

Análisis morfométrico y funcional de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero y por aspiración folicular transvaginal en vacas criollas del altiplano ecuatoriano

Morphometric and functional analysis of bovine oocytes obtained from abattoir ovaries and by transvaginal follicle aspiration in creole cows of the Ecuadorian Andean highland

Jhonatan Alvarado U.¹, Daniel Argudo G.¹, Ulises Iñiguez G.², Patricio Bueno L.²,
Maria Silvana Méndez A.¹, Manuel Soria P.¹, Fernando P. Perea G.^{5,6},
Diego Andres Galarza L.¹

RESUMEN

El estudio analizó las características morfométricas y funcionales de ovocitos de 10 vacas nativas de los Andes ecuatorianos, colectados por aspiración folicular transvaginal (OPU) y de ovocitos colectados *post mortem* (PM) de ovarios de matadero. Para este propósito, 1157 complejos cúmulo-ovocito (CCOs) del grupo OPU (n=271) y PM (n=886) fueron recuperados en 10 repeticiones por grupo por aspiración folicular a 90 mm Hg de presión y clasificados en calidad A, B o C, de acuerdo con las características del citoplasma y células del cúmulo. Se determinó la actividad de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) y la integridad de la membrana plasmática tiñendo dos grupos de CCOs con azul brillante de cresilo (BCB+) y azul de tripán, respectivamente. Se evaluó el tamaño (diámetro y volumen) de los ovocitos usando un software CaptaVision® (v. 5.1). Los datos se analizaron por regresión logística y por el modelo lineal general del SAS, y las medias se compararon por el método de los mínimos cuadrados. Los resultados mostraron que los ovocitos del grupo PM presentaron mayor diámetro (126.0 ± 0.48 vs 122.7 ± 0.79 μm ; $p < 0.01$) e integridad de la membrana plasmática (86.0 vs 76.8%; $p < 0.05$) que el grupo OPU. Sin embargo, los ovocitos de calidad A y B no

Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador

² Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Cuenca, Ecuador

³ Capacitación Profesional Veterinaria, C-PROVET, Cuenca, Ecuador

⁴ Unidad Académica de Salud y Bienestar, Universidad Católica de Cuenca, Cuenca, Ecuador

⁵ Departamento de Ciencias Agrarias, Universidad de Los Andes, Trujillo, Venezuela

⁶ E-mail: ferromi9@gmail.com

Recibido: 8 de junio de 2019

Aceptado para publicación: 7 de abril de 2020

Publicado: 22 de junio de 2020

registraron diferencias significativas entre grupos con respecto a la integridad de la membrana plasmática y valores de BCB+. Los resultados sugieren que, a pesar de que el tamaño y la viabilidad fue más afectada en los ovocitos aspirados por OPU, los de calidad A y B provenientes de ambas fuentes mostraron valores similares con respecto a la integridad de la membrana plasmática y condición metabólica para proseguir la maduración.

Palabras clave: bovinos criollos, ovocitos, morfometría, BCB, viabilidad

ABSTRACT

This study assessed the morphometric and functional characteristics of oocytes from 10 native cows to the Ecuadorian Andes, collected by transvaginal follicular aspiration (OPU) and oocytes collected *post mortem* (PM) from abattoir ovaries. For this purpose, 1157 cumulus-oocyte complexes (CCOs) of the OPU group (n=271) and PM group (n=886) were recovered in 10 repetitions per group by follicular aspiration at 90 mm Hg pressure and classified as A, B or C, according to the characteristics of the cytoplasm and cumulus cells. The activity of the enzyme glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) and the integrity of the plasma membrane was determined by staining two groups of CCOs with cresyl brilliant blue (BCB+) and trypan blue, respectively. The size (diameter and volume) of the oocytes was evaluated using CaptaVisio® software v. 5.1. The data were analysed by logistic regression and by the SAS general linear model, and the means were compared by the least square method. The results showed that the oocytes of the PM group had a larger diameter (126.0 ± 0.48 vs. 122.7 ± 0.79 μm ; $p < 0.01$) and integrity of the plasma membrane (86.0 vs. 76.8%; $p < 0.05$) than the OPU group. However, quality A and B oocytes did not show significant differences between groups with respect to plasma membrane integrity and BCB+ values. The results suggest that, although the fact that the size and viability were more affected in the oocytes aspirated by OPU, those of quality A and B from both sources showed similar values regarding the integrity of the plasma membrane and metabolic condition to continue maturation.

