad del ovocito, debido a que existe una relación entre el diámetro del ovocito y el desarrollo de blastocistos en bovino, caprino, ovino, búfalo y porcino (Pujol *et al.*, 2004; Heleil *et al.*, 2010). El tamaño del ovocito es importante para completar la meiosis y adquirir la capacidad de desarrollo de bovinos (Wang

et al., 2012). El diámetro “crítico” del ovoplasma de bovino para adquirir la capacidad de desarrollo es de 110-120 μm , este diámetro corresponde de ovocitos obtenidos de folículos >3 mm (Herradón *et al.*, 2007; Gonella *et al.*, 2013; Muasa *et al.*, 2015).

La tinción BCB puede identificar a los ovocitos de mayor tamaño (Rodríguez-González *et al.*, 2002; Pujol *et al.*, 2004; Karami-Shabankareh & Mirshamsi 2012), entonces los ovocitos BCB+ tienen un diámetro mayor que los BCB- de bovino (Pujol *et al.*, 2004; Castaneda *et al.*, 2013) y búfalo (Manjunatha *et al.*, 2007; Bhardwaj *et al.*, 2016).

Sin embargo, los diámetros de los ovocitos BCB+ y BCB- de Holstein obtenidos en el presente estudio fueron similares en ambos tamaños de folículos. Similarmente, Castaneda *et al.* (2013) obtuvieron los mismos resultados, pero con ovocitos de folículos >2 mm. Está claro que el ovocito bovino no aumenta su diámetro en relación al desarrollo folicular y completa su periodo de crecimiento en el folículo de 3 mm (Fair *et al.*, 1995; Iwata *et al.*, 2004; Janowski *et al.*, 2012), además se reporta una baja actividad de G6PDH de ovocitos obtenidos de folículos <3 mm (Muasa *et al.*, 2015). Considerando estos argumentos y en base a los resultados obtenidos, el diámetro del ovocito de bovino como parámetro de calidad no puede ser tomado como método confiable para predecir la capacidad de desarrollo.

8.3 Viabilidad antes de la MIV y después de la FIV de ovocitos de Holstein identificados con BCB.

La viabilidad es otro parámetro esencial para proporcionar un panorama sobre la calidad de los ovocitos identificados con BCB. En el presente estudio, la viabilidad de ovocitos BCB+, BCB- y control de ambos tamaños de folículos fue similar antes de la MIV y después de la FIV. Algunos estudios han considerado que el BCB puede ser utilizado como una tinción de viabilidad, debido a sus propiedades para determinar la actividad de la G6PDH y no ser invasiva (Pujol *et al.*, 2004; Manjunatha *et al.*, 2007; Goovaerts *et al.*, 2010; Heleil *et al.*, 2010; Bols *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2015).

8.4 Estado de la meiosis antes de la MIV y después de la FIV de ovocitos de Holstein identificados con BCB.

El estado de la cromatina antes de la MIV está relacionado con la capacidad de desarrollo (Labrecque *et al.*, 2014) y es considerada como una evaluación de la calidad del ovocito (Torner *et al.* 2008). El estado de VG fue similar en los ovocitos BCB+, BCB- y control de ambos tamaños de folículos. Está claro que la VG tiene un papel importante, ya que en este estadio la cromatina está dispersa y descondesada, lo que permite que la maquinaria transcripcional tenga acceso a múltiples sitios de transcripción (Coticchio *et al.*, 2015) y de esta manera adquirir la capacidad de desarrollo (Fulka *et al.*, 1998; Coticchio *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos concuerdan con un estudio realizado en búfalo, donde los porcentajes de VG fueron similares en ovocitos BCB+, BCB- y control de tres tamaños de folículos (Heleil & Fayed, 2010). Sin embargo, se menciona que en BCB- (81%) es mayor la presencia de VG que en BCB+ de bovino (68%) (Torner *et al.*, 2008).

En el presente estudio los porcentajes de ovocitos en MI de los grupos BCB+, BCB- y control fueron similares en ambos tamaños de folículos. Los ovocitos que completaron la fase de crecimiento tienen la habilidad de formar la placa metafásica (Sirard *et al.*, 2006; Hyttel *et al.*, 2011) y en el caso particular del bovino puede llevarse a cabo en ovocitos recuperados a partir de folículos de 3 mm, tamaño en que el ovocito completó su crecimiento (Iwata *et al.*, 2004; Janowski *et al.*, 2012). Otro factor que puede explicar la presencia de ovocitos en MI, sucede que los ovocitos cuando son extraídos de los folículos pueden continuar espontáneamente con la meiosis (Sirard *et al.*, 2006; Mare, 2011), debido a la eliminación de factores inhibitorios presentes en el líquido folicular (Sirard *et al.*, 2006; Mare, 2011).

El punto final de la maduración *in vivo* es la liberación de un ovocito madurado (MII), con capacidad de llevar a cabo el desarrollo embrionario normal (Fulka *et al.*, 1998). Los porcentajes de MIV entre especies pueden ser diferentes, los ovocitos de predominancia fenotípica *B. indicus* alcanzan el estado de MII en mayor proporción que los obtenidos de predominancia fenotípica *B. taurus* (Báez *et al.*, 2010). Sin embargo, en el presente estudio aumentó el porcentaje de maduración de ovocitos BCB+ de Holstein del FP con respecto al control. Por lo que la tinción de BCB identifica a los ovocitos de Holstein con mayor capacidad para alcanzar la MII de FP. Interesantemente, los ovocitos de FG de Holstein no mostraron un

aumento en la proporción de MII en ninguno de los grupos (BCB+, BCB- y control). Los ovocitos de FG al estar más desarrollados que los FP, pueden iniciar la maduración nuclear con mayor facilidad, independientemente de la fase de crecimiento del ovocito, debido a la maduración espontánea (Sirard *et al.*, 2006; Mare, 2011).

También se observó en el presente estudio que la proporción de ovocitos maduros de BCB+ no aumento con respecto a su contraparte BCB- de ambos tamaños de folículos. Estos resultados respaldan la afirmación, que la selección por BCB no es eficiente herramienta para aumentar las proporciones de MII de bovino (Alm *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2015).

De acuerdo a lo observado, y a lo reportado por otras investigaciones, no se recomienda el uso de la selección con la tinción de BCB para mejorar la maduración nuclear de bovino (Alm *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2015; Salviano *et al.*, 2016; Maia *et al.*, 2017; Otero *et al.*, 2017), debido a que los porcentajes de MII y su respectivo control fueron muy similares (Alm *et al.*, 2005; Lekola *et al.*, 2016; Ghoneimy *et al.*, 2017; Maia *et al.*, 2017; Otero *et al.*, 2017).

Por otro lado, la fertilización obtenida de ovocitos Holstein identificados con la tinción de BCB fue contradictoria, debido a que las proporciones de fertilización fueron mayores en dos grupos: BCB+ (78%) de FP y BCB- (71%) de FG. Es posible que estos últimos contengan ovocitos más competentes, debido a que provienen de folículos subordinados, donde estos fueron seleccionados naturalmente para la atresia y manifiestan cambios muy similares a los que se llevan a cabo durante la fase pre-ovulatoria como un pico de progesterona y andrógenos por la actividad de la aromatasa y un descenso en el mantenimiento del ovocito por parte de las células de la granulosa (Sirard, 2011). Además, se menciona que los ovocitos BCB- de bovino están mejor sincronizados en la maduración citoplasmática que los BCB+ (Pawlak *et al.*, 2014).

Sin embargo, los porcentajes de fertilización de ovocitos BCB+ son mejores que los BCB- de bovino (Mirshamsi *et al.*, 2013) y Búfalo (Manjunatha *et al.*, 2007). Además, la especie es un factor que puede influir en los porcentajes de FIV, siendo que en ovocitos de predominancia fenotípica *B. taurus* se observa menor proporción de dos pronúcleos que en ovocitos de predominancia fenotípica *B. indicus* (Báez *et al.*, 2010).

8.5 Desarrollo embrionario y producción de blastocisto de ovocitos identificados con BCB.

Los programas de PIVE bovinos dependen en gran medida de la especie (*B. taurus* o *B. indicus*) (Valderrama *et al.*, 2011), la raza (Satrapa *et al.*, 2011) y el fin productivo, donde se obtiene mejor DEIV con las razas cárnicas que las razas lecheras (Fischer *et al.*, 2000; Kadarmideen *et al.*, 2015). El DEIV de *B. indicus* es mejor bajo condiciones de trópico (Sales *et al.*, 2015), además es mayor el número de embriones producidos por sesión de OPU utilizando semen sexado (XX) en *B. indicus* (Gyr) que *B. taurus* (Holstein) (Pontes *et al.*, 2010).

El clima influye de manera directa el DEIV de la especie y raza del bovino. En las zonas tropicales es mejor el DEIV de razas resistentes al estrés calórico (Brahman), en comparación de razas que no son resistentes como Holstein y Angus (Satrapa *et al.*, 2011). Los ovocitos de la raza Brahman (*B. indicus*) poseen genes termo-tolerantes con la capacidad de resistir las condiciones ambientales del trópico y pueden desarrollar mayor cantidad de embriones (Báez *et al.*, 2010; Valderrama *et al.*, 2011). Asimismo, se menciona que el espermatozoide (*B. indicus*) puede transmitir la capacidad termo-tolerante a los embriones producidos *in vitro* (Báez *et al.*, 2010).

Está claro que *B. taurus*, presenta una menor eficiencia de la PIVE, ante elevadas temperaturas (Bó *et al.*, 2003), debido a que los ovocitos de esta especie muestran menor resistencia al estrés (Sales *et al.*, 2015). En un estudio llevado a cabo con ovocitos Holstein sometidos a estrés calórico, se mostró una menor proporción de fertilización y baja capacidad de desarrollo (Camargo *et al.*, 2007). La producción de blastocistos de *B. taurus* se mejora en la época de frío y clima templado (Rocha *et al.*, 1998; Bó *et al.*, 2003; Valderrama *et al.*, 2011), así lo demostraron Valderrama *et al.* (2011); en una región con clima habitual de 14º C, donde obtuvieron mayor proporción de blastocisto en *B. taurus* (probablemente de la raza Holstein) que *B. indicus*.

Los porcentajes de desarrollo embrionario de ovocitos BCB+ son similares independientemente del método de obtención del ovocito. En el presente estudio, los ovocitos BCB+ y el control de FP mostraron mayor desarrollo embrionario en comparación con los BCB-. Por lo tanto, la tinción de BCB identifica a los ovocitos Holstein de folículos de 2.0-4.9 mm

con gran capacidad de desarrollo. Es frecuente que los ovocitos de mayor capacidad de desarrollo se encuentren en folículos de mayor tamaño, pero algunos de folículos pequeños (2-4 mm) pueden tener la capacidad suficiente para dividirse después de la fertilización (Blondin & Sirard, 1995); esto concuerda con lo reportado por Muasa *et al.* (2015) quienes observaron en la raza Boran (*B. indicus*) que los ovocitos BCB+ de folículos pequeños (1-3 mm) mostraron baja actividad de la G6PDH y fueron competentes para el DEIV. Ellos mencionan que posiblemente algunos folículos pequeños estaban en un proceso atrésico por lo que presentaban una baja actividad de la G6PDH (Muasa *et al.*, 2015), se ha demostrado que los COCs de *B. taurus* (probablemente de la raza Holstein) con signos de atresia temprana determinada por su aspecto morfológico (leve expansión de las células del cúmulo periféricas y citoplasma granulado), parece tener similar o mayor capacidad de desarrollo que los considerados morfológicamente normales (Blondin & Sirard, 1995; de Wit *et al.*, 2000; Vélez *et al.*, 2017). Los procesos de pre-maduración para adquirir la capacidad de desarrollo del ovocito que normalmente se lleva a cabo durante la última fase pre-ovulatoria, también suceden durante la atresia folicular, es por ello que los folículos morfológicamente atrésicos tienen COCs con cumulus compactos y oscuros, pero estos ovocitos desarrollan más blastocistos que aquellos COCs con cumulus compactos y brillantes provenientes de folículos no atrésicos (Hendriksen *et al.*, 2004). Además, los porcentajes de división y blastocisto fueron mejores en ovocitos con citoplasma granular (signos de atresia temprana) en comparación con ovocitos con citoplasma homogéneo (Blondin & Sirard, 1995; Vélez *et al.*, 2017). Puede ser que durante los procesos de la atresia temprana algunos genes se expresan y almacenan biomoléculas que son necesarias para el desarrollo embrionario, lo que los hace más competentes en comparación con los ovocitos no atrésicos que son idóneos para la PIVE (Vélez *et al.*, 2017).

