



## Morfometría de ovarios, folículos y su relación con la calidad oocitaria en bovinos<sup>1</sup>

### Morphometric of ovaries, follicles, and their relationship with oocyte quality in cattle

*Eliana Neira-Rivera<sup>2</sup>, José Guillermo Velásquez-Penagos<sup>2</sup>, Jaime Antonio Cardozo-Cerquera<sup>2</sup>, José Henry Velásquez-Penagos<sup>2</sup>, Sonia Lucía Gutiérrez-Parrado<sup>2</sup>, Rocío Fenney Herrera-León<sup>2</sup>*

- <sup>1</sup> Recepción: 7 de marzo, 2022. Aceptación: 3 de junio, 2022. Este manuscrito científico es derivado del trabajo de tesis de Maestría en Sistemas Sostenibles de Salud-Producción Animal Tropical, de Eliana Neira Rivera, titulado: Características estructurales del ovario y de la expresión proteica del fluido folicular asociado a la calidad del oocito bovino de vacas cebú bajo condiciones de la Orinoquía Colombiana.
- <sup>2</sup> Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Grupo de Reproducción Tropical. Kilómetro 14 Vía Bogotá-Mosquera, Cundinamarca, Colombia, C.P 250047. [eneira@agrosavia.co](mailto:eneira@agrosavia.co) (autora para la correspondencia; <https://orcid.org/0000-0002-8940-5885>); [jvelasquez@agrosavia.co](mailto:jvelasquez@agrosavia.co) (<https://orcid.org/0000-0001-8023-1367>); [jcardozo@agrosavia.co](mailto:jcardozo@agrosavia.co) (<https://orcid.org/0000-0002-7744-2881>); [jvelasquezp@agrosavia.co](mailto:jvelasquezp@agrosavia.co) (<https://orcid.org/0000-0001-7617-6588>); [slgutierrez@agrosavia.co](mailto:slgutierrez@agrosavia.co) (<https://orcid.org/0000-0002-8329-8302>); [herrera@agrosavia.co](mailto:herrera@agrosavia.co) (<https://orcid.org/0000-0002-6258-5476>).

## Resumen

**Introducción.** Estudios sobre características estructurales del ovario asociadas con calidad del complejo cúmulo-oocito (COCs) en bovinos, contribuyen con la definición de estrategias para mejorar la eficiencia reproductiva. **Objetivo.** Determinar el peso y tamaño de los ovarios, calidad de los folículos y COCs en hembras Cebú, para establecer diferencias entre el ovario derecho e izquierdo. **Materiales y métodos.** Entre marzo y julio del 2017, se obtuvieron 52 ovarios de veintiséis vacas Cebú. Los ovarios y folículos se pesaron y midieron. Los folículos se agruparon en tres categorías: a) <3 mm (TFI), b) 3-6 mm (TFII) y c) >6 mm (TFIII). La calidad de los folículos se determinó mediante la técnica de irrigación-traslucidez (TIT) y la de COCs por las características del citoplasma y células del cúmulo como buena (CI), regular (CII) y mala (CIII), y mediante la prueba azul brillante de cresilo se categorizaron como BCB+ y BCB-. **Resultados.** La longitud, ancho y peso de los ovarios fueron  $2,7 \pm 0,6$  cm,  $1,8 \pm 0,5$  cm y  $7,0 \pm 3$  g, respectivamente, con diferencias para longitud y peso entre ovario derecho e izquierdo ( $p < 0,01$ ). La mayor cantidad de folículos se obtuvieron en TFI ( $p < 0,05$ ). El 88,56 % de los folículos evaluados fueron de buena calidad. El 52 % y 44,2 % de COCs fueron clasificados como CI y BCB+, respectivamente. Cuando se consideró el tamaño del folículo y la calidad del COCs, se evidenció que en el grupo TFI el 22 % fueron CI, el 34 % CII y el 44 % CIII, y el TFII el 31 % fue CI, el 21 % CII y el 48 % CIII. No se observan diferencias entre ovario izquierdo y derecho. **Conclusión.** El ovario derecho presentó un mayor tamaño y peso, mayor número de estructuras foliculares y mayor número de COCs de buena calidad.

**Palabras clave:** calidad de oocito, tamaño de ovarios, tamaño de folículos.



## Abstract

**Introduction.** Studies on the structural characteristics of the ovary associated with the quality of the cumulus-oocyte complex (COCs) in cattle contribute to the definition of strategies to improve reproductive efficiency. **Objective.** To determine the weight and size of the ovaries, follicle quality, and COCs in Zebu females, in order to establish differences between the right and left ovary. **Materials and methods.** Between March and July 2017, 52 ovaries were obtained from twenty-six Zebu cows. The ovaries and follicles were weighed and measured. The follicles were grouped into three categories: a) <3 mm (TFI), b) 3-6 mm (TFII) and c) >6 mm (TFIII). The follicles quality was determined by the irrigation-translucency technique (TIT) and the COCs by the characteristics of the cytoplasm and cumulus cells as good (CI), fair (CII), and poor (CIII), and by cresyl brilliant blue test were categorized as BCB+ and BCB-. **Results.** Ovarian length, width and weight were  $2.7 \pm 0.6$  cm,  $1.8 \pm 0.5$  cm, and  $7.0 \pm 3$  g, respectively, with differences for length and weight between the right and left ovary ( $p < 0.01$ ). The highest number of follicles were obtained in TFI ( $p < 0.05$ ). The 88.56 % of the follicles evaluated were of good quality. A total of 52 % and 44.2 % of COCs were classified as CI and BCB+, respectively. When follicle size and COC quality were considered, it was shown that in the TFI group 22 % were IC, 34 % CII, and 44 % CIII, and in the TFII group 31 % were IC, 21 % CII and 48 % CIII. No differences were observed between left and right ovary. **Conclusion.** The right ovary presented a greater size and weight, a greater number of follicular structures and a greater number of good quality COCs.