Key words: indigenous cows, oocytes, morphometry, BCB, viability

INTRODUCCIÓN

En Ecuador existe una vasta población de bovinos de razas con aptitud lechera que se han establecido bajo diversas modalidades de sistemas de producción (intensivo, semiintensivo o al sogueo). Esto ha conducido a que las razas de bovinos nativos del altiplano del sur de Ecuador, cuya población se ha reducido considerablemente hasta el riesgo de extinción, se haya establecido como un sistema tradicional de crianza de la población

indígena rural (Aguirre *et al.*, 2011). En este sentido, Aguirre *et al.* (2014) hicieron una caracterización genética de los bovinos criollos de la región sur del Ecuador, determinando que tienen un gran distanciamiento con las razas cebuinas, y que sus troncos ancestrales están mayormente vinculados con las poblaciones ibéricas.

La conservación de estos grupos de bovinos autóctonos es de suma importancia para preservar esta fuente de biodiversidad genética, lo cual pudiera lograrse mediante la

aplicación de biotecnologías reproductivas. La literatura indica que no existen programas reproductivos que involucren la conservación de gametos (espermatozoides y ovocitos) o embriones provenientes de grupos bovinos nativos en Ecuador. En el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca se han desarrollado protocolos de criopreservación de gametos y embriones de bovinos criollos con el fin de establecer bancos de germoplasma (Alvarado *et al.*, 2018; Argudo *et al.*, 2019; Méndez *et al.*, 2019), lo cual constituye un punto de partida para la preservación de este valioso patrimonio genético.

Existen dos procedimientos para la recolección de ovocitos bovinos, uno *post mortem*, de ovarios de matadero, y otro *in vivo*, mediante la aspiración folicular guiada por ultrasonografía (*ovum pick-up*, OPU). El primero ha sido usado ampliamente como fuente de ovocitos para optimizar las diferentes etapas del proceso de producción *in vitro* de embriones (Manjunatha *et al.*, 2008; Alvares *et al.*, 2016), así como modelo experimental para estudiar aspectos biológicos relacionados con la producción *in vitro* de embriones en mamíferos (Nagai *et al.*, 2001). El segundo ha sido aplicado para obtener material genético de animales superiores con el fin de mejorar la productividad de las operaciones comerciales bovinas (Bizarro *et al.*, 2016). Esta técnica tiene un amplio campo de aplicación para coleccionar germoplasma de especies silvestres y de grupos genéticos en riesgo de extinción (Li *et al.*, 2007; Berlinguer *et al.*, 2008), incluyendo el bovino criollo latinoamericano en permanente estado de amenaza.

En consecuencia, y al contar con un número reducido de bovinos criollos, la técnica de aspiración *in vivo* de ovocitos podría ser una práctica biotecnológica para conservar el material genético e incrementar el número de animales. Sin embargo, procedimientos básicos sobre la calidad, tamaño y funcionalidad (que incluye integridad de la membrana plasmática y proceso de maduración)

de los ovocitos requiere ser investigado previo a los procedimientos de fertilización *in vitro* (FIV) y producción de embriones. Debido a esto, el estudio tuvo por objetivo evaluar las características morfométricas y funcionales de ovocitos de vacas criollas ecuatorianas y compararlos con ovocitos obtenidos de ovarios de matadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, ubicado en la Granja Irquis, parroquia Victoria del Portete en la provincia del Azuay, a una altura de 2648 msnm.

Fuente de Ovocitos

Diez vaquillas (24-36 meses) con rasgos morfológicos y fanerópticos de animales nativos de las alturas de los Andes ecuatorianos (≥ 3000 msnm), no lactantes y clínicamente sanas fueron sometidas a repetidas aspiraciones foliculares por un periodo de tres meses. Las vaquillas fueron alojadas en la granja bajo pastoreo rotacional [Ryegrass (*Lolium perenne*) y kikuyo (*Pennisetum clandestinum*)] y sanidad controlada. La manipulación de los animales y la aplicación de los procedimientos biotecnológicos fueron desarrollados de acuerdo con las normas de bioseguridad y bienestar animal.