En investigaciones previas donde han relacionado la atresia con la capacidad de desarrollo de los ovocitos (Blondin & Sirard, 1995; de Wit *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009; Vélez *et al.*, 2017) se menciona que la atresia “temprana” no interfiere en el DEIV como se pensaba con anterioridad (Blondin & Sirard, 1995). Los folículos terciarios atrésicos conservan sus funciones, secretando cantidades considerables de hormonas esteroideas (Blondin & Sirard, 1995), sin embargo la degeneración del folículo causa un descenso gradual de las concentraciones de testosterona y 17β -estradiol, aumenta los niveles de progesterona por la disminución de la actividad de aromatasa y desmolasa, estos cambios son similares a las modificaciones que se llevan a

cabo después del pico de LH y puede por lo tanto, influenciar en la capacidad de desarrollo de los ovocitos inmaduros (de Wit *et al.*, 2000). Además, se menciona que los ovocitos con signos de atresia temprana muestran mayor capacidad de desarrollo, estos ovocitos muestran mayor expresión del gen MASTER, relacionado con la capacidad de desarrollo (Vélez *et al.*, 2017). Por otra parte, se comenta que los COCs atrésicos pueden reanudar la meiosis, siendo uno de los puntos críticos para la PIVE (de Wit *et al.*, 2000).

Por otro lado, la división embrionaria de FG fue similar en los ovocitos BCB+, BCB- y control. La tinción de BCB no identifica a los ovocitos de Holstein con mayor capacidad de desarrollo a partir de folículos >5 mm, se ha demostrado que los porcentajes de desarrollo embrionario de *B. taurus* fueron similares entre BCB+ y el control (Fakruzzaman *et al.*, 2013). Además, se mencionan que los ovocitos BCB+ de folículos >6 mm no aumentan el desarrollo embrionario en comparación con su respectivo control (Karami-Shabankareh *et al.*, 2014).

Existe controversia en cuanto al uso de la BCB, ya que mientras algunos reportes afirman un aumento en el desarrollo embrionario de BCB+ con respecto al control (Pujol *et al.*, 2004; Mirshamsi *et al.*, 2013), otros estudios reportan resultados similares en el desarrollo embrionario entre los ovocitos BCB+ y su control (Bhojwani *et al.*, 2007; Sugulle *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2012; Fakruzzaman *et al.*, 2013; Karami-Shabankareh *et al.*, 2014; Salviano *et al.*, 2016). Es probable que estas variaciones en los resultados sea consecuencia de aspectos de tipo biológico, consecuentemente provocan variaciones en el DEIV, tales como la especie (Ghoneimy *et al.*, 2017) raza (Quispe *et al.*, 2015), estado nutricional (Valderrama *et al.*, 2011; Quispe *et al.*, 2015), edad (Quezada-Casasola *et al.*, 2018) y las condiciones ambientales (Valderrama *et al.*, 2011).

El proceso DEIV tiene como finalidad que los ovocitos fertilizados *in vitro* se desarrollen hasta el estado de blastocisto y realizar la transferencia a una receptora (Gonella *et al.*, 2013). Pero existen varios factores que influyen en la producción de blastocistos como la especie y raza de la donadora (Fischer *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2013) y el fin productivo: carne (Hereford) y leche (Holstein) (Fischer *et al.*, 2000; Kadarmideen *et al.*, 2015). En un estudio llevado a cabo por 17 años de un centro de PIVE de bovino, se demostró que se obtiene mayor cantidad de blastocistos de *B. indicus* (Gyr) por sesión de OPU que de *B. taurus* (Holstein) (Pontes *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2017). Además, los ovocitos de ganado de carne (Hereford: Fischer *et*

al., 2000; Senepol: Watanabe *et al.*, 2017) tienen mayor eficiencia para desarrollar el estado de blastocisto que aquellos provenientes de vacas lecheras (Holstein: Fischer *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2017).

Está claro que el clima es otro factor importante en la producción de blastocisto en relación a la especie de bovino, es mejor la producción de blastocisto de *B. taurus* en climas fríos y templados en comparación con clima caluroso (Rocha *et al.*, 1998; Bó *et al.*, 2003; Valderrama *et al.*, 2011). Contrariamente a este suceso, obtuvieron mejor proporción de blastocistos de *B. indicus* en climas calurosos y tropicales que en climas templados (Bó *et al.*, 2003; Satrapa *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2017).

En el presente estudio, la producción de blastocistos Holstein fue mayor en los ovocitos BCB+ (26%) que en los BCB- (12%) de FP, además esta proporción de blastocistos de FP fue similar a aquellos ovocitos BCB+ (21%) de FG. Estos resultados coinciden con lo reportado por Muasa *et al.* (2015) utilizando la raza Boran (*B. indicus*), quienes obtuvieron similar cantidad de blastocistos de folículos de 1-3 mm y >3-6 mm. Previamente, Blondin & Sirard (1995), han indicado que los ovocitos de folículos de 2-4 mm tiene similar capacidad de desarrollo que aquellos obtenidos de folículos mayores a 4 mm. Es posible el desarrollo del blastocisto a partir de un ovocito de folículo pequeño (3 mm), debido a que no está influenciado por un folículo dominante; la proporción de ovocitos que desarrollaron blastocistos fue mayor en ausencia (44.8%) que en presencia de un folículo dominante (36%) (Hendriksen *et al.*, 2004).

Por otra parte, la producción de blastocistos de BCB+ y BCB- de FG fue similar en el presente estudio. Independientemente de la tinción, los ovocitos de FG fueron seleccionados naturalmente durante el reclutamiento folicular por factores endocrinos y paracrinós (Maldonado *et al.*, 1997; Sirard *et al.*, 2011; Silva & Figueiredo, 2016), siendo posible que estos ovocitos puedan expresar algunos genes y almacenamiento de algunas biomoléculas que proporcionen la capacidad de desarrollo (Vélez *et al.*, 2017); estas características pueden ser la causa de una proporción similar de la producción de blastocisto de BCB+ y BCB- de FG encontrada en el presente estudio.

Por otra parte, se han obtenido resultados diferentes a lo observado en la presente investigación, donde aseguran que aumenta la producción de blastocistos de bovino en

ovocitos BCB+ recuperados de folículos medianos (25.69%) y grandes (26.65%) comparados con los pequeños (14.76%) (la especie y raza son desconocidos) (Karami-Shabankareh *et al.*, 2014). Similarmente han encontrado que los BCB+ de folículos mayores a 6 mm tienen mejores proporciones de blastocistos comparados con BCB+ de folículos 1-3 mm, pero utilizando la raza Boran (*B. indicus*) (Muasa *et al.*, 2015). Sin embargo, este efecto no se observó en el presente estudio utilizando ovocitos de Holstein, donde los porcentajes de blastocistos fueron similares en ovocitos BCB+ de ambos tamaños de folículos. Es probable que la especie y la raza sea un factor importante en la eficiencia de la tinción de BCB para identificar al ovocito con la capacidad de desarrollo, aunque algunos investigadores han concluido que independientemente de la especie, los ovocitos de FG tienen mayor capacidad de desarrollo que los FP (Lonergan *et al.*, 1994; Karami-Shabankareh *et al.*, 2014).

La principal ventaja de la tinción BCB en bovino, es la identificación de los ovocitos para aumentar la producción de blastocistos comparados con un control (Pujol *et al.*, 2004; Alm *et al.*, 2005; Bhojwani *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2012; Mirshamsi *et al.*, 2013; Rodríguez-Villamil *et al.*, 2016). Sin embargo, los resultados en bovino han sido controversiales (Opiela *et al.*, 2013) y mencionan que la producción de blastocistos de BCB+ es similar al control (Opiela *et al.*, 2008; Opiela *et al.*, 2010; Opiela & Kątska Książkiewicz, 2013; Fakruzzaman *et al.*, 2013). Pero, en estos estudios no hacen mención de factores que pueden influir la producción de blastocisto. Está claro que la especie, la raza (Camargo *et al.*, 2007; Valderrama *et al.*, 2011) y el estado nutricional (Ghoneimy *et al.*, 2017) pueden ser algunas causas que influyen en la producción de blastocisto.

Los ovocitos obtenidos y utilizados para esta investigación fueron de ovarios de rastro, siendo una manera económica y de mayor abundancia de ovocitos para la investigación y producción de embriones (Gonella *et al.*, 2013). Pero estos ovarios contienen varios tipos y tamaños de folículos antrales (Sirard, 2011), consecuentemente los ovocitos son extremadamente heterogéneos en términos de calidad y DEIV (Gonella *et al.*, 2013; Muasa *et al.*, 2015). Desafortunadamente tal diversidad no puede ser benéfica para optimizar programas de PIVE (Sirard, 2011).

Por otro lado, se ha analizado las propiedades de los ovocitos BCB+ y hacen mención que la capacidad de desarrollo del ovocito no tiene asociación con la actividad de G6PDH

(Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2014), sino que en otras características como las concentraciones de lípidos. La capacidad de desarrollo puede tener relación con la cantidad de lípidos presentes en el citoplasma y la actividad mitocondrial (Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2014), observándose que los ovocitos BCB+ contienen más lípidos citoplasmáticos que los BCB-. Estos estudios se han llevado a cabo en bovinos (Castaneda *et al.*, 2013) y ovinos (Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2014), sugiriendo que puede ser la explicación del papel de los lípidos citoplasmáticos en la adquisición de la capacidad de desarrollo del ovocito (Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2014). Los lípidos almacenados pueden ser la fuente de energía durante la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario temprano, ya que las concentraciones de triglicéridos y colesterol en los ovocitos de bovino disminuyen progresivamente durante la MIV, FIV y DEIV (Castaneda *et al.*, 2013).

En otros estudios han relacionado la especie con el número de gotas de lípidos presentes en el citoplasma del ovocito, resultando que existen en mayor cantidad ovocitos con predominancia fenotípica *B. taurus* y cruza (*B. taurus* X *B. indicus*) en comparación con vacas fenotípicamente *B. indicus* (Ordoñez *et al.*, 2014).

Diversos factores afectan las concentraciones de lípidos citoplasmáticos en bovino, incluyendo la dieta, condición corporal, edad (novillas ó vacas adultas) y lactación, que pueden influir en el contenido de lípidos del líquido folicular y las diferentes células del ovario, incluyendo al ovocito (Dunning *et al.*, 2014).

9 CONCLUSIONES

La eficiencia de la PIVE de bovino está determinada por numerosos factores, la especie, raza, el fin productivo, edad, condición corporal (nutrición) y las condiciones ambientales, que deben de ser considerados en la implementación de los programas de desarrollo embrionario *in vitro*.

La evaluación de la calidad del ovocito es fundamental para el éxito de los protocolos de PIVE de bovino, tomando en cuenta el tamaño folicular, diámetro del ovocito, estado de la meiosis, viabilidad, grado de crecimiento, así como la eficiencia durante la MIV, FIV, DEIV y la producción de blastocisto.

Las evaluaciones realizadas en los ovocitos de Holstein recuperados en rastro identificados con la tinción de BCB para aumentar la producción de blastocistos permitió varias conclusiones:

- La tinción identificó mayor cantidad de ovocitos BCB+ del FG, observándose una gran proporción de ovocitos BCB- en ambos tamaños de folículos.
- La viabilidad no fue alterada antes de la MIV y después de la FIV de los ovocitos BCB+ de ambos tamaños de folículos. Por lo tanto, los ovocitos BCB+ de Holstein poseen la posibilidad para continuar la MIV, FIV y el DEIV.
- En cuanto al estado de la meiosis, no se observaron cambios en la presencia de vesícula germinal antes de la MIV en los ovocitos BCB+ de ambos tamaños de folículos.
- Los diámetros de los ovocitos BCB+ y BCB- de ambos tamaños de folículos fueron similares, por lo que el diámetro de ovocitos de Holstein identificados con BCB no puede ser considerado como una evaluación de la calidad del ovocito.
- La evaluación de la cromatina reflejó que después de la FIV, los ovocitos BCB+ de FP obtuvieron mayor porcentaje tanto de ovocitos en MII como fertilizados. Por lo tanto, la tinción de BCB identifica a los ovocitos Holstein de folículos de 2-4.9 mm con mayor capacidad para los procesos de MIV y FIV.