**Keywords:** oocyte quality, ovaries size, follicle size.

## Introducción

Durante el desarrollo embrionario, la actividad de las estructuras de los órganos reproductivos debe ser igual en ambos lados (derecho e izquierdo); sin embargo, existe evidencia de una funcionalidad asimétrica en parámetros de fertilidad (Gereš et al., 2011). Se conoce que las ovulaciones del ovario derecho ocurren con mayor frecuencia que en el ovario izquierdo en el bovino (Ginther & Dangudubiyam, 2019), así como también en humanos, ratas, ratones y hámster, donde presenta un mayor tamaño y número de cuerpos lúteos (Fukuda et al., 2000; Gereš et al., 2011; Ginther & Dangudubiyam, 2019). Hasta el momento, no se conoce el mecanismo que explique la mayor frecuencia de ovulación del ovario derecho en ninguna de las especies (Ginther & Dangudubiyam, 2019).

Se presume que las diferencias relacionadas con la respuesta ovulatoria de cada ovario, al igual que las tasas de preñez, dependen del ambiente uterino (Alm et al., 2005; Karami-Shabankareh & Mirshamsi, 2012; Lonergan et al., 2003). Otras explicaciones incluyen la proximidad del ovario izquierdo al rumen y otros factores extrínsecos como la temperatura o las fluctuaciones de presión y las contracciones mecánicas del rumen (Stevenson, 2019).

En la vaca los ovarios son órganos pares, de consistencia firme y forma ovoide e irregular, con tendencia a ser aplanados y pequeños con relación al tamaño corporal (Dyce et al., 1991). Los folículos son estructuras funcionales del ovario que comandan los procesos reproductivos y fases del ciclo estral (Filipiak et al., 2016).

Existe una relación entre el tamaño del folículo y la calidad del oocito en términos de morfología y competencia, los oocitos obtenidos de folículos grandes tienen un mayor potencial de desarrollo que los folículos de menor tamaño y generan una mejor producción de embriones *in vitro* (Lequarre et al., 2005; Machatkova et al., 2004).

La mayoría de los estudios sobre tamaño folicular se realiza en forma directa sobre la superficie del ovario, lo cual no permite una medición precisa del folículo. La técnica de disección de folículos presentes en la corteza ovárica permite hacer una evaluación más precisa del tamaño y calidad por nivel de irrigación y traslucidez del folículo y, por otra parte, obtener oocitos de diferentes grados de competencia y calidad (Siqueira Caixeta & Alves Nunes Dode, 2008).

Se han observado variaciones en la calidad, competencia y maduración de oocitos recuperados de ovarios procedentes de vacas sacrificadas en plantas de beneficio, utilizados en procesos de producción de embriones *in vitro*, variaciones que dependen de la etapa del ciclo estral, onda folicular, tamaño del folículo, edad del animal, raza, entre otros; de tal forma que la calidad del oocito es variable, al igual que el porcentaje de los mismos que se desarrollan hasta blastocisto (Yamamoto et al., 2010).

Los COCs se seleccionan con base en criterios tales como su morfología (número de capas de células, grosor y compactación de las capas de células del cúmulo y granulación o no del citoplasma) como lo describen Chaubal et al. (2006), de Loos et al. (1989), Leibfried y First (1979), sin embargo, estos criterios de selección suelen estar influenciados por evaluaciones cualitativas y suponen una dificultad para distinguir los oocitos competentes (Mirshamsi et al., 2013).

Existen pruebas como la de brillante azul de cresil (BCB), marcador de crecimiento de los oocitos, la cual se reduce a un estado incoloro por la glutamato sintasa, catalizada por la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) (Castaneda et al., 2013). La glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) es una enzima sintetizada en los oocitos en crecimiento, pero inactiva en los oocitos que han terminado esta fase. Por lo tanto, los oocitos que han completado su fase de crecimiento son azules (BCB +) porque la actividad de la G6PDH es muy baja para reducir la tinción, mientras que los oocitos en crecimiento permanecen incoloros (BCB-), porque la enzima está aún activa (Opiela & Kątska-Książkiewicz, 2013).

El propósito de este estudio fue determinar el peso y tamaño de los ovarios, la calidad de los folículos y del complejo cúmulos-oocito (COCs) en hembras cebú, para establecer diferencias entre el ovario derecho e izquierdo.

## Materiales y métodos

### Localización

La investigación se realizó en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), en el laboratorio de reproducción del Centro de Investigación (CI) La Libertad, ubicado en el kilómetro 17 vía Puerto López, departamento del Meta, a una altura de 467 m s.n.m. en Villavicencio, Meta, Colombia. Las actividades de experimentación y análisis se desarrollaron de marzo a julio del 2017.

### Material de estudio

Se seleccionaron previo al sacrificio, veintiséis vacas Cebú Brahman (*Bos indicus*) con edades entre cinco y ocho años, de las cuales se extrajeron los tractos reproductivos, que se transportaron al laboratorio donde se separaron los ovarios derecho e izquierdo en bolsas de colecta con solución salina (0,9 %) estéril a  $36 \pm 1$  °C. En total se obtuvieron 52 ovarios.

### Evaluación morfológica

Después de la separación de los ovarios derecho e izquierdo de los tractos reproductivos, se procedió a realizar una evaluación morfológica de los ovarios, folículos y complejos cúmulos-oocito.