El procedimiento de OPU fue realizado una vez por semana en las instalaciones de la granja (10 sesiones con un total 100 aspiraciones), y la búsqueda de ovocitos se hizo inmediatamente después de la aspiración folicular. Asimismo, y con fines comparativos, se coleccionaron ovarios de vacas de un matadero local una vez por semana, coincidiendo con el procedimiento de OPU. El tiempo entre el sacrificio de los animales y la llegada de los ovarios al laboratorio en envases

térmicos con solución fisiológica a 30 °C fue en un máximo de tres horas. Las vacas de matadero pertenecían a un grupo aleatorio de vacas multíparas lecheras (Holstein, Pardo Suizo, mestizas y criollas) no gestantes, sacrificadas por descarte.

Se llegó a recolectar 1157 complejos cúmulo-ovocito (CCOs) bovinos. De estos 217 del grupo OPU y 886 del grupo de matadero mediante recuperación de ovarios *post mortem* (PM).

Aspiración Folicular Transvaginal

La aspiración folicular transvaginal por OPU fue realizada previa sedación de las vacas criollas con xilacina al 2% (0.02 mg/kg). Las vacas fueron inmovilizadas en un brete, vaciado el contenido rectal, y aplicada una dosis de anestésico epidural con Bupivacaina al 0.5% (0.3 mg/kg). El procedimiento de aspiración se llevó a cabo con un ecógrafo Aloka (Prosound 2, Tokio, Japón) provisto de un transductor convexo de 5 MHz acoplado a una guía de aspiración. Este dispositivo estaba conformado por una aguja de 18G x 75 mm conectada a una tubería plástica de 1 mm de diámetro y 2 m de longitud, y a una bomba de vacío (WTABV 003D®, Cravinhos, Brasil) regulada a 90 mmHg, que condujo el líquido folicular por succión a un tubo estéril de 50 ml.

Los CCOs fueron colectados en una solución buffer fosfato salino (PBS, Sigma, P-4417) a 38.5 °C, suplementada con 1% de suero fetal bovino y 10 UI/ml de heparina. El líquido colectado fue llevado al laboratorio, filtrado y lavado con PBS atemperado a 38.5 °C. El líquido filtrado fue vertido en una caja de búsqueda de 95 mm, y los CCOs fueron identificados bajo un estereoscopio (Nikon SMZ 745T, Tokio, Japón). La selección de los CCOs se hizo al lavar las estructuras tres veces en fluido oviductal sintético buferado con Hepes (hSOF). Luego, los CCOs fueron

categorizados en calidad A, B o C según los criterios descritos por Hawk y Wall (1994), quienes consideraron características del citoplasma, zona pelúcida y células del cúmulo.

Aspiración Folicular de Ovarios de Matadero

Los ovarios obtenidos en el matadero fueron lavados sucesivamente en solución fisiológica estéril temperada a 37 °C, y el tejido circundante fue removido. Se aspiraron los folículos con diámetros entre 2 y 8 mm con el mismo equipo, la misma presión de vacío y línea de aspiración que la usada con el procedimiento OPU. Asimismo, el lavado, filtrado, búsqueda y clasificación de los COCs fue similar al efectuado con el procedimiento OPU.

Evaluación de los Ovocitos

Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)

Un grupo de CCOs recuperados *post mortem* de ovarios de matadero (n=464) y mediante OPU (n=137), clasificados según su calidad, fueron incubados con azul brillante de cresilo (BCB, 26 µM) diluido en hSOF por 90 minutos, en una atmósfera a 38.5 °C, 90% de humedad y 5% de CO₂. Luego de lavarse tres veces en hSOF, los COCs fueron diferenciados en dos grupos dependiendo si el citoplasma estaba teñido (BCB+) o no (BCB-) de color azul, registrándose el número de ovocitos por categoría. La G6PD es una enzima que está presente durante el periodo de crecimiento ovocitario, pero cuya actividad desaparece o se reduce sustancialmente cuando los ovocitos culminan la fase de crecimiento. Así, debido a la ausencia de la enzima, los ovocitos que han terminado el crecimiento conservan la coloración azul en el citoplasma, mientras que, en los no teñidos, la actividad enzimática degrada el colorante.