De esta manera, en los ovocitos BCB+ de FP produjeron un mayor porcentaje de desarrollo embrionario y producción de blastocistos, por lo tanto, la tinción de BCB identifica a los ovocitos de Holstein con mayor capacidad de desarrollo para aumentar las proporciones de blastocistos. Esta información tiene gran valor para los centros de producción de embriones *in vitro* de bovino que desean aumentar la eficiencia en la producción de blastocistos de ganado lechero específicamente de la raza Holstein.

10 IMPLICACIONES

- Identificación del ovocito de folículo pequeño con las mejores cualidades para aumentar la fertilización *in vitro* desarrollo embrionario *in vitro* y la producción de blastocisto.
- Reduce el tiempo para la obtención de un ovocito con suficiente capacidad para el desarrollo embrionario.
- Reduce el tiempo generacional.

11 PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ovocitos BCB+ de FP, se pueden sugerir algunas propuestas para futuras investigaciones sobre la tinción de BCB en ganado bovino.

- A través de la OPU Identificar ovocitos de FP de ganado Holstein y verificar su eficiencia para aumentar el desarrollo de blastocisto.
- A través de la OPU Identificar ovocitos de FP de ganado Gyr y comparar la eficiencia para aumentar el desarrollo de blastocisto en comparación con ganado Holstein.
- Bajo las mismas condiciones del presente estudio verificar la eficiencia de ovocitos BCB+ de FP para aumentar el desarrollo de blastocistos, pero utilizando diferente raza lechera de *B taurus*.

12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrazari-Kia, A., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Mohammadabadí, M., Adegani, F., Veshkini, A., Zhandi, M., Cinar, M. & Selehi, M. (2014). Intracellular glutathione content, developmental competence and expression of apoptosis-related genes associated with G6PDH-activity in goat oocyte. *Journal Assisted Reproduction Genetics* 31:313-321.
- Aguirre, C.A., Palacios, F.M., Hernández, P.P. & Sánchez, J.G. (2009). Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootecnia Tropical* 27: 277-284.

- Alm, H., Torner, H., Lohrke, B., Viergutz, T., Ghoneim, I. & 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 glucosa-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63: 2194-2205.
- Amstrong, D. (2001). Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 55: 1303-1322.
- Arashiro, E.K., Palhao, M.P., Wohres-Viana, S., Siqueira, L.G., Camargo, L.S., Henry, M. & Viana, J. (2013). *In vivo* collection of follicular fluid and granulosa cells from individual follicles of different diameters in cattle by an adapted ovum pick-up system. *Reproduction Biology and Endocrinology* 11: 73.
- Arce Recinos, C., Aranda Ibáñez, E. M., Osorio Arce, M. M., González Garduño, R., Díaz Rivera, P. & Hinojosa Cuellar, J. A. (2017). Evaluación de parámetros productivos y reproductivos en un hato de doble propósito en Tabasco, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8: 83-91.
- Ashry, M., Lee, K., Mondal, M., Datta, T., Folger, J., Rajput, S., Zhang, K., Hemeida N. & Smith, G. (2015). Expression of TGF β superfamily components and other markers of oocytes quality in oocytes selected by brilliant cresyl blue staining: Relevance to early embryonic development. *Molecular Reproduction Development* 82: 251-264.
- Azari-Dolatabad, N., Rahmani, R., Hajian, M., Ostadhosseini, S., Hosseini, M. & Nasr-Esfahani, H. (2016). Effect of cilostamide and/or forskolin on the meiotic resumption and development competence of growing ovine oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. *Theriogenology* 85: 1483-1490.
- Báez, F., Chávez, A., Hernández, H. & Villamediana, P. (2010). Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos de bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Revista Científica* 20: 259-267.
- Bassiouni, H. & Masoud, F. (2010). Developmental competence of buffalo oocytes from follicles of different diameters selected by brilliant cresyl blue staining. *Global Veterinaria* 4: 176-184.
- Beyer, H. & Walter, W. (1987). Manual de Química Orgánica. Ed. REVERTÉ, España: p. 854.
- Bhardwaj, R., Ansari, M. M., Pandey, S., Parmar, M.S., Chandra, V., Kumar, G.S. & Sharma, T. (2016). GREM1, EGFR, and HAS2; the oocyte competence markers for improved buffalo embryo production *in vitro*. *Theriogenology* 86: 2004-2011.
- Bhojwani, S., Alm, H., Torner, H., Kanitz, W. & Poehly, R. (2007). Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 67: 341-345.

- Blondin, P. & Sirard, A. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocyte. *Molecular Reproduction and Development* 41: 56-62.
- Bó, G. A., Baruselli, P. S. & Martínez, M. F. (2003). Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science* 78: 307-326.
- Bó, G.A. & Mapletoft, R.J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryo. *Animal Reproduction* 10: 344-348.
- Bols, J., Jorssen, A., Goovaerts, F., Langbeen, A. & Leroy, L. (2012). High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. *Animal Reproduction* 9: 420-425.
- Caixeta, E.S. & Dode, M.A.N. (2010). Avaliações da competencia ovocitaria em bovinos. *Veterinaria e Zootecnia* 17: 8-18.
- Caixeta, E.S., Ripamonte, P., Franco, M.M., Junior, J.B. & Dode, M.A. (2009). Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cell and oocytes of *Bos Indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reproduction Fertility Development* 21: 655-664.
- Calderón, R. C., Villa, G. A., Lagunes, L. J. & Fajersson, P. (2000). Desarrollo Folicular en vaquillas Cebu y Suizo Pardo Peripúres en condiciones tropicales. *Técnica Pecuaria en México* 38: 163-175.
- Camargo, L.S.A., Viana, J.H.M., Sá, W.F., Ferreira, A.M., Ramos, A.A. & Vale Filho, V.R. (2006). Factors influencing *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction* 3: 19-28.
- Camargo, L.S.A., Viana, J.H.M., Ramos, A.A., Serapião, R.A., Sá, W.F., Ferreira, A.M., Guimarães, M.F. & Vale Filho, V.R. (2007). Developmental competence and expression. *Theriogenology* 68: 626-632.
- Castaneda, C., Kaye, P., Pantaleon, M., Phillips, N., Norman, S., Fry, R. & D'Occhio, M. (2013). Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. *Theriogenology* 79: 417-422.
- Catalá, M., Izquierdo, D., Rodríguez, M., Hammami, S. & Paramio M. (2012). Effect of oocytes quality on blastocysts development after *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a sheep model. *Fertility and Sterility* 97: 1004-1008.
- Catalá, M., Izquierdo, D., Uzbekova, S., Morató, R., Roura, M., Romaguera, R., Papillier, P. & Paramio, M. (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: 517-527.

- Cetica, P., Pintos, L., Dalvit, G. & Beconi, M. (2002). Activity of key enzymes involve in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocytes maturation *in vitro*. *Reproduction* 124: 675-681.
- Colazo, M.G. & Mapletoft, R.J. (2014). Fisiología del ciclo estral Bovino. *Revista Ciencia Veterinaria* 16: 31-46.
- Colazo, M.G. & Mapletoft, R.J. (2007). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Revista Ciencia Veterinaria* 9: 20-37.
- Coticchio, G., Dal Canto, M., Mignini, M., Guglielmo, M., Brambillasca, F., Turchi, D., Novara, P. & Fadini, R. (2015). Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproduction Update* 21: 427-254.
- Coy, P., Romar, G., Matás, C. & García, E. (2002). Effect of *in vitro* fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and *in vitro* development in pig. *Reproduction* 124: 279-288.
- Daniel, W. & Cross, C. (2013). Biostatistics. A foundation for analysis in the health Science. Wiley Press, USA; pp 261.
- De la Torre, J.F., Gardner, D.K., Preis, K., Gibbons, J. & Seidel, G.E. (2006). Metabolic regulation of *in vitro* produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2, 4-dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. *Reproduction, Fertility and Development* 18: 597-607.
- Denis, R. (2008). *In vivo* ovum pick up (OPU): A new perspective in the field of reproduction biotechnologies. *Ciencia y Tecnología Ganadera* 2: 57-70.
- de Wit A.A., Wurth, Y.A. & Kruip, A.M. (2000). Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocytes complex. *Journal Animal Science* 78: 1277-1283.
- Dorado, M., Marqués de Oliveira, N., Lorenzo, C., Vázquez, G. & Marco, Y. (2006). Evolución de los medios de cultivo embrionario en Técnicas de reproducción asistida. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 23: 31-36.
- Duarte, D., Da Rosa, B., Sandi-Monroy, N., Auler, L., Felix, R. & Tavares, A. (2011). Selection of *Rattus norvegicus* oocytes for *in vitro* maturation by brilliant cresyl blue staining. *Zygote* 21: 238-245.
- Duarte, D., Gonsales, E., Conzatti, M., Kussler, A., Mylius, A., Eye, H. & Simoni, LI. (2013). *In vitro* maturation of human oocytes selected by brilliant cresyl blue Staining. *Human Reproduction*. Conference 29th Annual meeting of the European Society of human Reproduction and Embryology 2013. Conference publication 28 (pp-i155).

- Dunning, K.R., Russell, D.L. & Robker, R.L. (2014). Lipids and oocytes developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction* 148: R15-R27.
- Egerszegi, I., Alm, H, Ratky, J., Heleil, B., Brussow, K. & Torner, H. (2010). Meiotic progression, mitochondrial features and fertilization characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. *Reproduction, Fertility and Development* 22: 830-838.
- El Shourbagy, S.H., Spikings, E.C., Freitas, M. & Justin, J. (2006). Mitochondria directly influence fertilization outcome in the pig. *Reproduction* 131: 233-245.
- Fair, T., Hyttel, P. & Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development* 42: 437-442.
- Fakruzzaman, M.D., Bang, J., Lee, K.L., Kim, S. S., Ha, A., Ghanem, N., Han, C. H., Cho, K. W., White, K. L. & Kong, I. K. (2013). Mitochondrial content and gene expression profiles in oocyte-derived embryo of cattle selected on the basis of brilliant cresyl blue staining. *Animal Reproduction Science* 142: 19-27.
- Fernández, F., Hernández, J., Romero, J. & Rodríguez, J. (2013). Viability after vitrification of sow and sheep embryos produced *in vitro*. *Revista Salud Animal* 35: 52-58.
- Fischer, A.E., Bernal, D.P., Gutierrez R.C. & Rutledge, J.J. (2000). Estimates of heterosis for *in vitro* embryos production using reciprocal crosses in cattle. *Therogenology* 54: 1433-1442.
- Fortune, J.E., Rivera, G.M., Evans, A.C. & Turzillo, A.M. (2001). Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction* 65: 648-654.
- Fulka, J., First, N.L. & Moor, R.M. (1998). Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction* 4: 41-49.
- Gandhi, A.P., Lane, M., Gardner, D.K. & Krisher, R.L. (2000). A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reproduction* 15: 395-401.
- Gardner, D. & Lane, M. (1998). Culture of viable human blastocyst in defined sequential serum-free media. *Human Reproduction* 13: 148-159.
- Ghanem, N., Holker, M., Rings, F., Jennen, D., Tholen, E., Sirard, M., Torner, H., Kanitz, W., Schellyer, K. & Tesfaye, D. (2007). Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. *BMC Developmental Biology* 7: 90.
- Ghoneimy, M. K., El-Naby, A., Elraay, M., Toussef, Y., Sosa, G. & Abou El-Roos, M. (2017). Impact of using brilliant cresyl blue stain on oocytes and embryo selection: Review article. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences* 48: 43-51.