### *Medición de ovarios*

El tamaño del ovario (longitud-ancho) se realizó por medición directa, con ayuda de un calibrador pie de rey o nonio graduado en milímetros y el peso se determinó con una balanza electrónica, Methler.

### *Obtención y clasificación de folículos*

Los folículos fueron extraídos por disección del estroma ovárico y depositados en una caja de Petri con solución de buffer fosfato (PBS) a 36 °C. La medición de tamaño se realizó con ayuda de un ocular graduado en un estereoscopio, Nikon SMZ 745; su clasificación se definió en tres grupos: <3 mm (TFI), entre 3 a 6 mm (TFII) y >6 mm (TFIII).

### *Calidad del folículo*

La determinación de la calidad morfológica de los folículos se realizó mediante la técnica de irrigación-traslucidez (TIT) basada en el nivel de irrigación del folículo, para ello, se utilizó un estereoscopio Nikon SMZ 745. Se consideró como folículo de buena calidad aquel que presentó irrigación visible (presencia de vasos sanguíneos) y tenía un aspecto traslúcido, como folículo de deficiente calidad se consideró aquel cuya irrigación fue imperceptible o nula y el aspecto de la pared folicular era poco traslúcido (Siqueira Caixeta & Alves Nunes Dode, 2008).

### *Calidad de complejo cúmulos-oocito*

Los complejos cúmulos-oocito (CCOs) se recuperaron con aspiración directa de los folículos ováricos y con ayuda de una micropipeta, se visualizaron con un estereoscopio Nikon SMZ 745 a 100X y se transfirieron a cajas de Petri que contenían microgotas de solución de PBS, las cuales se colocaron sobre una platina calentadora.

La evaluación de calidad de los COCs se basó en dos criterios, las características morfológicas y el estatus de crecimiento del oocito mediante la tinción con BCB.

Para evaluar los aspectos morfológicos de los COCs, se consideraron las características de las células del cúmulo y citoplasma del oocito, se modificó la técnica descrita por Chaubal et al. (2006), de Loos et al. (1989) y Leibfried y First (1979), que contempla una clasificación de cuatro categorías de calidad de los COCs (CI, CII, CIII, CIV) (Cuadro 1) y se redujo a una escala de tres categorías, que integra la categoría III y IV en una sola, por lo cual se tendría CI, CII y CIII.

En cuanto a la evaluación del crecimiento del oocito, se utilizó la tinción azul brillante de cresilo, para ello los CCOs se incubaron a 37 °C con BCB (26  $\mu$ M) en Dulbecco's PBS por 90 min en cámara de cultivo, para su posterior evaluación en una lámina portaobjeto, con ayuda de un microscopio. Se clasificaron los CCOs de acuerdo con lo indicado por Opiela & Kątska-Książkiewicz (2013). Los oocitos con citoplasma de coloración azul se clasifican como BCB+ que definen baja actividad G6PDH y los oocitos de citoplasma incoloro corresponden a oocitos BCB - (alta actividad G6PDH).

### **Análisis estadístico**

Todos los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico SAS ®. El análisis de la información se apoyó al inicio mediante la estadística descriptiva, se usó el procedimiento MEANS para estimar diferencias, análisis de

**Cuadro 1.** Criterios usados para la selección de los complejos cúmulos-oocito (COCs) en bovinos (*Bos indicus*) (escala descrita por Chaubal et al. (2006), de Loos et al. (1989) y Leibfried & First (1979)).

**Table 1.** Criteria used for the selection of cumulus-oocyte complexes (COCs) on bovine (*Bos indicus*) (scale described by Chaubal et al. (2006), de Loos et al. (1989), and Leibfried & First (1979)).

Grado de calidad	Características
CI	Oocitos con células del cúmulo mayor a cuatro capas y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente.
CII	Oocitos con células del cúmulo de 1 a 3 capas y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras.
CIII	Oocitos denudados, y citoplasma contraído, degenerado, vacuolado y fragmentado.
CIV	Oocitos denudados sin la presencia de células del cúmulo. La zona pelúcida puede o no estar intacta.

varianza. Para determinar el grado de asociación entre la calidad de los oocitos con las evaluaciones morfométricas consideradas, se realizó un análisis de correlación, con base en el agrupamiento por tamaño folicular determinado (I, II y III) y el lado al cual pertenecía el ovario muestreado (derecho o izquierdo), en los casos donde se presentaron diferencias estadísticas significativas, se usó la prueba de comparación de Bonferroni con un nivel de significancia del 5 %.

## Resultados

La longitud y peso del ovario derecho ( $2,90 \pm 0,64$  cm y  $8,24 \pm 3,29$  g) fueron mayores ( $p < 0,001$ ) a las del ovario izquierdo ( $2,53 \pm 0,57$  cm y  $5,68 \pm 2,59$  g). En cuanto al ancho del ovario, no se evidenciaron diferencias entre ovarios. Con respecto a la presentación del cuerpo lúteo, se evidenció un mayor porcentaje en el ovario derecho (84,6 vs 11,54 %).

De los 52 ovarios seleccionados, se obtuvieron 715 folículos, 368 en el ovario derecho y 347 en el ovario izquierdo. La mayor población de folículos por ovario ( $10,87 \pm 4,5$ ) correspondió a los  $< 3$  mm y la menor ( $0,56 \pm 0,7$ ) a folículos  $> 6$  mm ( $p < 0,05$ ). Esta misma diferencia se observó cuando se analizaron por separado los ovarios del lado derecho e izquierdo (Cuadro 2). No se encontraron diferencias entre los promedios del tamaño TFI, TFII y TFIII del ovario derecho e izquierdo.