Integridad de la membrana plasmática del ovocito

Otro grupo de CCOs obtenidos PM (n=422) y por OPU (n=134) fueron incubados en una solución de PBS al 0.15% del colorante azul tripán durante 10 minutos. Inmediatamente, los ovocitos fueron lavados tres veces en PBS y se observaron en un microscopio óptico para determinar si el citoplasma estaba teñido o no de color azul, y se registró el número de cada grupo. Esta tinción es usada para determinar el estado de la membrana plasmática del ovocito o viabilidad celular por exclusión de captación, debido a que la selectividad de la membrana plasmática de las células vivas impide la penetración del colorante, mientras que en las muertas ocurre libremente.

Morfometría Ovocitaria

Los ovocitos usados para la determinación de la actividad de la enzima G6PD y la viabilidad ovocitaria fueron incubados por un minuto en una solución de hialuronidasa en hSOF (1 mg/ml; p/v) y separados de las células del cúmulo por pipeteo sucesivo. Luego de lavados tres veces en hSOF, los ovocitos fueron fotografiados con una cámara digital (Excelis AU-600-HD; USA) acoplada a un microscopio de contraste de fase (Olympus CX31, Japón) y el diámetro de cada uno (excluyendo la zona pelúcida) medido con el software CaptaVision (v. 5.1, Accu-Scope, USA) diseñado para realizar mediciones microscópicas.

Análisis Estadístico

Las proporciones de ovocitos fueron analizadas mediante la regresión logística del programa estadístico SAS (Statistical Analysis System, 2012; v. 9.4), considerándose los efectos de la fuente de ovocitos (OPU y matadero) y de la repetición (n=10). Dado que los datos del diámetro y volumen ovocitario (estimado con la fórmula del volumen de una esfera) no siguieron una distribu-

ción normal según la prueba de Shapiro-Wilk, estos fueron transformados al *Logaritmo* 10 y procesados mediante el análisis de varianza de una vía, usándose el modelo lineal general (GLM) del SAS ($p < 0.05$). En el modelo se consideraron los efectos de la fuente, calidad ovocitaria y la repetición. Las diferencias entre las medias fueron comparadas mediante el método de los cuadrados mínimos del SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que los ovocitos del grupo PM mostraron un mayor diámetro y volumen ($p < 0.01$), así como un mayor porcentaje de integridad de la membrana plasmática ($p < 0.05$) en comparación con los ovocitos del grupo OPU. Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre grupos con relación a la actividad de la enzima G6PD (Cuadro 1).

Al categorizar los ovocitos según su calidad, los resultados mostraron que los ovocitos de calidad A ($p < 0.01$) y B ($p < 0.02$) del grupo PM tuvieron mayor tamaño que los del grupo OPU. Asimismo, hubo una mayor proporción de ovocitos de calidad A ($p < 0.05$) y menor proporción de calidad C ($p < 0.01$) en el grupo PM que en los de OPU (Cuadro 2). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre grupos cuando fue comparado el porcentaje de integridad de la membrana plasmática y el estado de maduración (GDP) en los ovocitos de calidades A y B; no obstante hubo diferencias significativas para los ovocitos de calidad C (Figura 1).