- Gilchrist, R.B., Lane, M. & Thompson, J.G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update* 14: 159-177.
- Gilchrist, R. B., Luciano, A.M., Richani, D., Zeng, H.T., Wang, X., De Vos, M., Sugimura, S., Smitz, J., Richard, F.J. & Thompson, J.G. (2016). Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction* 152: R147-R157.
- Gimenes, L.U., Ferraz, M. L., Fantinato, P. N., Chiaratti, M. R., Mesquita, L.G., Sá Filho, M.F., Meirelles, F. V., Trinca, L. A., Rennó F. P., Watanabe, Y. F. & Baruselli, P.S. (2015). The Interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect *in vitro* embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. *Theriogenology* 83: 385-393.
- Giraldo, G.J. (2011). Efecto del crioprotector dimetilformamida sobre la viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro*. Tesis, Magíster en ciencias, biotecnología, Universidad Nacional de Colombia [en línea], Consultado: Marzo 21, 2019. <http://www.bdigital.unal.edu.co/5921/1/71729743.2012.pdf>
- Gonella, A.M., Atuesta, J.E., Bernal, S.M. & Chacón, L. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos *in vitro*. *Revista de investigación Agraria y Ambiental* 4: 65-80.
- Goovaerts, I.G., Leroy, J.L., Jorssen, E.P. & Bols, P.E. (2010). Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. *Theriogenology* 74: 1509-1520.
- Graf, A., Krebs, S., Heininen-Brown, M., Zakhartchenko, V., Blum, H. & Wolf, E. (2014). Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Animal Reproduction Science* 149: 46-58.
- Gutiérrez, M.E., Galina, C.S., Moreno-Mendoza, N., Alarcón, M.A., Godínez, B. & Lammoglia, M.A. (2014). Observation of fresh *Bos indicus* embryos comparing stereoscopic and phase contrast microscopy. *Zygote* 22: 187-194.
- Hasan, M., Hoelker, M., Noferesti, S., Salilew, D., Tholen, E., Looft, C., Rings, F., Jasim, M., Spencer, T., Schellender, K. & Tesfaye, D. (2013). Exosomal and No-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. *Plos ONE* 8: e78505.
- Heleil, B. & Fayed, M. (2010). Developmental competence of buffalo oocytes from follicles of different diameters selected by brilliant cresyl blue staining. *Global Veterinaria* 4: 176-184.
- Heleil, B., kuzmina, T., Novikova, H., Torner, H. & Alm H. (2010). Effect of prolactin on developmental competence of bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. *Journal of Reproduction and Infertility* 1: 1-7.
- Henao, G. (2010). Algunos factores relacionados con la dinámica folicular en *Bos indicus*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín* 63: 5577-5586.

- Hendriksen, P.J., Steenweg, W.N., Harkema, J.C., Merton, J.S., Bevers, M.M., Vos, P.L. & Dieleman, S.J. (2004). Effect of different stages of the follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 61: 909-920.
- Herradón, P.G., Quintela, L.A., Becerra, J.J., Ruibal, S. & Fernandez, M. (2007). Fecundación *in vitro*: Alternativa para la mejora genética en bovinos. *Archivo Latinoamericano Producción Animal* 15: 34-41.
- Hyttel, P. (2011). Electron microscopy of mammalian oocyte development, maturation and fertility. Book: Tosti, E. & Boni, R. Oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event, Ed. Bathan e Book, Dubai. p: 1-37.
- Iqbal, M., Aleem, M., Ijaz, A., Rehman, H. & Yousaf, M. (2010). Assessment of buffalo semen with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide reduction assay. *Journal Animal Science* 88: 922-925.
- Iwata, H., Hashimoto, S., Ohota, M., Kimura, K., Shibano, K. & Miyake M. (2004). Effect of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction* 127: 159-164.
- Janowski, D., Salilew-Wondim, D., Torner, H., Tesfaye, D., Ghanem, N., Tomek, W., El-Sayed, A., Schellyer, K. & Holker, M. (2012). Incidence of apoptosis and transcript with the quality of the enclosed oocyte. *Theriogenology* 78: 656-669.
- Kadarmideen, H.N., Mazzoni, G., Watanabe, Y.F., Strobecch, L., Baruselli, P.S., Meirelles, F.V., Callesen, H., Hyttel, P., Ferraz, J.B. & Nogueira, M.F. (2015). Genomic selection of *in vitro* produced and somatic cell nuclear transfer embryos for rapid genetic improvement in cattle production. *Animal Reproduction* 12: 389-396.
- Karami-Shabankareh, H. & Mirshamsi, S. (2012). Selection of developmentally competent sheep oocytes using the brilliant cresyl blue test and the relationship to follicle size and oocyte diameter. *Small Ruminant Research*. 105: 244-249.
- Karami-Shabankareh, H., Azimi, G. & Torki, M. (2014). Developmental competence of bovine oocytes selected base on follicle size and using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Iran Journal Reproduction Medicine* 12: 771-778.
- Karami-Shabankareh, H., Hajarian, H., Shahsavari, M. & Moradinejad, R. (2015). *In vivo* and *in vitro* study of the function of the left and right bovine ovaries. *Theriogenology* 84: 724-731.
- Kempisty, B., Jackowska, M., Piotrowska, H., Antosik, P., Wozna, M., Bukowska, D., Brussow, D. & Jaskowski, J.M. (2011). Zona pellucida glycoprotein 3 (pZP3) and integrin β 2 (ITGB2) mRNA and protein expression in porcine oocyte after single and double exposure to brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 75: 1525-1535.

- Koester, M., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Montag, M., Rings, F., Schimming, T., Tesfaye, D. & Hoelker, M. (2011). Evaluation of bovine zona pellucida characteristics in polarized light as a prognostic marker for embryonic developmental potential. *Reproduction* 141: 779-787.
- Krisher, R.L., Lane, M. & Bavister, B.D. (1999). Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction* 60: 1345-1352.
- Kumar, A. & Malakar, D. (2013). *In vitro* differentiation of developmentally competent oocytes by monitoring glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity with brilliant cresyl blue stain in Jamunapari goat. *Animal Science Reporter* 7: 2013.
- Labrecque, R. & Sirard, M. (2014). The study of mammalian oocyte competence by transcriptome analysis: progress and challenges. *Molecular Human Reproduction* 20:103-116.
- Lekola, K. P. M., Ng'ambi, J. W., Nkadimeng, M., Mphaphathi, M. L. & Nedambale, T. L. (2016). Effects of various concentrations of gonadotropins and 17 β estradiol on the *in vitro* maturation of cattle oocytes selected using brilliant cresyl blue staining. *South African Journal of Animal Science* 46: 321-326.
- Li, H.J., Liu, D.J., Cang, M., Wang, L.M., Jin, M.Z., Ma, Y.Z. & Shorgan, B. (2009). Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Animal Reproduction Science* 114: 89-98.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M. & Gordon, I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Molecular Reproduction Development* 37: 48-53.
- Lopes, E.F., Marques, L.S., Duranti, R.G., Oliveira, A.T., Lopes, R.F. & Rodriguez, J.L. (2015). Gene expression of monocarboxylate transporters and Oocyte-secreted factors in bovine cumulus-oocyte complexes selected by brilliant cresyl blue. *Reproduction in Domestic Animals* 50: 763-770.
- López, L.A. (2018). Vitricación de ovocitos de porcino y su efecto en la distribución de microfilamentos y cromatina durante el desarrollo embrionario temprano. TESIS para obtener el grado de Maestra en Biología de la Reproducción Animal. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, CDMX.
- López, A., Olivera, M., Ruiz, T. & Tarazona, A. (2007). Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Revista MVZ Córdoba* 12: 1061-1067.
- Maia, R. C., Mogollón-Waltero, E. M., Dubeibe-Marin, D. F., Pena-Carvalho, B. & Burla-Dias, Á. J. (2017). Effect of seasonality on the quality of bovine oocytes selected by the brilliant cresyl blue method. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 30: 259-266.
- Maldonado, J. G., Agudelo, B. & Vásquez, A. (1997). Dinámica folicular en novillas y vacas *Bos indicus* y *Bos taurus*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 10: 67-75.

- Manjunatha, B., Gupta, P., Deveraj, M., Ravindra, J. & Nandi, S. (2007). Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology* 68: 1299-1304.
- Mare A. (2011). Follicle environment and quality of *in vitro* matured oocytes. *Journal of Assist Reproduction and Genetics* 28:483-488.
- Mehlmann, L.M. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 130: 791-799.
- Mirshamsi, S., Karami-Shabankareh, H., Ahmadi-Hamedani, M., Soltani, L., Hajarian, H. & Abdolmohammadi, A. (2013). Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. *Animal Reproduction Science*. 136: 245-251.
- Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Held, E., Ghanem, N., Rings, F., Salilew-Wondim, D., Tesfaye, D., Sieme, H., Schellyer, K. & Hoelker, M. (2011). G6PDH-activity in equine oocytes correlates with morphology, expression of candidate genes for viability, and preimplantative *in vitro* development. *Theriogenology* 76: 1215-1226.
- Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Soleimani, M., Deldar, H., Salehi, M., Soudi, S., Hashemi, S., Schellyer, K. & Hoelker, M. (2012). Prediction of oocyte developmental competence in ovine using glucosa-6-phosphaste dehydrogenase (G6PDH) activity determined at retrieval time. *Journal Assisted Reproduction and Genetics* 29: 153-158.
- Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Veshkini, A., Hajarizadeh, A., Jamshidi-Adegani, F., Zhandi, M., Hossein, A., Ulas, M., Soleimani, M. & Gastal, E. (2014). Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity with oocyte cytoplasmic lipid content, developmental competence, and expression of candidate genes in a sheep model. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31: 1089-1098.
- Mohapatra, S.K., Sandhu, A., Neerukattu, V., Singh, K., Selokar, N.L., Singla, S.K., Chauhan, M.S., Manik, R.S. & Palta, P. (2015). Buffalo embryos produced by handmade cloning from oocytes selected using brilliant cresyl blue staining have better developmental competence and quality and are closer to embryos produced by *in vitro* fertilization in terms of their epigenetic status and gene expression pattern. *Cellular Reprogramming* 17: 141-150.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Mota, G. B., Tavares, P. R., Varella, S. R., Cortes, B. M., Moreira, V. J., Alves, T. C. & Almeida, L. S. (2010). Developmental competence and expression of the Master and ZAR1 genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue. *Zygote* 18: 209-216.
- Motta, P., Ramos, N., González, C. & Castro, E. (2011). Follicular dynamics in the reproductive life of female livestock. *Veterinaria y Zootecnia* 5: 89-99.

- Mourot, M., Dufort, I., Gravel, C., Algriany, O., Dieleman, S. & Sirard, M.A. (2006). The influence of follicle sizes, FSH enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Molecular Reproduction Development* 73: 1367-1379.
- Muasa, B.S., Mutembei, H.M., Camargo, L.S. & Viana, J.H.M. (2015). Effect of follicle size of Boran Cows on Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase activity and developmental competence. *International Journal of Veterinary Science* 4: 161-165.
- Mucci, N., Aller, J.F., Kaiser, G.G., Hozbor, F. & Alberio, R.H. (2006). Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de Medicina Veterinaria* 38: 97-104.
- Opiela, J. & Kańska-Książkiewicz, L. (2013). The utility of brilliant cresyl blue (BCB) staining of mammalian oocyte used for *in vitro* embryo production (IVP). *Reproduction Biology*. 13: 177-183.
- Opiela, J., Kańska-Książkiewicz, L., Lipinski, D., Stomski, R., Bzowska, M. & Rynska, B. (2008). Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology* 69: 546-555.
- Opiela, J., Lipinski, D., Slomski, R. & Kańska-Książkiewicz, L. (2010). Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection and BCB test. *Animal Reproduction Science* 118: 188-193.
- Ordoñez, E. A., Merchant, H., Medrano, A., Kjelland, M. & Romo, S. (2014). Lipid droplet análisis using *in vitro* bovine oocytes and embryos. *Reproduction in Domestic Animals* 49: 306-314.
- Otero, R., Eduardo, D. C. P. & Pereira, E. (2017). *In vitro* nuclear maturation of bovine oocytes selected by the brilliant cresyl blue method. *Revista Colombiana de Ciencia Animal Recia* 9: 345-354.
- Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikawa, S. & Suzuki, T. (1997). Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 48: 769-774.
- Park, K. & Niwa, K. (2009). Bovine oocytes can be penetrated in modified tris-buffered-medium. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 22: 500-506.
- Pawlak, P., Warzych, E., Chabowska, A. & 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: 28-36.
- Perks, C., Newcomb, P., Grohmann, M., Wright, R., Mason, H. & Holly, J. (2003). Prolactin acts as a potent survival factor against C2-ceramide – induced apoptosis in human granulosa cells. *Human Reproduction*. 18: 2672-2677.