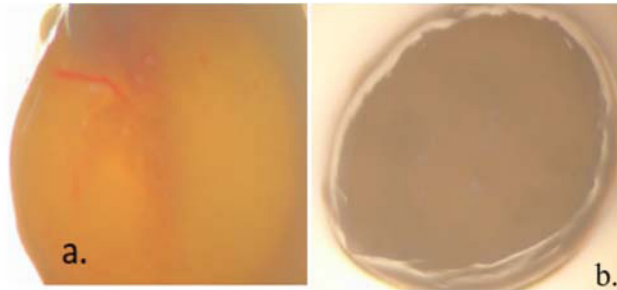
**Cuadro 2.** Número de folículos de diferentes categorías obtenidos de los ovarios derecho e izquierdo de vacas cebú comercial (*Bos indicus*). Laboratorio de reproducción del Centro de Investigación La Libertad, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Villavicencio, Meta, Colombia, 2017.

**Table 2.** Number of follicles of different categories obtained from the right and left ovaries of commercial zebu cows (*Bos indicus*). Reproduction laboratory of the La Libertad Research Center, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), Villavicencio, Meta, Colombia, 2017.

Estructura	TFI (<3 mm)	TFII (3-6 mm)	TFIII (>6 mm)	Folículos totales
Promedio ovario derecho	$11,08 \pm 5,41^{aA}$	$2,62 \pm 2,73^{bA}$	$0,46 \pm 0,51^{cA}$	368
Promedio ovario izquierdo	$10,61 \pm 3,60^{aA}$	$2,04 \pm 3,05^{bA}$	$0,65 \pm 0,85^{cA}$	347
Promedio general/ovario	$10,87 \pm 4,50^a$	$2,33 \pm 2,90^b$	$0,56 \pm 0,70^c$	---

TFI, TFII, TFIII clasificación del tamaño de los folículos. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes dentro de filas, indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). <sup>A</sup> Letras similares dentro de columnas para ovario derecho y ovario izquierdo no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). TFI, TFII, TFIII Follicle size classification. <sup>a, b, c</sup> Different letters within rows indicate significant difference ( $p < 0,05$ ). <sup>A</sup> similar letters within columns for right ovary and left ovary do not indicate significant differences ( $p > 0,05$ ).

El análisis de la calidad del folículo evaluada por TIT evidenció que el 88,5 % de ellos se clasificaron como de buena calidad y la población restante 11,5 % se clasificaron de calidad deficiente (Figura 1).



**Figura 1.** Imagen de evaluación de folículos de bovinos (*Bos indicus*), de buena y deficiente calidad. (a) Folículo irrigado y (b) folículo sin ningún nivel de irrigación. Laboratorio de Reproducción del centro de Investigación La libertad, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Villavicencio, Meta, Colombia. 2017.

**Figure 1.** Evaluation image of bovine (*Bos indicus*) follicles, of good and poor-quality. (a) Irrigated follicle and (b) follicle without any level of irrigation. Reproduction laboratory of the La Libertad Research Center, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), Villavicencio, Meta, Colombia. 2017.

Para la evaluación de la calidad oocitaria, se evaluaron 403 COCs, 222 del ovario derecho y 181 en el ovario izquierdo. El promedio de COCs por ovario fue de  $6,15 \pm 4,43$  para TFI y de  $0,24 \pm 0,86$  para TFIII ( $p < 0,05$ ). Los análisis para TFI y TFIII entre ovarios derecho e izquierdo no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), pero sí entre los de TFII (Cuadro 3).

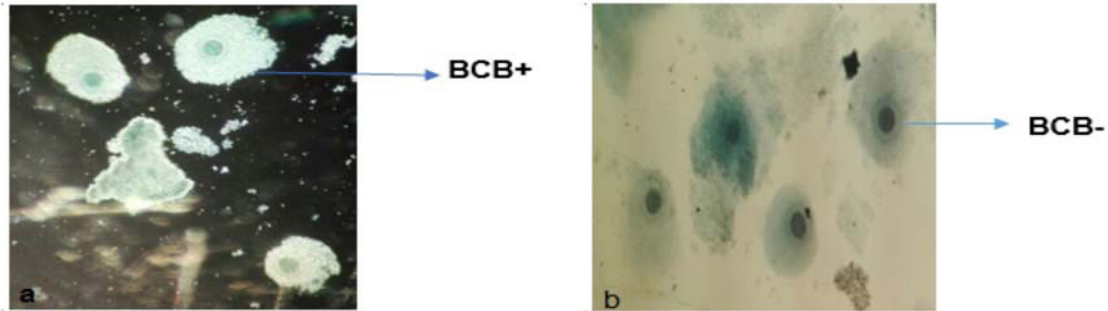
**Cuadro 3.** Número promedio de complejos cúmulos-oocito (COCs) recuperados de folículos de diferente tamaño de los ovarios derecho e izquierdo en vacas cebú (*Bos indicus*). Laboratorio de Reproducción del centro de Investigación La Libertad, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Villavicencio, Meta, Colombia. 2017.

**Table 3.** Average mean number of cumulus-oocyte complex (COCs) recovered from different sizes follicles from the right and left ovaries in zebu cows (*Bos indicus*). Reproduction laboratory of the La Libertad Research Center, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), Villavicencio, Meta, Colombia. 2017.