Los resultados obtenidos demostraron que los ovocitos recuperados *in vivo* mediante OPU mostraron un tamaño y un porcentaje de integridad de la membrana plasmática menor que los ovocitos recuperados *post mortem*, aunque el estatus metabólico para proseguir la maduración (BCB+) fue similar entre ambos grupos. Asimismo, la calidad, viabilidad y actividad de la enzima G6PD fue estadísticamente similar en los

Cuadro 1. Características morfométricas y funcionales de ovocitos de acuerdo con la fuente ovocitaria (1157 ovocitos analizados en 10 repeticiones)

Variables	Fuente de ovocitos	
	PM (n = 886)	OPU (n = 271)
Características morfométricas		
Diámetro (μm)	126.0 \pm 0.48 ^a	122.7 \pm 0.79 ^b
Volumen (μm^3)	1'105,363 \pm 16,089 ^a	983,738 \pm 23,757 ^b
Características funcionales		
BCB+, % (n)	81.5 (378/464) ^a	86.1 (118/137) ^a
Integridad de la membrana plasmática, % (n)	86.0 (363/422) ^b	76.8 (103/134) ^c

PM, grupo de ovocitos recuperados *post mortem*; OPU, grupo de ovocitos recuperados *in vivo* por aspiración folicular

Letras diferentes dentro de filas son significativamente diferentes (^{a,b} $p < 0.01$; ^{b,c} $p < 0.05$)

Cuadro 2. Diámetro (μm) y frecuencia (n) de ovocitos obtenidos de ovarios de matadero o *in vivo* mediante la técnica de *ovum pick-up*, según su origen y calidad

Variables	Origen de los ovocitos	
	Matadero (n=746)	Ovum pick up (n=262)
Calidad (μm)		
A	124.8 \pm 0.86 ^a	120.3 \pm 1.62 ^b
B	130.3 \pm 0.74 ^b	124.6 \pm 1.36 ^c
C	122.9 \pm 0.85 ^a	123.2 \pm 1.15 ^a
Frecuencia, % (n)		
A	28.7 ^c	22.1 ^d
B	38.5 ^a	33.6 ^a
C	32.8 ^a	44.3 ^b

Letras diferentes dentro de filas son significativamente diferentes (^{a,b} $p < 0.01$; ^{b,c} $p < 0.02$; ^{c,d} $p < 0.05$)

ovocitos A y B entre ambas fuentes. Estas dos categorías de ovocitos son las más apropiadas para la maduración y producción de embriones *in vitro* (Ward *et al.*, 2000) y son las que utilizan rutinariamente en los laboratorios comerciales y de investigación.

La diferencia en las medidas morfométricas (diámetro y volumen) entre ambos grupos pudiera atribuirse al componente racial; es decir, al hecho de que se trabajó con ovocitos colectados de vacas nativas de la sierra alta de Ecuador, por un lado, y de ova-