- Pichardo, J.E.H., Ortiz, F., Rodríguez, J.L., Ducolomb, Y., Reyes, F.F., Betancourt, M. & Romo, S. (2016). Use of IVF and ET in Mexican Criollo Sheep (*Ovis aries*): Immediate and Delayed Embryo Transfers. *Advances in Reproductive Sciences* 4: 8-16.
- Picton, H.M., Harris, S.E., Muruvi, W. & Chambers, E.L. (2008). The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction* 136: 703-715.
- Pontes, J.H.F., Silva, K.C.F., Basso, A.C., Rigo, A.G., Ferreira, C.R., Santos, G.M.G., Sanches, B.V., Porcionato, J.P.F., Vieira, P.H. S., Faifer, F.S., Sterza, F.A.M., Schenk, J.L. & Seneda, M.M. (2010). Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 74: 1349-1355.
- Pujol, M., López-Béjar, M. & Paramio, M. (2004). Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology* 61: 735-744.
- Quezada-Casasola, A., Martínez-Armendáriz, K. E., Itzá-Ortiz, M. F., Escárcega-Ávila, A. M., Pérez-Eguía, E., Filipiak, Y., Larocca, C. & 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: 967-972.
- Quispe, C., Fernández, E., Ancco, E., Oriundo, K. & Mellisho E. (2015). Effect of donor breed on oocyte quality and quantity recovery by transvaginal ultrasound guided ovum pick-up. *Spermova* 5: 59-62.
- Ramos, I.M., Batista, G.C., Gómez, M.B. & Zamora, P.A. (2006). Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en Salud* 8: 7-15.
- Reynolds, W.L., DeRoven, T.M. & High, J.W. (1963). The age and weight at puberty of Angus, Brahman and Zebu cross heifers. *Journal Animal Science* 22: 243.
- Ríos, A., Hernández, V., Amezcua, E. & Zárate, J. (2015). Producción láctea de vacas Simmental x Cebú y Suizo Pardo x Cebú en clima tropical. *Agronomía Mesoamericana* 26: 17-25.
- Robles, R. C. C., Godoy, A. V., Lagunes, J. L. & Fajersson, P. (2000). Desarrollo folicular en vaquillas Cebú y Suizo Pardo peribúres en condiciones tropicales. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 38: 163-175.
- Rocha, A., Randel, R. D., Broussard, J. R., Lim, J. M., Blair, R. M., Roussel, J. D., Godke, R.A. & Hansel, W. (1998). High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 49: 657-665.
- Rodgers, R.J. & Irving-Rodgers, H.F. (2010). Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction* 139: 309-318.

- Rodrigues, B.A., Rodriguez, P., Silva, A.E., Cavalcante, L.F., Feltrin, C. & Rodrigues, J.L. (2009). Preliminary study in immature canine oocytes stained with brilliant cresyl blue and obtained from bitches with low high progesterone serum profiles. *Reproduction Domestic Animals* Suppl 2: 255-258.
- Rodríguez-González, E., López-Béjar, M., Velilla, E. & Paramio, M. (2002). Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 57: 1397-1409.
- Rodríguez, J.L., Romo, G. S., Ducolomb, Y., Casa, H. E. & Hernández, P. E. (2017). Development of sheep morulae in a simple or sequential medium: relationship between morphological evaluation and embryonic viability. *Revista Salud Animal* 39: 9-18.
- Rodriguez-Villamil, P., Ongaratto, F.L., Moreira, G., Fernandez, T.M. & Bó, G.A. (2016). Vitrification of immature and matured bovine oocytes: effect of brilliant cresyl blue selection and hyaluronan addition. *Animal Reproduction* 13: 42-49.
- Sadeesh, E., Kataria, M., Balhara, S. & Yadav, P. (2014). Expression profile of developmentally important genes between hand-made cloned buffalo embryos produced from reprogramming of donor cell with oocytes extract and selection of recipient cytoplasm through brilliant cresyl blue staining and *in vitro* fertilized embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31: 1541-1552.
- SAGARPA. (2018). Milk Production from México in the 2017. (en línea). Marzo 21, 2019. <http://www.numerosdelcampo.sagarpa.gob.mx/publicnew/productosPecuarios/cargarPagina/5>
- Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N., Parrish, J. & Memili E. (2006). Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* 131: 895-904.
- Sales, J. N., Iguma, L.T., Batista, R.I., Quintão, C.C., Gama, M.A., Freitas, C., Pereira, M.M., Camargo, S.A., Viana, J.H., Souza, J.C. & Baruselli, P.S. (2015). Effects of a high energy diet on oocyte quality and *in vitro* embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Journal of Dairy Science* 98:1-14.
- Salimi, M., Salehi, M., Masteri, R., Mohammad, M., Ghaffari, M., Nourozian, M. & Hosseini A. (2014). The effect of melatonin on maturation, glutathione level and expression of HMGB1 gene in brilliant cresyl blue (BCB) stained immature oocyte. *Cell Journal* 15: 294-301.
- Salviano, M. B., Collares, F. J. F., Becker, B. S., Rodrigues, B. A. & Rodrigues, J. L. (2016). Bovine non-competent oocytes (BCB-) negatively impact the capacity of competent (BCB+) oocytes to undergo *in vitro* maturation, fertilization and embryonic development. *Zygote* 24: 245-251.
- Santos, E., Sato, D., Lucia, T. & Iwata, H. (2013). Brilliant cresyl blue staining negatively affect mitochondrial functions in porcine oocyte. *Zygote* 23:352-359.

- Satrapa, R.A., Nabhan, T., Silva, C.F., Simões, R.A.L., Razza, E.M., Puelker, R.Z., Trinca, L.A. & Barros, C.M. (2011). Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology* 76: 1162-1167.
- Silva, J.R. & Figueiredo, J.R. (2016). Ovarian follicle development *in vitro* and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domestic Animal Endocrinology* 55:123-135.
- Silva, D., Rodriguez, P., Galuppo, A., Arruda, N. & Rodrigues, J. (2011). Selection of bovine oocyte by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. *Zygote* 21: 250-255.
- Silva, C.F., Sartorelli, E.S., Castilho, A.C.S., Satrapa, R.A., Puelker, R.Z., Razza, E.M., Ticianelli, J.S., Eduardo, H.P., Loureiro, B. & Barros, C.M. (2013). Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vitro*. *Theriogenology* 79: 351-357.
- Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P. & Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65: 126-136.
- Sirard, M.A. (2011). Follicle environment and quality of *in vitro* matured oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 28: 483-488.
- Skinner, M.K. (2005). Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update* 11: 461-471.
- Spikings, E.C., Alderson, J. & Justin, J. (2007). Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biology of Reproduction* 76: 327-335.
- Sturmey, R.G., Reis, A., Leese, H.J. & McEvoy, T.G. (2009). Role of fatty acid in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction in Domestic Animal* 44: 50-58.
- Su, J., Wang, Y., Li, R., Peng, H., Hua, S., Li, Q., Quan, F., Guo, Z. & Zhang, Y. (2012). Oocytes selected using staining enhance nuclear reprogramming and the *in vivo* development of SCNT embryos in cattle. *Plos one* 7: e36181.
- Sugulle, A., Dochi, O. & Koyama, H. (2008). Developmental competence of bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue staining: effect of the presence of corpus luteum on embryo development. *Journal of Mammalian Ova Research Bovine* 25: 50-55.
- Tabandeh, M.R., Golestani, N., Kafi, M., Hosseini, A., Saeb, M. & Sarkoobi, P. (2012). Gene expression pattern of adiponectin and adiponectin receptors in dominant and atretic follicles and oocytes screened based on brilliant cresyl blue staining. *Animal Reproduction Science* 131: 30-40.

- Tabyeh, M., Golestani, N., Kafi, M., Hosseini, A., Saeb, M. & Sarkoohi, P. (2012). Gene expression pattern of adiponectin and adiponectin receptors in dominant and atretic follicles and oocytes screened based on brilliant cresyl blue staining. *Animal Reproduction Science* 131: 30-40.
- Takahashi, Y. & First, N. (1992). *In vitro* development of bovine one cell embryos influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acid and vitamins. *Theriogenology* 37: 963-978.
- Thompson, J.G. & Gilchrist, R.B. (2013). Pioneering contributions by Robert Edwards to oocyte *in vitro* maturation (IVM). *Molecular Human Reproduction* 19: 794-798.
- Tian, W.N., Braunstein, L.D., Pang, J., Stuhlmeier, K.M., Xi, Q.C., Tian, X. Stanton, R.C. (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *Journal of Biological Chemistry* 273: 10609-17.
- Torner, H., Ghanem, N., Ambros, C., Holker, M., Tomek, W., Phatsara, C., Alm, H., Sirard, M., Kanitz, W., Schellyer, K. & Tesfaye, D. (2008). Molecular and subcellular characterization of oocytes screened for their developmental competence based on glucosa-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction* 135: 197-212.
- Tsuji, H., Khandoker, Y. & Hamano, K. (2001). Lipid in mammalian embryo development. *Journal of Mammalian Ova Research* 18: 73-80.
- Urrego, R., Tarazona, A., Olivera, M. & Camargo, O. (2008). Simplification of oocytes fertilization during *in vitro* production of bovine embryos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 21: 398-405.
- Valderrama, R. U., Mora, J. & Ramírez, D. (2011). Influence of the subespecie of the donator cow in the quantity of total embryos obtained *in vitro*: a retrospective study. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 6: 45-52.
- Valencia, H.A., Sanchez, A.A. & Baldrich, N.R. (2017). Ciclo reproductivo y dinámica folicular en ganado *Bos indicus*. *Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias* 9: 62-68.
- Vélez, I. C., Chica, A., Urrego, R., Torres, V., Jimenez-Escobar, C. & Zambrano, J. (2017). *In vitro* embryo production from cumulus-oocyte complexes type II in *Bos indicus* cattle. *Medicina Veterinaria y Zootecnia* 12: 76-81.
- Viana, J. (2018). 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. Embryo Technology Newsletter. *International Embryo Technology Society*.
- Viana, J. (2019). 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. Embryo Technology Newsletter. *International Embryo Technology Society*.
- Villamar, A. L. & Olivera, C. E. (2005). Situación actual y perspectiva de la producción de leche de Bovino en México. (en línea) Marzo 21, 2019. <https://www.inforural.com.mx/leche-sistemas-de-produccion/>

- Wang, L., Lin, J., Juncheng, H., Wang, J., Zhao, Y. & Chen, T. (2012). Selection of ovine oocytes by brilliant cresyl blue staining. *Journal Biomedical Biotechnology* 161372: 7.
- Watanabe, Y.F., de Souza, A.H., Mingoti, R.D., Ferreira, R.M., Batista, E.O.S., Dayan, A., Watanabe, O., Meirelles, F.V., Nogueira, M.F., Sterman, J B. & Baruselli, P.S. (2017). Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo transfer. *Animal Reproduction* 14: 635-644.
- Wong, G. E. (2010). ¿Después de un análisis de varianza... qué? Ejemplos en ciencia de alimentos. *Agronomía Mesoamericana* 21: 349-356.
- Wongsrikeao, P., Otoi, T., Yamasaki, H., Agung, B., Taniguchi, M., Naoi, H. & 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: 366-372.
- Yan-Guang, W., Yong, L., Ping, Z., Guo-Cheng, L., Dong, H., De-Qiang, M. & Jing-He T. (2007). Selection of oocytes for *in vitro* maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. *Cell Research* 17: 722-731.
- Yang, M., Hall, J., Fan, Z., Regouski, M., Meng, Q., Rutigliano, H. M. & Polejaeva, I. A. (2016). Oocytes from small and large follicles exhibit similar development competence following goat cloning despite their differences in meiotic and cytoplasmic maturation. *Theriogenology* 86: 2302-2311.

TL-HEPES-PVA. Medio modificado de Tyrode suplementado con lactato de sodio, HEPES y alcohol polivinílico.

Ingrediente	mM	Ingrediente	mM
NaCl	114	Sorbitol	12
KCl	3.20	NaHCO ₃	2
NaH ₂ PO ₄	0.34	Gentamicina	0.025 mg/mL
Lactato de Na	10	Penicilina G	0.065 mg/mL
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.50	PVA	0.01%
HEPES	10	CaCl ₂ .2H ₂ O	2
Piruvato de Sodio	0.20		

Fuente: Pichardo *et al.*, 2016.

TCM-199: Medio cultivo de tejido 199 suplementado.