Estructuras	TFI (<3 mm)	TFII (3-6 mm)	TFIII (>6 mm)	COCs totales
Ovario derecho	$6,38 \pm 5,28^A$	$2,00 \pm 2,60^{bA}$	$0,15 \pm 0,36^{cA}$	222
Ovario izquierdo	$5,96 \pm 4,43^{aA}$	$0,65 \pm 1,29^{bB}$	$0,34 \pm 0,74^{aA}$	181
Promedio General	$6,15 \pm 4,62^a$	$1,28 \pm 1,95^b$	$0,24 \pm 0,86^c$	-

TFI, TFII, TFIII: clasificación de folículos por tamaño. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes dentro de filas, indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). <sup>ABC</sup> Letras diferentes dentro de columnas para el ovario derecho y ovario izquierdo indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). / TFI, TFII, TFIII: classification of follicles by size. <sup>a, b, c</sup> Different letters within rows indicate significant difference ( $p < 0.05$ ). <sup>ABC</sup> Different letters within columns for the right ovary and left ovary indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

En el estudio de calidad del COCs ( $n=403$ ), se identificaron 93 como CI, 115 CII y 195 CIII. Se evidenció que el 48 % de los COCs fueron de calidad CIII. Con respecto a los oocitos provenientes del ovario derecho ( $n=222$ ), los resultados mostraron para CI: 53, CII: 70 y CIII: 99, mientras que para el izquierdo ( $n=181$ ) la respuesta fue para CI: 40, CII: 45 y CIII: 96. La prueba indirecta de competencia oocitaria COCs mediante BCB, evidenció 224 (55,8 %) como BCB- (Figura 2b) y 179 (44,2 %) como BCB+ (Figura 2a).



**Figura 2.** Complejos cúmulo-ooocito (COCs) en bovinos (*Bos indicus*), teñidos con azul brillante de cresil. (a) BCB+ positiva a glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. (b) BCB- negativa a glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Laboratorio de reproducción del Centro de Investigación La Libertad, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Villavicencio, Meta, Colombia. 2017.

**Figure 2.** Cumulus-oocyte complex (COCs) on bovinos (*Bos indicus*) stained with brilliant cresyl blue. (a) BCB + positive to glucose-6-phosphate dehydrogenase. (b) BCB- negative to glucose-6-phosphate dehydrogenase. Reproduction laboratory of the La Libertad, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), Villavicencio, Meta, Colombia. 2017.

Los promedios de cúmulo-ooocito (COCs) en bovinos por calidad oocitaria para cada uno de los tamaños foliculares del ovario derecho e izquierdo, se describen en el Cuadro 4. Solo se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el ovario derecho e izquierdo en los COCs obtenidos de folículos TFII (3-6 mm) y clasificados con calidad CIII.

**Cuadro 4.** Número promedio de cúmulo-ooocito (COCs) en bovinos (*Bos indicus*), clasificados por grado de calidad, obtenidos de los diferentes tamaños de folículos de ovarios derecho e izquierdo Laboratorio de Reproducción del centro de Investigación La Libertad, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Villavicencio, Meta, Colombia. 2017.

**Table 4.** Average number of cumulus-oocyte complex (COCs) on bovinos (*Bos indicus*) classified by quality grade obtained from the different sizes of right and left ovarian follicles. Reproduction laboratory of the La Libertad Research Center, Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), Villavicencio, Meta, Colombia. 2017.

Tamaño (mm)	Calidad	COCs (n)	Promedios COCs ovario derecho	Promedios COCs ovario izquierdo
TFI (<3)	CI	73	1,42 ± 2,21 <sup>a</sup>	1,38 ± 1,79 <sup>a</sup>
	CII	90	2,15 ± 2,37 <sup>a</sup>	1,30 ± 1,56 <sup>a</sup>
	CIII	158	2,80 ± 2,38 <sup>a</sup>	3,26 ± 3,40 <sup>a</sup>
TFII (3-6)	CI	20	0,61 ± 1,16 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,36 <sup>a</sup>
	CII	16	0,42 ± 0,75 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,49 <sup>a</sup>
	CIII	33	0,96 ± 1,45 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,78 <sup>b</sup>
TFIII (>6)	CI	-	-	-
	CII	9	0,11 ± 0,32 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,65 <sup>a</sup>
	CIII	4	0,13 ± 0,196 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,32 <sup>a</sup>

TF: tamaño de folículo. Media ± EE; medias con letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ) / TF: follicle size. Mean ± SEM; means with different letters in the same row indicate significant differences between groups ( $p < 0,05$ ).

## Discusión

La longitud promedio de los ovarios en esta investigación fue de  $2,7 \pm 0,6$  cm, similar a los clasificados como medianos (2,5 a 3,5 cm) por Alba Gómez et al. (2006). En tanto que, los promedios para longitud y ancho fueron similares a los reportados por Neves et al. (2002), Sánchez (2007) y a los que describe como medianos Alba Gómez et al. (2006).

Los resultados obtenidos al compararlos, señalan un mismo comportamiento de mayor conformación y peso en el ovario derecho que en el izquierdo, estos aspectos confirman su mayor funcionalidad, que se corrobora en este estudio por la mayor presentación de cuerpos lúteos en los ovarios derechos con respecto a los izquierdos (84,6 vs 11,54 %). Este tipo de resultados de características anatómicas del tracto reproductivo permiten el uso de nuevas herramientas en el diagnóstico ginecológico de la hembra bovina.

Las estructuras foliculares recuperadas en esta investigación fueron de 368 en el ovario derecho que superaron las 347 estructuras en el ovario izquierdo. Este mayor número de estructuras se debió a una mayor perfusión sanguínea intraovárica y más eficiente en este ovario que se asocia a un mayor número de ovulaciones (Ginther, 2019).