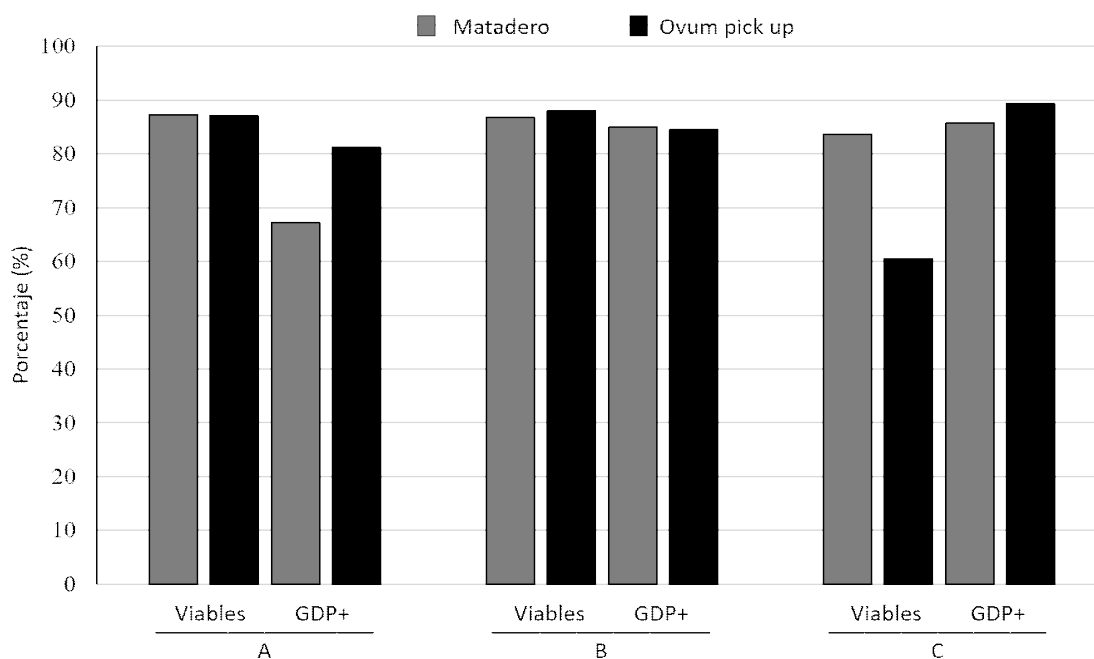


Figura 1. Porcentaje de ovocitos viables y negativos a la actividad de la enzima G6PD (BCB+) de acuerdo con la fuente y calidad ovocitaria

rios *post mortem* provenientes de diferentes grupos raciales lecheros y sus mestizos. No obstante, no hay datos publicados del efecto racial sobre las características morfométricas de los ovocitos que permita darle soporte científico a este racionamiento; sin embargo, como se indica más adelante, el análisis de varios trabajos en los que se hizo medición de ovocitos de diferentes grupos raciales permite deducir que el diámetro ovocitario no varía considerablemente entre ellos.

La calidad de los CCOs recolectados por OPU y su competencia para madurar *in vitro* se vio afectada por la presión de aspiración folicular ejercida durante la punción (Bols *et al.*, 1996; Fry *et al.*, 1997; Vos *et al.*, 1999). La técnica OPU realizada en vacas y búfalas a una presión de 40 mm Hg ha demostrado proporcionar una calidad similar a la técnica de recuperación de ovocitos de matadero *post mortem* (Neglia *et al.*, 2003).

Reportes previos han demostrado que la calidad de los ovocitos y la competencia para desarrollarse como embriones es considerablemente afectada cuando la aspiración folicular se efectúa a presiones superiores a 50 mmHg (Ward *et al.*, 2000).

Argudo *et al.* (2017, 2018) analizaron el tamaño de 489 y 782 ovocitos, respectivamente, recuperados de ovarios de matadero de la misma localidad (Sierra ecuatoriana) y obtuvieron un diámetro ovocitario de $124.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$. Ese estudio demostró que el diámetro disminuye según se incrementa la presión de aspiración folicular (por ejemplo, 125.8 ± 0.5 , 123.3 ± 0.5 y $122.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$ para ovocitos aspirados con 50, 65 y 80 mmHg, respectivamente). Los resultados de la presente investigación demostraron que los ovocitos aspirados por OPU se vieron afectados al usar una presión de aspiración alta (90 mmHg).

Hay que tener en cuenta que durante la OPU, los COCs están sometidos a fuerzas físicas que, dependiendo de la presión de succión y del diámetro de la aguja utilizados, afectan en mayor o menor cuantía la morfología de los COCs y la competencia de estos para desarrollarse a embriones (Bols, 1997). Apparentemente, durante la punción folicular, el líquido folicular con los ovocitos sufre turbulencias que provoca choques repetidos de estos con las paredes internas de la aguja y del extenso tubo que la conecta con el recipiente de colección (línea de aspiración), haciendo que el ovocito pierda progresivamente las células del cúmulo que lo rodean (Bols *et al.*, 1996; Bols, 1997; Hasler, 1998; Bizarro *et al.*, 2016), exponiendo la zona pelúcida y la membrana plasmática del ovocito a daños irreversibles.

Aunque la mención anterior no puede aplicarse totalmente a este estudio, dado que se utilizó la misma bomba y presión de vacío, y longitud de la aguja y de la línea de aspiración para obtener los ovocitos de ambas fuentes, la recuperación de COCs *in vivo* es más engorrosa y requiere que los animales sean tranquilizados, bloqueados epiduralmente e inmovilizados.

Los ovocitos bovinos se vuelven meióticamente competentes con un diámetro de aproximadamente 110 μm (Fair *et al.*, 1995). Además, la variación, tanto en la capacidad meiótica de los ovocitos (capacidad para alcanzar la metafase II), como en la capacidad de desarrollarse a blastocistos, se ha evidenciado más en ovocitos mayores a 110 μm de diámetro (Fair *et al.*, 1996). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que, independientemente si la recuperación fue *in vivo* o *post mortem*, los ovocitos tenían un diámetro adecuado para completar la meiosis I e iniciar la II.