Ingrediente	mM
Bicarbonato de Sodio	26.2
PVA	0.1 %
D-glucosa	3.05
Piruvato de Sodio	0.91
Cisteína	0.57
EGF	10 ng/mL
Estreptomicina	0.05 mg/mL
Penicilina	0.075 mg/mL

Fuente: Pichardo *et al.*, 2016

TBMm: Medio amortiguado con Tris modificado.

Ingrediente	mM
NaCl	113.10
KCl	3
CaCl ₂ .2H ₂ O	7.5
Tris (base libre)	20
Glucosa	11
Piruvato de sodio	10
Penicilina sódica	60 µg/mL
Sulfato estreptomicina	100 µg/mL

Fuente: Park & Niwa, 2009.

Medios Secuenciales SOF1-SOF2.

Ingrediente	SOF1	SOF2
	mM	mM
NaCl	99.70	99.70
KCl	7.16	7.16
KH ₂ PO ₄	1.19	1.19
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.49	0.49
DL- Ac láctico Jarabe 60% lactato de sodio	3.30	3.60
NaHCO ₃	25.07	25.07
CaCl ₂ 2 H ₂ O	1.71	1.71
Piruvato de sodio	0.33	---
Glutamina	1.0	1.0
Glucosa	1.5	3.0
BSA	8 mg/mL	8 mg/mL
	Cristalizada	Cristalizada
EDTA	0.1	---
Taurina	0.1	---
Aminoácidos no esenciales MEM	1X	1X
Aminoácidos esenciales MEM	1X	1X
Vitaminas MEM	---	1X

BSA: Albumina sérica bovina; EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético; MEM: Medio mínimo esencial de Eagle.

Fuente: Gandhi *et al.*, 2000

—Original—

***In vitro* embryo production of *Bos taurus* oocytes treated with brilliant cresyl blue (BCB) from small and large follicles**

Jose L. Rodríguez^{1, 2}, Miguel Betancourt³, Fahiel Casillas⁴, Socorro Retana-Márquez⁴, Eduardo Casas³, and Filiberto Fernández^{2*}

¹Biological and Health Sciences PhD Program, Metropolitan Autonomous University, Mexico City 04960, Mexico

²Department of Agricultural and Animal Production, Division of Biological and Health Sciences, Metropolitan Autonomous University-Nezahualcoyotl, Mexico City 04960, Mexico

³Department of Health Sciences, Division of Biological and Health Sciences, Metropolitan Autonomous University-Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico

⁴Department of Biology of Reproduction, Division of Biological and Health Sciences, Metropolitan Autonomous University-Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico

Abstract: Oocyte quality is important for *in vitro* embryo production success. Morphological features such as follicular size, oocyte diameter, cytoplasm appearance, and zona pellucida integrity determine oocyte's developmental competence. Evaluations at the meiotic stage, and of metabolic state and viability have also been performed. Therefore, the aim of this study was to elucidate if *Bos taurus* oocytes from follicles of different sizes, identified by the brilliant cresyl blue staining (BCB), show improved *in vitro* embryo development. Oocytes from small (2.0–4.9 mm) and large (5.0–10.0 mm) follicles were classified according to their cytoplasm appearance, blue (BCB+) and colorless (BCB-), and by measuring their diameters. The analyzed parameters were viability before maturation and after fertilization, assessment of the meiotic stage, embryo development and blastocyst formation, and the results for BCB+ and BCB- oocytes from small and large follicles were compared. The results varied according to the oocyte classification, oocyte from small follicles showed an increase in blastocyst production. We conclude that BCB staining allows the select on of oocytes from small follicles that are competent of reaching the blastocyst stage in *Bos taurus*.

Key words: Brilliant cresyl blue, Oocyte viability, Oocyte diameter, Meiosis stage, *in vitro* embryo production

Introduction

The evaluation of oocyte quality is critical for *in vitro* embryo production success. It is important to identify oocytes with developmental competence. This is commonly performed by assessment of morphological features [1], such as the oocyte diameter and follicular size [2, 3]; evaluations at the cellular level of the meiotic stage [4], metabolic activity [5] and viability have also been performed [6].

Morphologic assessment of oocyte quality is based on the thickness of the cumulus oophorus and cytoplasm homogeneity [7]. However, oocyte selection based on morphological characteristics provides an imprecise criterion of choice [8]. Oocytes with normal morphological appearance can be found at an early stage of degeneration [9].

The follicular size is another parameter used to identify oocytes with developmental capacity. It has been reported that follicular growth is a key process, because the oocytes of large follicles (LF) have greater developmental capacity than those obtained from small follicles (SF) [1, 3, 10]. However, it has also been reported that bovine follicles of the same follicular size exhibit different physiological stages [11]. Other studies, performed with bovine, goat and sheep oocytes, have reported an association between oocyte diameter and blastocyst development [12]. Bovine blastocyst production increases in full-grown oocytes with diameters greater than 120 µm compared those with diameters of 115 µm [13]. When oo-

©2019 Japan Society for Ova Research

Received: August 4, 2018

Accepted: October 16, 2018

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: fbyes@comu.uam.mx

cytes complete growth, they achieve a metabolic state considered more competent for *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF), therefore, identification of competent oocytes is a critical point for *in vitro* embryo development (IVED). The brilliant cresyl blue (BCB) technique for competent oocyte identification has been described [7]. BCB is a non-invasive intracellular dye used to identify oocytes that have completed their growth. It is an electron acceptor and it has been reported as an indicator of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity [1, 5]. In oocytes that have completed their growth, the activity of G6PDH and the production of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) decreases, consequently, BCB cannot be reduced and the oocyte cytoplasm staining remains blue (BCB+). In oocytes that continue to grow, G6PDH activity and NADPH production is intense, and they reduce BCB, rendering the oocyte cytoplasm colorless (BCB-) [3].

It has been reported that BCB+ oocytes in both, bovine and buffalo, are larger in diameter [12, 14], and that they are capable of producing a greater number of embryos and blastocysts [8, 14]. Blastocyst production from BCB+ oocytes has been reported to be significantly better than that from control [8, 14–16]. However, it has also been reported that no differences were found between the production of blastocysts from BCB+ bovine oocytes and controls [17–19]. These conflicting results, in terms of the BCB staining efficacy in identifying competent oocytes, could be due to differences between the bovine species (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) investigated. One study reported blastocysts production of 28% from BCB+ oocytes obtained from the crossbred *B. taurus* × *B. indicus*; however, this value was not significantly different from that of the control (25%) [17]. Consequently, the bovine species could constitute a key factor in the identification of high-quality oocytes.

Worldwide *B. taurus* is an economically important species due to its higher production of milk and meat compared to *B. indicus* [20]. Milk production in Mexico was 11 billion liters in 2017 [21], and approximately 50.6% of is obtained from *B. taurus* [22]. For this reason, to preserve these species characteristics, crosses of *B. taurus* and *B. indicus* have been made. Oocytes from *B. indicus* have better quality than those from *B. taurus* mainly due to major adaptation characteristics. Besides, *B. indicus* has thermotolerant genes which protect their reproduction features of increased fertilization and blastocyst formation [23]. Another factor to be considered is that geographical distribution of *B. indicus* is in Mexico's south-east, and that of *B. taurus* is in the north and center. It has been reported that *B. taurus* has greater sensitivity

to high temperatures, i.e. heat stress, and this affects follicular growth, follicle number, steroidogenesis and gap junctions between the oocyte and cumulus cells [23]. These factors may lead to infertility; therefore, this species has become highly important in terms of the study of IVF efficiency. It has been reported that higher blastocyst rates were obtained in *B. indicus* than in *B. taurus* (36% vs. 12%, respectively) [24]. Most studies reporting high blastocyst rates were performed on *B. indicus*, but in several studies, the animal species was not specified. Therefore, the aim of this study was to elucidate if *B. taurus* oocytes from follicles of different sizes, identified by BCB staining, show increased IVED rates.

Materials and Methods

This study was approved under the regulations of the Committee for the Care and Use of Animals, Metropolitan Autonomous University-Xochimilco. The ovaries were obtained from *B. taurus* cows at the Temamatla slaughterhouse, State of Mexico, under the approval of the animal health federal law with the number: 025575-R. Frozen semen was obtained from one commercial Holstein bull (Semex, Mexico).

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The incubation conditions for all processes were 38.5°C with an atmosphere of 5% CO₂, 95% air, and saturation humidity.

Oocyte collection

Ovaries were obtained from *B. taurus* (Holstein) cows and transported to the laboratory in a solution consisting of 0.157 M NaCl at 37°C supplemented with antibiotics: 7.5 IU/ml ampicillin, 7.5 µg/ml streptomycin, and 0.015 µg/ml amphotericin. The follicles were classified using a Vemier caliper in to small (SF; 2.0–4.9 mm) and large (LF; 5.0–10.0 mm). The follicular fluid was aspirated with Tyrode's modified medium, supplemented with 10 mM sodium lactate, 0.50 mM HEPES buffer, and 0.01% polyvinyl alcohol (TL-HEPES-PVA), with a pH of 7.3–7.4 [5].

Brilliant cresyl blue stain

Oocyte-cumulus cells complexes (OCCs) from the two follicles sizes were exposed to BCB (26 µM) diluted in modified Dulbecco's phosphate-buffered saline (mD-PBS), supplemented with 0.4% bovine serum albumin (BSA) for 90 min. OCCs were classified according to the color of the cytoplasm: blue (BCB+) and colorless (BCB-) [1, 3].

Oocyte diameter assessment

To determine the diameter of the oocytes treated with the BCB, it was necessary to remove the cumulus cells. Each oocyte was photographed by a camera (Nikon COOLPIX S4) and all measures were obtained using ImageJ, image processing program [25], considering the center and two perpendicular axes, including the zona pellucida.

in vitro maturation of BCB+, BCB- and control oocytes

Both BCB treated and control oocytes were washed three times in TCM-199 supplemented with 25.2 mM sodium bicarbonate, 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.1% PVA, 0.57 mM cysteine and 10 ng/ml epidermal growth factor [6]. The oocytes were transferred in batches of ten to 45 μ L of the maturation medium same as above supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.075 IU/ml of human menopausal gonadotropin, then cultured for 24 h.

in vitro fertilization sperm preparation

Thawed semen was diluted 1:3 with modified Tris-buffered medium (mTBM) containing 113.1 mM NaCl, 3 mM KCl, 7.5 mM CaCl₂, 20 mM Tris, 11 mM glucose, 10 mM sodium pyruvate, 60 μ g/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin sulphate [26]. The semen suspension was centrifuged at 500g for 20 min [27]. The pellet was resuspended in 1 ml of mTBM supplemented with 8 mg/ml BSA and incubated for 1 h (swim up). The supernatant was recovered (0.5 ml) and diluted in mTBM to obtain a concentration of 1×10^6 sperm/ml [6].

in vitro fertilization of BCB+, BCB- and control oocytes

The cumulus cells were partially removed from the oocytes after IVM, and the oocytes were transferred in batches of ten to 45 μ L of the fertilization medium: Tyrode's medium supplemented with 6 mg/ml BSA, lactate, and pyruvate (TALP). The oocytes were incubated with sperm for 21 h [18].

in vitro embryo development of BCB+, BCB- and control oocytes

The remaining cumulus cells were mechanically removed and the zygotes were co-cultured with granulosa cells in sequential media SOF1-SOF2 (In vitro, Mexico) for 168 h [28]. SOF1 (50 μ L) was used for 48 h and SOF2 (50 μ L) for the remaining 120 h. The culture media were supplemented with 10% FBS [28]. Cleavage was evaluated after 72 h of incubation and blastocyst production at 168 h.

Assessment of the viability and meiotic stage

A double stain was performed. Thiazolyl blue solution (0.5 mg/ml) exposure for 2 h was used to determine the oocyte viability. Oocytes with violet cytoplasm was considered viable, and colorless ones were considered non-viable [5]. A second staining, Hoechst (40 μ g/ml) diluted in PBS for 45 min, was performed to assess the meiotic stage: germinal vesicle (GV), metaphase I (MI), metaphase II (MII) [7] and fertilized (F), which was determined by the presence of male and female pronuclei. MII plus fertilized oocytes were considered mature. Observations were made at 400 x under an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E600).