Con respecto al promedio de estructuras foliculares de  $<3$  mm, no se encontraron diferencias significativas entre el ovario derecho e izquierdo, a pesar de esto, el mayor número encontrado en el ovario derecho infirió en una mayor actividad de este ovario tal como lo reportaron Dorice et al. (2019) y González Tous et al. (2014). El promedio de las estructuras foliculares de 3 y 6 mm por el ovario fue de  $2,33 \pm 2,9$ , lo cual coincide con las de folículos aspirados mediante ultrasonografía en vacas (Ginther & Hoffman, 2014; Nunes-Dode et al., 2001) y en folículos obtenidos por métodos de disección folicular en ovarios de búfalos (Quintana et al., 2012).

La evaluación del COCs con base en las características del cúmulo y del citoplasma, evidenció que el 23 % de los folículos  $<3$  mm (TFI) tuvieron COCs de buena calidad (CI). Estos resultados son inferiores, a los reportados por Leal et al. (2010) (31,8 %) y por Quintana et al. (2012) (37,46 %) en vacas.

El 28 % de los COCs fueron de calidad regular (CIII) inferior al reportado en aspiración guiada por ultrasonido en vacas y novillas (Rizos et al., 2005), y mayor al reportado en búfalos con técnicas de aspiración y disección de folículos (22 %) (Leal et al., 2010; Quintana et al., 2012).

Solo se observaron diferencias significativas entre los ovarios ( $p < 0,05$ ) en el porcentaje de CCOs de TFII y calidad CIII, aunque son estructuras que no se tienen en cuenta en procesos *in vitro*, respaldan una mayor actividad de crecimiento folicular en el ovario derecho. Asimismo, al comparar los porcentajes de CI y CII para TFI y TFII, se observó un mayor número CCOs de buena calidad en el ovario derecho, lo cual, según Ginther y Gómez-León (2020), puede explicar la mayor frecuencia de ovulaciones observadas en él, debido a su mayor irrigación o a la presencia de mayor número de cuerpos lúteos, como se observó en esta investigación y en el estudio de Argudo et al. (2020). Estas características en los ovarios conllevan a una mejor competencia de los folículos en el proceso de crecimiento, sin embargo, se necesitan más estudios para confirmarlo.

Se evidenció que la calidad de los CCOs aptos para procesos de fertilización *in vitro* (CI y CII), presentaron un mayor porcentaje al reportado por otros autores (Pontes et al., 2011) e inferior a los descritos por Dorice et al. (2019), Estrella et al. (2017), Saini et al. (2015), Moreira Viana et al. (2004) y Viana et al. (2010). Con respecto a lo anterior, algunos de los factores reportados que inciden en la calidad de CCOs son la edad de las vacas (Yamamoto et al., 2010), etapa del ciclo estral (Tan & Lu, 1990), factores hormonales (Kruip & Dieleman, 1982), diámetro folicular (Lonergan et al., 1994; Pavlok et al., 1992; Tan & Lu, 1990; Wurth et al., 1994), morfología ovárica (Gandolfi et al., 2005), método y frecuencia de colecta de oocitos, y estrés térmico (Souza-Cácares et al., 2019).

El oocito se desarrolla en el folículo dentro del ovario, donde adquiere su competencia para ser fertilizado y generar un embrión. Si se observa la diferencia obtenida de los folículos de buena y baja calidad, y la que se obtiene en los procesos de maduración oocitaria, este indicador es un buen predictor de selección de la calidad del oocito y sería una herramienta más para los procesos de investigación *in vitro* que utiliza ovarios obtenidos de salas de beneficio.



En esta investigación el 44,2 % de los COCs presentaron baja actividad G6PHD (BCB+), valor cercano al 45,6 % reportado por Mirshamsi et al. (2013), pero superior al 40,59 % de Bhojwani et al. (2007), 35,71 % de Castaneda et al. (2013) y 33,5 % de Pujol et al. (2004). La respuesta encontrada en el trabajo se puede atribuir a que los COCs procedían de ovarios de hembras adultas (Saini et al., 2015). En estudios se encontraron que los oocitos BCB- produjeron tasas más bajas de blastocistos al día ocho de cultivo *in vitro*, en comparación con los oocitos BCB+ (Torner et al., 2008), similar a lo reportado por Opiela et al. (2008) y por Lamas-Toranzo et al. (2018). Con relación a este tipo de oocitos evaluados, Rodríguez et al. (2003) indicaron que tienen una mayor expresión del factor promotor de la maduración y actividad mitocondrial, otros factores que inciden en la competencia oocitaria, como una mayor proporción de oocitos BCB+ en función de la presencia de un cuerpo lúteo y asimismo una mayor tasa de producción de blastocistos (Argudo et al., 2020).

## Conclusiones

El ovario derecho presentó un mayor tamaño y peso, mayor número de estructuras foliculares y mayor número de cúmulos-ooocito (COCs) en bovinos, de los cuales el 52 % fueron de oocitos de buena calidad aptos para procesos de fertilización *in vitro*.

La calidad de folículo valorada por la presencia de irrigación sanguínea y translucidez para este estudio, indica valores de folículos de buena calidad en un 88,56 %.

La prueba de azul brillante de cresil (BCB) y la valoración microscópica del aspecto del citoplasma y cúmulos como indicadores de evaluación de calidad oocitaria, mostraron respuestas similares que permitirían su utilización en forma paralela para mejorar el diagnóstico de los oocitos aptos con respuesta positiva a la eficiencia de competencia oocitaria y por ende, de su fertilización y desarrollo embrionario.

La calidad oocitaria disminuyó a medida que se incrementó el tamaño del folículo, lo cual constituye como un buen indicador en la selección de COCs para los procesos de fertilización *in vitro*.

Esta investigación permite tener una visión de las características estructurales del ovario en bovinos Cebú-Brahman, pero es necesario profundizar en técnicas que permitan mejorar la evaluación de la competencia oocitaria.