Reportes anteriores han investigado el tamaño folicular y de los ovocitos obtenidos de ovarios de matadero, probablemente de

vacas *Bos taurus*. Entre estos, Fair *et al.* (1995) reportaron diámetros de ovocitos que variaron entre 98.9 ± 11.7 y 117.2 ± 9.7 μm que fueron colectados de folículos que median entre <1 y >4 mm de diámetro. Otoi *et al.* (1997) reportaron un diámetro promedio de 114.0 ± 4.8 μm , encontrando que el 82% midió entre 110 y 125 μm . En el caso de vacas *Bos indicus*, Nunes *et al.* (2000) reportaron tamaños entre 154.7 ± 11.6 μm en folículos pequeños (1-2 mm) y 164.4 ± 9.1 μm en folículos grandes (≥ 9 mm), incluyendo la zona pelúcida. En el presente estudio, el diámetro de los ovocitos estuvo dentro de los rangos reportados en la literatura científica.

CONCLUSIONES

- Los CCOs recuperados por OPU fueron más pequeños y tuvieron una viabilidad menor que los obtenidos *post mortem*, aunque ambos grupos presentaron similar estado metabólico para proseguir la maduración.
- Los COCs de tipo A y B obtenidos de matadero o mediante OPU fueron estadísticamente similares en integridad de membrana y en estado metabólico, aunque los recuperados mediante OPU fueron cerca de 5 μm más pequeños que los obtenidos de matadero.
- Los COCs de categoría C recuperados mediante OPU tuvieron considerablemente menor viabilidad que los tipos A y B del mismo grupo y los C del grupo *post mortem*. Asimismo, los COCs de calidad C tuvieron similar diámetro en ambas fuentes ovocitarias

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca, Ecuador, por el financiamiento de esta investigación, llevada a cabo a través del Proyecto DIUC-XIII-035.

LITERATURA CITADA

1. **Alvarado J, Argudo D, Méndez MS, Perea FP, Soria M. 2018.** Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vaquillas criollas y ovarios de matadero para formar banco de germoplasma. Arch Latinoam Prod Animal 26(Supl 1): 175.
2. **Alvares P, De Dio F, Zamparone L, Rafagnin L, Marcondes M. 2016.** *In vitro* production of bovine embryos. In: Seneda MM, Silva Santos KC, Rafagnin LS (eds). Biotechnology of animal reproduction. New York, USA: Nova Science Publishers. p 171-191.
3. **Argudo DE, Balvoa J, Tenemaza M, Méndez S, Soria M, Ayala L, Galarza L, et al. 2017.** Influencia del cuerpo lúteo activo sobre la competencia y características morfológicas de ovocitos bovinos. Maskana 8: 117-120.
4. **Argudo DE, Quezada AI, Mocha AR, Soria ME, Méndez SM, Ayala L, Galarza LR, et al. 2018.** Efecto de la presión de vacío sobre las características morfológicas de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero. Arch Latinoam Prod Animal 26(Supl 1): 162-163.
5. **Argudo DE, Galarza DA, Bueno HP, Iñiguez CU, Méndez SM, Soria ME, Torres C, et al. 2019.** Methods of collection, extender type and freezability of semen collected from creole bulls raised in the highlands of Ecuador. Trop Anim Health Prod 51: 1839-1845. doi: 10.1007/s11250-019-01877-3.
6. **Aguirre L, Bermeo A, Maza D, Merino L. 2011.** Estudio fenotípico y zométrico del bovino criollo de la sierra media y alta de la región sur del Ecuador (RSE). AICA 1: 392-396.
7. **Aguirre L, Apolo G, Chalco L, Martínez A. 2014.** Caracterización genética de la población bovina criolla de la Región Sur del Ecuador y su relación genética con otras razas bovinas. Anim Gen Res 54: 93-101. doi: 10.1017/S2078633613000313
8. **Berlinguer F, González R, Succu S, del Olmo A, Garde JJ, Espeso G, Gomendio M, et al. 2008.** *In vitro* oocyte maturation, fertilization and culture after ovum pick-up in an endangered gazelle (*Gazella dama mhorr*). Theriogenology 69: 349-359. doi: 10.1016/j.theriogenology.-2007.10.001
9. **Bizarro C, Zandonadi F, Miguez S, Seneda M. 2016.** Ovum pick-up. In: Seneda MM, Silva Santos KC, Rafagnin LS (eds). Biotechnology of animal reproduction. New York, USA: Nova Science: p 157-169.
10. **Bols P. 1997.** Transvaginal ovum pick-up in the cow: technical and biological modifications. A study on technical and biological factors influencing the number and quality of bovine cumulus oocyte complexes retrieved after ultrasound-guided transvaginal ovum pick-up. PhD Thesis. Ghent, Belgium: Gent University. 228 p.
11. **Bols P, Van Soom A, Ysebaert M, Vandenheede J, de Kruif A. 1996.** Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. Theriogenology 45: 1001-1014. doi: 10.1016/0093-691X(96)-00028-3
12. **Fair T, Hyttel P, Greve T. 1995.** Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. Mol Reprod Dev 42: 437-442. doi: 10.1002/mrd.1080420410
13. **Fair T, Hyttel P, Greve T, Boland M. 1996.** Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. Mol Reprod Dev 43: 503-512. doi: 10.1002/(SICI)-10982795-(199604)-43:4<503::AID-MRD13>3.0.CO;2-%23
14. **Fry RC, Niall EM, Simpson TL, Squires TJ, Reynolds J. 1997.** The collection of oocytes from bovine ovaries. Theriogenology 47: 977-987. doi: 10.1016/S0093-691X(97)00054-X