Statistical analysis

To compare the viability, meiotic stage, IVED, and blastocyst rates among the oocytes groups from both follicles sizes, data were treated as non-parametric and analyzed using a multiple comparison Duncan test and Number Cruncher Statistical Software (NCS8[®]). Percentage data are presented as mean \pm SD values. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Experimental design

Four experiments were performed to determine the viability, meiotic stage, oocyte diameter, IVM, IVF and IVED of BCB-treated oocytes from small (SF; 2.0–4.9 mm) and large (LF; 5.0–10.0 mm) follicles and untreated controls.

Experiment 1. Determination of the diameter of oocytes treated with BCB.

The diameters of 463 BCB-treated oocytes were measured (4 replicates) of which 322 were obtained from SF and 141 from LF.

Experiment 2. Assessment of the viability of oocytes before IVM and after IVF.

For oocyte viability before IVM and after IVF, a total of 406 BCB-treated oocytes were evaluated with thiazolyl blue solution (MTT) (4 replicates) before IVM: 263 and 143 from SF and LF, respectively. For the control, a total of 166 oocytes were evaluated (4 replicates) of which 96 and 70 oocytes were obtained from SF and LF, respectively. After IVF, 389 BCB-treated oocytes were evaluated (5 replicates) of which 275 and 114 were from SF and LF, respectively. For the control, 138 oocytes were evaluated (5 replicates): 103 and 35 oocytes from SF and LF, respectively.

Table 1. Results of BCB staining of oocytes from the two sizes of follicles

Follicle Size	Total n	Group	n (% ± SD)
Small	1,053	BCB+	221 (21 ± 17) ^a
		BCB-	832 (79 ± 19) ^b
Large	467	BCB+	220 (47 ± 18) ^a
		BCB-	247 (53 ± 23) ^b

n: number of oocytes. The percentages were calculated from number of oocyte analyzed. Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 2. Diameters of BCB+ and BCB- oocytes from the two follicles sizes

Follicle Size	Total n	Group	\bar{x} (± SD)
Small	322	BCB+	61 (154 ± 7)
		BCB-	261 (151 ± 7)
Large	141	BCB+	61 (153 ± 5)
		BCB-	80 (130 ± 6)

n: number of oocytes. \bar{x} ± SD: oocyte diameter (µm) average ± SD. The diameters showed no significant differences among the groups ($P > 0.05$).

Table 3. Viability before IVM and after IVF of oocytes from the two follicles sizes

Follicle Size	Group	Before IVM		After IVF	
		n	Viability n (% ± SD)	n	Viability n (% ± SD)
Small	Control	96	92 (95 ± 3)	103	97 (94 ± 11)
	BCB+	50	44 (88 ± 11)	53	45 (85 ± 15)
	BCB-	213	204 (96 ± 4)	222	199 (89 ± 11)
Large	Control	70	68 (97 ± 4)	33	31 (88 ± 13)
	BCB+	71	70 (98 ± 4)	61	54 (88 ± 13)
	BCB-	72	70 (97 ± 3)	53	45 (85 ± 21)

n: number of oocytes. The percentages were calculated from the number of analyzed oocytes. There were no significant differences ($P > 0.05$).

Experiment 3. Assessment of the meiotic stage before IVM and after IVF

A total of 388 BCB-treated oocytes were evaluated with Hoechst stain (4 replicates) before IVM: 248 and 140 oocytes from SF and LF, respectively. For the control, 160 oocytes were evaluated with Hoechst (4 replicates): 92 and 68 oocytes from SF and LF, respectively. After IVF, 343 BCB-treated oocytes were evaluated with Hoechst (6 replicates): 244 and 99 oocytes from SF and LF, respectively. For the control, 128 oocytes (6 replicates) were evaluated: 97 and 31 oocytes from SF and LF, respectively.

Experiment 4. Evaluation of the embryo development and blastocyst formation rates

A total of 262 BCB-treated oocytes were cultured (4 replicates) to evaluate embryo development: 193 and 69 oocytes from SF and LF, respectively. For the control, 161 oocytes were cultured (4 replicates): 87 and 74 oocytes from SF and LF, respectively. The percentage of blastocysts was calculated from the total cleavage in each group.

Results

Oocytes treated with BCB

In the present study, 1,520 oocytes were obtained, 69% from SF (n=1,053) and 31% from LF (n=467). Those treated with BCB showed a higher percentage of BCB+ in both follicle sizes ($P < 0.05$). A higher percentage of BCB+ oocytes was obtained from LF than from SF ($P < 0.05$) (Table 1).

Diameters of oocytes treated with BCB

The diameters of BCB+ and BCB- oocytes from SF and LF were similar ($P > 0.05$) (Table 2).

Viability of oocytes before IVM and after IVF

The viability of BCB+, BCB- and control oocytes groups from both follicle sizes did not show differences before IVM ($P > 0.05$). Also, after IVF no differences among the groups were found ($P > 0.05$). The result of comparisons of the viability before IVM and after IVF were also similar ($P > 0.05$) (Table 3).

Meiotic stage before IVM and after IVF

The percentage of oocytes in the GV and MI stages before IVM were similar among the BCB+, BCB- and control oocytes from both sizes of follicles ($P > 0.05$).

Table 4. Meiotic stage before IVM and after IVF of viable oocytes from the two follicles sizes

Follicle Size	Group	Before IVM n (% ± SD)			After IVF n (% ± SD)				
		n	GV	MI	n	MI	MII	F	Matured*
Small	Control	92	53 (58 ± 12)	19 (42 ± 12)	97	21 (21 ± 19) ^a	25 (25 ± 9) ^a	51 (53 ± 32) ^a	76 (78 ± 19) ^a
	BCB+	44	28 (64 ± 22)	15 (36 ± 22)	45	4 (9 ± 6) ^b	5 (13 ± 0) ^b	35 (78 ± 18) ^b	41 (91 ± 5) ^b
	BCB-	204	134 (66 ± 10)	30 (14 ± 10)	199	28 (14 ± 14) ^b	57 (28 ± 17) ^a	114 (57 ± 22) ^a	171 (85 ± 14) ^b
Large	Control	68	44 (65 ± 15)	24 (35 ± 15)	31	3 (10) ^b	7 (22 ± 8) ^a	21 (68 ± 8) ^a	28 (90 ± 15) ^b
	BCB+	70	42 (60 ± 10)	28 (40 ± 5)	54	7 (13 ± 10) ^b	13 (24 ± 23) ^a	34 (63 ± 27) ^a	47 (87 ± 13) ^a
	BCB-	70	42 (60 ± 20)	28 (40 ± 20)	45	5 (11 ± 8) ^b	8 (18 ± 8) ^a	32 (71 ± 16) ^b	40 (89 ± 9) ^b

n: number of oocytes. Meiotic stage: germinal vesicle stage (GV), metaphase I (MI), metaphase II (MII), and fertilized (F), which was identified by the presence of male and female pronuclei. *The MII plus fertilized oocytes were considered matured. The percentage was calculated from the number of analyzed oocytes. Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 5. Embryo and blastocyst development rates of oocytes from the two follicles sizes

Follicle Size	Group	n	Cleavage: n (% ± SE)	Blastocyst/Cleavage: n (% ± SE)
Small	Control	87	30 (37 ± 6) ^a	8 (16 ± 1) ^a
	BCB+	57	35 (61 ± 20) ^a	7 (26 ± 21) ^b
	BCB-	136	33 (54 ± 15) ^b	9 (12 ± 4) ^a
Large	Control	34	47 (64 ± 19) ^a	7 (24 ± 15) ^b
	BCB+	27	17 (63 ± 21) ^a	3 (21 ± 11) ^a
	BCB-	42	32 (76 ± 13) ^a	5 (25 ± 12) ^b

n: number of oocytes. Different superscripts indicate a significant difference ($P < 0.05$).

After IVF, control oocytes from SF displayed higher MI rates compared to BCB+ and BCB- oocytes ($P < 0.05$). All the oocyte groups from LF had similar MI rates ($P > 0.05$). Percentages of matured oocytes (MII + F) from SF were significantly higher in the BCB+ and BCB- groups compared to the control; however, no significant differences were found among the oocyte groups from LF ($P > 0.05$). Concerning fertilization, in oocytes from SF, fertilization rates were higher in the BCB+ group compared to the control and BCB- groups ($P < 0.05$). However, in oocytes from LF, fertilization rates were higher in the BCB- group compared to the BCB+ and control groups ($P < 0.05$) (Table 4).

Embryo and blastocyst development

The embryo cleavage rates of the BCB+ and control oocytes from SF showed no difference ($P > 0.05$), but they were higher compared to the BCB- group ($P < 0.05$). On the other hand, the embryo cleavage rates of BCB+, BCB- and control group oocytes from LF were similar ($P > 0.05$) (Table 5).

The blastocyst development rates of the BCB+ oocytes from SF were higher than those of the control and BCB- group oocytes ($P < 0.05$). The blastocyst development rates of LF oocytes were similar among the BCB+, BCB- and control groups ($P > 0.05$) (Table 5).

Discussion

Reproductive technologies are important for the development of the livestock industry, especially that of *B. taurus* cows [1]. However, research results regarding efficacy BCB staining have been contradictory. Some studies did not specify the animal species studied [1, 8, 29, 30] and some were carried out on *B. indicus* [1, 24, 31] exclusively; therefore, it is difficult to draw definitive conclusions.

The genotype is an important aspect to be considered, because there are differences in the follicular development between *B. indicus* and *B. taurus*. During follicular recruitment, *B. indicus* cows recruit a greater number of follicles per follicular wave than *B. taurus* [32]; therefore, the number of oocytes recovered under hormonal treatment is higher in *B. indicus* than in *B. taurus* [34]. On the other hand, it is known that the quality of oocytes from *B. taurus* decreases in the summer [33]. Therefore, these characteristics should be considered when evaluating the developmental capacity of oocytes [1].

In the present study, a greater number of *B. taurus* oocytes were obtained from SF, but only 21% of them were BCB+. This suggests that oocytes from SF continue in the growth phase. In LF, fewer oocytes were recovered and no significant differences in their characteris-

tics were found between the BCB+ and BCB- groups, although higher BCB+ oocyte rates were obtained from LF compared to SF. It is clear that oocytes from LF would possess better developmental capacity because follicular growth is essential for oocyte maturation [34]. In agreement with our results, Karami-Shabankareh et al. [1] reported that bovine oocytes showed no correlation between the BCB+ percentage and follicular size.

In *B. taurus* and buffalo, it has been demonstrated that BCB+ oocytes are larger in diameter than BCB- oocytes [12, 35]. However, the present study found that the diameter was similar in BCB+ and BCB- oocytes obtained from both follicle sizes. In agreement with this, Castaneda et al. [25] reported the same. Also, some studies have demonstrated that bovine oocytes from 3 mm follicles have completed their growth, therefore they do not increase in diameter in relation to the follicular development [29, 34]. Accordingly, the diameter of the *B. taurus* oocytes, as a parameter of quality, cannot be used as a reliable method to predict the developmental capacity.

The meiotic stage before IVM is related to developmental capacity [36]. In the present study, GV oocyte rates were similar in BCB+, BCB- and control oocytes from both sizes of follicles. Another study of buffalo also reported that GV percentages of BCB+, BCB- and control oocytes from three follicles sizes were similar [7].

The ovulation of matured oocytes with the ability to carry out normal embryo development is the end point of *in vivo* maturation [37]. The results of the present study show that the maturation rates of BCB+ and BCB- oocytes from both SF and LF were similar. These results demonstrate that BCB staining does not increase the MIII proportion of oocytes. Some studies have reported great similarities in the MIII proportions of BCB+ and control oocytes [16, 38, 39, 40]. In controls, the maturation rate was slightly reduced, only in oocytes from SF, as reported by Manjunatha et al. [35] in buffalo.

Results concerning the efficacy of BCB staining of bovine oocytes are controversial. In the present study, the fertilization rate increased in BCB+ oocytes from SF (78%) and BCB- oocytes from LF (77%). It has been reported that BCB- bovine oocytes have higher fertilization rates than BCB+ [41]. Also, BCB+ buffalo oocytes have been reported to have higher fertilization rates than BCB- oocytes [35]. Another study of *B. taurus* oocytes reported a fertilization rate of 48%, lower than that seen in the present study [23].

The embryo cleavage rate of oocytes from SF were higher in the BCB+ and control groups than in the BCB- group; therefore, blue BCB staining identified the oocytes in SF with the greatest capacity for development. Some

studies have reported similar results for *B. taurus* [42] and *B. indicus* [5]. With regard to oocytes from LF, BCB staining did not identify those with greater development capacity, as was previously reported by Karami-Shabankareh et al. [1].