## Referencias

- Alba Gómez, L. O., Rodríguez Galindo, A., Gómez Palmero, A., & Silveira Prado, E. A. (2006). Tamaño y forma de los ovarios y del cérvix de hembras cebu de Cuba y sus relaciones con la eficiencia reproductiva. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 7(3), 1–12.
- Alm, H., Torner, H., Löhrke, B., Viergutz, T., Ghoneim, I. M., & Kanitz, W. (2005). Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology*, 63(8), 2194–2205. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.050>
- Argudo, D. E., Tenemaza, M. A., Merchán, S. L., Balvoa, J. A., Méndez, M. S., Soria, M. E., Galarza, L. R., Ayala, L. E., Hernández-Fonseca, H. J., Perea, M. S., & Perea, F. P. (2020). Intraovarian influence of bovine corpus luteum on oocyte morphometry and developmental competence, embryo production and cryotolerance. *Theriogenology*, 155, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.044>
- Bhojwani, S., Alm, H., Torner, H., Kanitz, W., & Poehland, R. (2007). Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, 67(2), 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.08.006>

- Castaneda, C. A., Kaye, P., Pantaleon, M., Phillips, N., Norman, S., Fry, R., & D'Occhio, M. J. (2013). Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. *Theriogenology*, *79*(3), 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.006>
- Chaubal, S. A., Molina, J. A., Ohlrichs, C. L., Ferre, L. B., Faber, D. C., Bols, P. E. J., Riesen, J. W., Tian, X., & Yang, X. (2006). Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology*, *65*(8), 1631–1648. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.020>
- de Loos, F., van Vliet, C., van Maurik, P., & Kruij, T. A. M. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*, *24*(2), 197–204. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120240207>
- Dorice, A. K., Ferdinand, N., Justin, K., Augustave, K., & Linda, K. K. (2019). Effects of breed, age, body condition score, and nutritional status on follicular population, oocyte yield, and quality in three Cameroonian zebu cattle *Bos indicus*. *Advances in Agriculture*, 2019, Article 2979740. <https://doi.org/10.1155/2019/2979740>
- Dyce, K. M., Sack, W. O., & Wensing, C. J. G. (1991). *Anatomía veterinaria*. Médica Panamericana.
- Estrella, C., Suconota, G., & Ayala, L. (2017). Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes. *Maskana*, *8*, 101–103. <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1499>
- Filipiak, Y., Viqueira, M., & Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)*, *52*(202), 14–22. [https://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/253-Bielli.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/253-Bielli.pdf)
- Fukuda, M., Fukuda, K., Andersen, C. Y., & Byskov, A. G. (2000). Right-sided ovulation favours pregnancy more than left-sided ovulation. *Human Reproduction*, *15*(9), 1921–1926. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.9.1921>
- Gandolfi, F., Brevini, T. A. L., Cillo, F., & Antonini, S. (2005). Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Revue Scientifique et Technique*, *24*(1), 413–423. <https://doi.org/10.20506/rst.24.1.1580>
- Gereš, D., Ževrnja, B., Žubčić, D., Zobel, R., Vulić, B., Staklarević, N., & Gracin, K. (2011). Asymmetrical functional activities of ovaries and tubular part of reproductive organs of dairy cows. *Veterinarski Arhiv*, *81*(2), 187–198. <https://hrcak.srce.hr/file/100549>
- Ginther, O. J. (2019). Intraovarian spatial and vascular harmony between follicles and corpus luteum in monovulatory heifers, mares, and women. *Theriogenology*, *128*, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.019>
- Ginther, O. J., & Danguubiyam, S. V. (2019). Role of intraovarian mechanisms and side of ovary on characteristics of follicle selection in *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, *135*, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.027>
- Ginther, O. J., & Gomez-León, V. E. (2020). Intraovarianism and differences in ovulation frequency between left and right ovaries in *Bos taurus* heifers. *Reproductive Biology*, *20*(3), 333–337. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.05.006>
- Ginther, O. J., & Hoffman, M. M. (2014). Intraovarian effect of dominant follicle and corpus luteum on number of follicles during a follicular wave in heifers. *Theriogenology*, *82*(1), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.03.013>
- González Tous, M., Pastrana Puche, N., Barón Pinedo, F., & Vertel Morrison, M. (2014). Frecuencia de presentación de gestación con relación al cuerno uterino en bovinos del trópico colombiano. *Revista de Medicina Veterinaria*, *28*, 13–21.

- Karami-Shabankareh, H., & Mirshamsi, S. M. (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*(1–3), 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.02.017>
- Kruij, T. A. M., & Dieleman, S. J. (1982). Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reproduction Nutrition Développement*, *22*(3), 465–473. <https://doi.org/10.1051/rnd:19820403>
- Lamas-Toranzo, I., Pericuesta, E., & Bermejo-Álvarez, P. (2018). Mitochondrial and metabolic adjustments during the final phase of follicular development prior to IVM of bovine oocytes. *Theriogenology*, *119*, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.07.007>
- Leal, L. S., Moya-Araújo, C. F., Fernandes, C. B., Martins, L. R., Landim-Alvarenga F.C., & Oba, E. (2010). Evaluation of recovery, quality and *in vitro* nuclear maturation of oocytes obtained from Buffalo and Bovine Ovaries. *Revista Veterinaria*, *21*(Supplement 1), 892–894.
- Leibfried, L., & First, N. L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *Journal of Animal Science*, *48*(1), 76–86. <https://doi.org/10.2527/jas1979.48176x>
- Lequarre, A. -S., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbiès-Tran, R., Callesen, H., & Mermillod, P. (2005). Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology*, *63*(3), 841–859. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.015>
- Loneragan, P., Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., Pintado, B., de La Fuente, J., & Boland, M. P. (2003). Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected *in vitro* or *in vivo* before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Molecular Reproduction and Development*, *66*(3), 297–305. <https://doi.org/10.1002/mrd.10357>
- Loneragan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M. P., & Gordon, I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, *37*(1), 48–53. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080370107>
- Machatkova, M., Krausova, K., Jokesova, E., & Tomanek, M. (2004). Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, *61*(2–3), 329–335. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00216-4)
- Mirshamsi, S. M., KaramiShabankareh, H., Ahmadi-Hamedani, M., Soltani, L., Hajarjian, H., & Abdolmohammadi, A. R. (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*(4), 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.11.002>
- Moreira Viana, J. H., de Almeida Camargo, L. S., de Moraes Ferreira, A., Ferreira de Sa, W., de Carvalho Fernandes, C. A., & de Pinho Marques Junior, A. (2004). Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science*, *84*(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.002>
- Neves, M. M., Marques Jr, A. P., Santana, C. V., Lima, F. P. C., & Zambrano, W. J. (2002). Características de ovários de fêmeas zebu (*Bos taurus indicus*), colhidos em abatedouros. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *54*(6), 651–654. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352002000600016>