15. **Hasler JF. 1998.** The current status of oocyte recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *J Anim Sci* 76(Suppl 3): 52-74. doi: 10.2527/1998.76suppl_352x
16. **Hawk HW, RJ Wall. 1994.** Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 41: 1571-1583. doi: 10.1016/0093-691X(94)90822-Z
17. **Li F, Chen X, Pi W, Liu C, Shi Z. 2007.** Collection of oocytes through transvaginal ovum pick-up for *in vitro* embryo production in Nanyang Yellow cattle. *Reprod Domest Anim* 42: 666-670. doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00842.x
18. **Manjunatha BM, Gupta PS, Ravindra JP, Devaraj M, Nandi S. 2008.** *In vitro* embryo development and blastocyst hatching rates following vitrification of river buffalo embryos produced from oocytes recovered from slaughterhouse ovaries or live animals by ovum pick-up. *Anim Reprod Sci* 4: 419-426. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.06.030
19. **Méndez MS, Soria ME, Galarza LR, Perea FP, Argudo DE. 2019.** Effect of fetal calf serum on production and cryotolerance of *in vitro* bovine embryos from Ecuadorian creole heifers. *Reprod Fert Develop* 31: 141-142. doi: 10.1071/RDv31n1Ab31
20. **Nagai T. 2001.** The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology* 55: 1291-1301. doi: 10.1016/S0093-691X-(01)00483-6
21. **Neglia G, Gasparrini B, di Brienza VC, Di Palo R, Campanile G, Presicce GA, Zicarelli L. 2003.** Bovine and buffalo *in vitro* embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 59: 1123-1130. doi: 10.1016/S0093-691X(02)-01170-6
22. **Nunes MA, Rodvalho NC, Gomes V, de Oliveira RG. 2000.** Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. *Pesqui Agropec Bras* 35: 207-214. doi: 10.1590/S0100-204X-2000000100023
23. **Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. 1997.** Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 48: 769-774. doi: 10.1016/S0093-691X(97)-00300-2
24. **Vos PLAM, Henriksen PJM, Dielman SJ. 1999.** Results of oocytes from eCG stimulated bovine follicles at the time of preovulatory LH surge are severely affected by the system of aspiration. *Theriogenology* 51: 310.
25. **Ward FA, Lonergan P, Enright BP, Boland MP. 2000.** Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 54: 433-446. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00360-5