The blastocyst production was higher in BCB+ (26%) than in BCB- (12%) oocytes from SF. Besides, the blastocyst production rate of BCB+ oocytes was similar to that of BCB- oocytes (21%) from LF. These results agree with those reported by Mussa et al. [5] for *B. indicus*. Blastocyst production was similar in BCB+ and BCB- oocytes from LF. A likely explanation for this is that in LF, oocytes are selected naturally *in vivo* by endocrine and paracrine factors for follicular recruitment [43–45].

In summary, BCB staining of oocytes from SF increased blastocyst production by allowing the selection of competent oocytes that will reach the blastocyst stage. In LF, since oocytes have been selected naturally (by means of ovarian folliculogenesis), no significant differences were observed in blastocyst production rates among the groups. However, fewer oocytes were recovered from LF, resulting in fewer oocytes available for IVF procedures.

The results of this study suggest that selecting oocytes from SF, that are positively stained by BCB, increases the blastocyst rates in *B. taurus*.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the Temamata slaughterhouse, State of Mexico, for the donation of the ovaries. This publication represents the fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Biological Sciences and Health for José Luis Rodríguez-Suástegui. Thanks to the CONACYT for the scholarship granted to José Luis Rodríguez-Suástegui (224661).

References

- 1) Karami-Shabankareh, H., Azimi, G. and Torki, M. (2014): Developmental competence of bovine oocytes selected based on follicle size and using the brilliant crystal blue (BCB) test. *Iran J. Reprod. Med.*, 12, 771–776. *Medline*
- 2) Heled, H., Kuzmina, T., Novikova, N., Terner, H. and Alm, H. (2010): Effect of prokinin on developmental competence of bovine oocytes selected by brilliant crystal blue staining. *J. Reprod. Infertil.*, 1, 1–7.
- 3) Ghannizadeh, K., El-Nahy, A., Elsay, M., Yousef, Y., Soom,

- G. and Abou El-Rees, M. (2017): Impact of using brilliant cresyl blue stain on oocyte and embryo selection. *Egypt. J. Vet. Sci.*, 48, 43–51. [CrossRef](#)
- 4) Troner, H., Ghansen, N., Ambrus, C., Hölker, M., Tomsek, W., Phatsara, C., Alm, H., Sinerl, M.A., Karitz, W., Schellender, K. and Tesfaye, D. (2008): Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction*, 135, 197–212. [Medline](#) [CrossRef](#)
- 5) Maaes, S., Matzabei, M., Camargo, S. and Viana, M. (2005): Effect of follicle size of Boses Cows on Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase activity and developmental competence. *Int. J. Vet. Sci.*, 4, 161–165.
- 6) Fernández, F., Hernández, J., Romero, J. and Rodríguez, J. (2013): Viability after vitrification of sow and sheep embryos produced in vitro. *Rev. Salud Anim.*, 35, 52–58.
- 7) Hsieh, B. and Fayed, M. (2010): Developmental competence of buffalo oocytes from follicles of different diameters selected by brilliant cresyl blue staining. *Glob. Vet.*, 4, 176–184.
- 8) Mirshamsi, S.M., Karamshahkareh, H., Ahmadi-Harondani, M., Soltani, L., Hajarjan, H. and Abdolmohammadi, A.R. (2013): Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential in the blastocyst in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 136, 245–251. [Medline](#) [CrossRef](#)
- 9) Fin, S., Kataria, M., S. B. and Yadav, P. (2014): Expression profile of developmentally important genes between hand-made cloned buffalo embryos produced from reprogramming of donor cell with oocytes extract and selection of recipient cytoplasm through brilliant cresyl blue staining and in vitro fertilized embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 31, 1540–1552. [Medline](#) [CrossRef](#)
- 10) Lonergan, P., Moranhan, P., Rizos, D., Boland, M.P. and Gordon, I. (1994): Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, 37, 48–53. [Medline](#) [CrossRef](#)
- 11) Sagulle, A., Doshi, O. and Koyama, H. (2008): Developmental competence of bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue staining: effect of the presence of corpus luteum on embryo development. *J. Mamm. Ova Res.*, 25, 50–55. [CrossRef](#)
- 12) Pujal, M., López-Béjar, M. and Paronís, M.T. (2004): Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, 61, 735–744. [Medline](#) [CrossRef](#)
- 13) Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikawa, S. and Suzuki, T. (1997): Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology*, 48, 769–774. [Medline](#) [CrossRef](#)
- 14) Bhardwaj, R., Anzari, M.M., Pandey, S., Parmar, M.S., Chandra, V., Kumar, G.S. and Sharma, G.T. (2016): GREM1, EGFR, and HAS2, the oocyte competence markers for improved buffalo embryo production in vitro. *Theriogenology*, 86, 2004–2011. [Medline](#) [CrossRef](#)
- 15) Silva, D.S., Rodríguez, P., Galuppo, A., Arruda, N.S. and Rodrigues, J.L. (2013): Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. *Zygote*, 21, 250–255. [Medline](#) [CrossRef](#)
- 16) Alm, H., Troner, H., Lührke, B., Viergutz, T., Ghansen, I.M. and Karitz, 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, 2194–2205. [Medline](#) [CrossRef](#)
- 17) Mota, G.B., Batista, R.J., Serapito, R.V., Boit, M.C., Viana, J.H., Torres, C.A. and de Almeida Camargo, I.S. (2010): Developmental competence and expression of the MATER and ZARI genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue. *Zygote*, 18, 209–216. [Medline](#) [CrossRef](#)
- 18) Opala, J., Lipiński, D., Słomski, R. and Kubiś-Kucińska, J. (2010): Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. *Anim. Reprod. Sci.*, 118, 188–193. [Medline](#) [CrossRef](#)
- 19) Fakruzzaman, M., Bang, J.I., Lee, K.I., Kim, S.S., Ha, A.N., Ghansen, N., Han, C.H., Cho, K.W., White, K.I. and Korg, I.K. (2013): Mitochondrial content and gene expression profiles in oocyte-derived embryos of cattle selected on the basis of brilliant cresyl blue staining. *Anim. Reprod. Sci.*, 142, 19–23. [Medline](#) [CrossRef](#)
- 20) Arco, C., Arenda, E., Osorio, M., González, R., Díaz, P. and Hinojosa, J. (2017): Productive and reproductive parameters in dual-purpose Zebu x Holstein cattle in Tabasco, Mexico. *Rev. Mex. De Cienc. Pecu.*, 8, 83–90.
- 21) SAGARPA (2018): Milk Production from México in the 2017. (Online). April 26, 2018. <http://www.nutriciondelcampo.sagarpa.gob.mx/publicaciones/produccion/pecuarias/leche/Pagina/5>
- 22) Villanar, A.L. and Oliveira, C.E. (2005): Situación actual y perspectiva de la producción de leche de Bovino en México. (Online). April 29, 2018. <https://www.inforum.com.mx/leche-sistemas-de-produccion/>
- 23) Biaz, F., Chávez, A., Hernández, H. and Villamediana, P. (2010): Evaluation of in vitro development capacity of bovine oocytes obtained from predominantly *Bos taurus* and *Bos indicus* cows. *Rev. Cienc.*, 20, 259–267.
- 24) Salas, J.N., Igama, I.T., Batista, R.J., Quintão, C.C., Gama, M.A., Freitas, C., Peres, M.M., Camargo, I.S., Viana, J.H., Souza, J.C. and Baruselli, P.S. (2015): Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *J. Dairy Sci.*, 98, 3086–3099. [Medline](#) [CrossRef](#)
- 25) Castaneda, C.A., Kaye, P., Pantaleon, M., Phillips, N., Norman, S., Fry, R. and D'Occhio, M.J. (2013): Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. *Theriogenology*, 79, 417–422. [Medline](#) [CrossRef](#)
- 26) Park, K. and News, K. (2009): Bovine oocytes can be penetrated in modified tria-buffered medium. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 22, 500–506. [CrossRef](#)
- 27) Sobel, M.M., Hoelker, M., Nofreoni, S.S., Saliew-Wondim, D., Tholen, E., Looft, C., Rings, F., Uddin, M.J., Spencer, D.

- T.F., Schellander, K. and Tesfaye, D. (2013): Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. *PLoS One*, 8, e78505. [Medline] [CrossRef]
- 28) Qandhi, A.P., Lane, M., Gardner, D.K. and Krieger, R.L. (2000): A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Hum. Reprod.*, 15, 395-401. [Medline] [CrossRef]
- 29) Janowski, D., Salilew-Wondim, D., Turner, H., Tesfaye, D., Ghanem, N., Tessek, W., El-Sayed, A., Schellinger, K. and Holker, M. (2012): Incidence of apoptosis and transcript abundance in bovine follicular cells is associated with the quality of the enclosed oocyte. *Theriogenology*, 78, 656-669. [Medline] [CrossRef]
- 30) Su, J., Wang, Y., Li, R., Peng, H., Hua, S., Li, Q., Quan, F., Guo, Z. and Zhang, Y. (2012): Oocytes selected using BCB staining enhance nuclear reprogramming and the in vivo development of SCNT embryos in cattle. *PLoS One*, 7, e36181. [Medline] [CrossRef]
- 31) Veloz, I., Chica, A., Urrego, R., Torres, V., Jimenez, C. and Zambrano, J. (2017): Producción in vitro de embriones a partir de complejos cúmulos ovocitos tipo II en bovinos. *Rev. Induc. Res. CES Med. Vet. Zoot.*, 12, 79-87.
- 32) Motta, P., Ramos, N., Gomez, C. and Castro, E. (2011): Follicular dynamics in the reproductive life of female livestock. *Vet. Zootec.*, 5, 89-99.
- 33) Camargo, L., Viana, J., Sá, W., Ferreira, A., Ramos, A. and Vale, V. (2006): Factors influencing in vitro embryo production. *Anim. Reprod.*, 3, 19-28.
- 34) Iwata, H., Hashimoto, S., Ohta, M., Kimura, K., Shibano, K. and Miyake, M. (2004): Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction*, 127, 159-164. [Medline] [CrossRef]
- 35) Manjmatha, B.M., Gupta, P.S., Devaraj, M., Ravindra, J.P. and Nandi, S. (2007): Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology*, 68, 1299-1304. [Medline] [CrossRef]
- 36) Labrecque, R. and Struelens, M.A. (2014): The study of mammalian oocyte competence by transcriptome analysis: progress and challenges. *Mol. Hum. Reprod.*, 20, 103-116. [Medline] [CrossRef]
- 37) Falke, J. Jr., First, N.L. and Moor, R.M. (1998): Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol. Hum. Reprod.*, 4, 41-49. [Medline] [CrossRef]
- 38) Lokola, K., Ng'ambi, J., Nkudzirung, M., Mphaphathi, M. and Nedambale, T. (2016): Effects of various concentrations of gonadotropins and 17 β estradiol on the in vitro maturation of cattle oocytes selected using brilliant cresyl blue staining. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 46, 321-326.
- 39) Maia, R., Mogollón, E., Dubeibe, D., Pima, B. and Buzla, A. (2017): Effect of seasonality on the quality of bovine oocytes selected by the brilliant cresyl blue method. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.*, 30, 259-266. [CrossRef]
- 40) Otero, R., De Costa, E. and Pereira, E. (2017): In vitro nuclear maturation of bovine oocytes selected by the brilliant cresyl blue method. *Rev. Colomb. Cienc. Anim.*, 9, 345-354.
- 41) Pawlak, P., Warczyk, E., Chabowska, A. and Lachniak, 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. *J. Reprod. Dev.*, 60, 23-36. [Medline] [CrossRef]
- 42) Rodriguez-Villamil, P., Ongaratto, F., Morera, G., Tarasco, M. and Bó, G. (2006): Vitrification of immature and matured bovine oocytes: effect of brilliant cresyl blue selection and hyaluronan addition. *Anim. Reprod.*, 13, 42-49. [CrossRef]
- 43) Silva, J.R., van den Hark, R. and Figueredo, J.R. (2016): Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 55, 123-135. [Medline] [CrossRef]
- 44) Struelens, M.A. (2011): Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 28, 483-488. [Medline] [CrossRef]
- 45) Maldonado, J.G., Agudelo, B. and Vasquez, A. (1997): Diferencia folicular en novillas y vacas. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.*, 10, 67-75.