- Nunes-Dode, M. A., Rodovalho, N. C., Ueno, V. G., & Alves, R. G. O. (2001). Oocyte recovering from *Bos indicus* females. *Arch Zootec.*, *50*, 415–418.
- Opiela, J., & Kątska-Książkiewicz, L. (2013). The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for *in vitro* embryo production (IVP). *Reproductive Biology*, *13*(3), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.07.004>
- Opiela, J., Kątska-Książkiewicz, L., Lipiński, D., Słomski, R., Bzowska, M., & Ryńska, 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*(5), 546–555. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.11.001>
- Pavlok, A., Lucas-Hahn, A., & Niemann, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, *31*(1), 63–67. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080310111>
- Pontes, J. H. F., Melo Sterza, F. A., Basso, A. C., Ferreira, C. R., Sanches, B. V., Rubin, K. C. P., & Seneda, M. M. (2011). Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, *75*(9), 1640–1646. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.026>
- Pujol, M., López-Béjar, M., & Paramio, M. -T. (2004). Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, *61*(4), 735–744. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00250-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00250-4)
- Quintana, M. D., Campos, P. E. C., Herrera, P., Gallego, C., & Padrón, E. (2012). Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización *in vitro* FIV obtenidos de hembras *Bubalus bubalis* enviadas a matadero. *Revista de Salud Animal*, *34*(1), 53–56. <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/73>
- Rizos, D., Burke, L., Duffy, P., Wade, M., Mee, J. F., O'Farrell, K. J., MacSiurtain, M., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2005). Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. *Theriogenology*, *63*(3), 939–949. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.008>
- Rodríguez, E., López, M., Izquierdo, D., & Paramio, M. (2003). Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reproduction Nutrition Development*, *43*(2), 179–87. <https://doi.org/10.1051/rnd:2003012>
- Saini, N., Singh, M. K., Shah, S. M., Singh, K. P., Kaushik, R., Manik, R. S., Singla, S. K., Palta, P., & Chauhan, M. S. (2015). Developmental competence of different quality bovine oocytes retrieved through ovum pick-up following *in vitro* maturation and fertilization. *Animal*, *9*(12), 1979–1985. <https://doi.org/10.1017/S1751731115001226>
- Sánchez, A. (2007). Morfometría ovárica de hembras Cebú (*Bos Indicus*). *Cultura Científica*, *5*, 61–64. [https://revista.jdc.edu.co/index.php/Cult\\_cient/article/view/324](https://revista.jdc.edu.co/index.php/Cult_cient/article/view/324)
- Siqueira Caixeta, E., & Alves Nunes Dode, M. (2008). *Dissecação folicular: um método eficiente para estudos de competência ovocitária*. Embrapa Genetic Resources & Biotechnology. <https://bit.ly/3MfnGf4>
- Souza-Cácares, M. B., Fialho, A. L. L., Silva, W. A. L., Cardoso, C. J. T., Pöhland, R., Martins, M. I. M., & Melo-Sterza, F. A. (2019). Oocyte quality and heat shock proteins in oocytes from bovine breeds adapted to the tropics under different conditions of environmental thermal stress. *Theriogenology*, *130*, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.039>

- Stevenson, J. S. (2019). Spatial relationships of ovarian follicles and luteal structures in dairy cows subjected to ovulation synchronization: Progesterone and risks for luteolysis, ovulation, and pregnancy. *Journal of Dairy Science*, *102*(6), 5686–5698. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16036>
- Tan, S. J., & Lu, K. H. (1990). Effects of different oestrous stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology*, *33*(1), 335. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90759-M](https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90759-M)
- Turner, H., Ghanem, N., Ambros, C., Hölker, M., Tomek, W., Phatsara, C., Alm, H., Sirard, M.-A., Kanitz, W., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2008). Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction*, *135*(2), 197–212. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0348>
- Viana, J. H. M., Palhao, M. P., Siqueira, L. G. B., Fonseca, J. F., & Camargo, L. S. A. (2010). Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*, *73*(7), 966–972. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.025>
- Wurth, Y. A., Boni, R., Hulshof, S. C. J., & Kruij, T. A. M. (1994). *Bovine embryo production in vitro after selection of ovaries, follicles and oocytes*. Utrecht University Press.
- Yamamoto, T., Iwata, H., Goto, H., Shiratuki, S., Tanaka, H., Monji, Y., & Kuwayama, T. (2010). Effect of maternal age on the developmental competence and progression of nuclear maturation in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, *77*(7), 595–604. <https://doi.org/10.1002/mrd.21188>