

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTO DE LA ESTACIÓN DEL AÑO Y LA TENSIÓN DE OXÍGENO SOBRE LA
CAPACIDAD DE DESARROLLO *IN VITRO* EN OVOCITOS BOVINOS**

Por

Ana RODRÍGUEZ MACHADO e Isabel ARBURÚAS BELL

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal y Medicina
Veterinaria

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2023**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por:



Presidente:

Dr. Jorge Gil



Segundo miembro (Tutor):

Dr. Francisco Báez



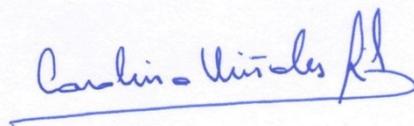
Tercer miembro:

Dra. Yael Filipiak



Cuarto miembro (co-Tutor):

Dra. Nélida Rodríguez Osorio



Quinto miembro (co-Tutor):

Dra. Carolina Viñoles

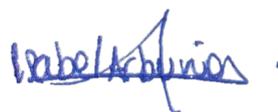
Fecha de aprobación:

14 de abril de 2023.



Autoras:

Ana Rodríguez



Isabel Arburúas

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le agradecemos a nuestro tutor Dr. Francisco Báez por todo el tiempo invertido, por ayudarnos a encarar este proyecto con la mejor de las actitudes y por su constante apoyo.

A las Dras. Nélide Rodríguez y Carolina Viñoles por sus colaboraciones y correcciones.

A todos quienes conforman el Centro Universitario Regional Noreste de la UdelaR por facilitarnos las instalaciones y los equipos utilizados, tan agradablemente.

Un agradecimiento especial a nuestras familias y amigos por estar siempre presentes, brindándonos fortaleza y apoyo continuo. Y a todos aquellos, que de alguna manera u otra nos acompañaron durante todo el recorrido colaborando y alentando para cumplir nuestro objetivo.

Finalmente, agradecemos a la Facultad de Veterinaria de la UdelaR por permitirnos formarnos y crecer en el ámbito académico y personal.

TABLA DE CONTENIDO:

Páginas

PÁGINA DE APROBACIÓN

AGRADECIMIENTOS

TABLA DE CONTENIDO:

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS:

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

- I. Efecto del cambio climático sobre la producción animal
- II. Respuesta fisiológica de las vacas al estrés calórico
- III. Complejo cumulus-ovocito y el ambiente
 - a. Efecto de las altas temperaturas sobre los CCO
 - b. Efecto de la tensión de oxígeno sobre el ovocito

HIPÓTESIS:

OBJETIVOS:

- I. General:
- II. Específicos:

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

PERSPECTIVAS FUTURAS

BIBLIOGRAFÍA

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS:

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores medios, máximos y mínimos del Índice de Temperatura y Humedad (IHT) calculados entre el 20 de diciembre de 2021 y el 28 de marzo de 2022 y el 12 de junio y 28 agosto de 2022. **20**

Tabla 2. Valores de significancia de los efectos fijos evaluados en el modelo estadístico para la tasa de división temprana, total de blastocitos, blastómeras e índice de apoptosis en embriones bovinos producidos *in vitro* en el invierno y verano y con baja y alta tensión de oxígeno durante la maduración y fecundación *in vitro*. **23**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del diseño experimental. **20**

Figura 2. Índice de Temperatura y Humedad (ITH) diarios calculados durante el verano 2021-2022 (A) e invierno 2022 (B). **22**

Figura 3. Efecto de la estación (invierno, verano) y tensión de oxígeno (5 y 20%) sobre las tasas de desarrollo embrionario temprano (A) y total de blastocistos (B) bovinos producidos *in vitro*. **25**

Figura 4. Efecto de la estación (invierno, verano) y tensión de oxígeno (5 y 20%) sobre el número total de blastómeras (A) e índice apoptótico (B) de blastocistos bovinos producidos *in vitro* y cultivados hasta el día 8. **25**

Figura 5. Imágenes digitales de la tinción de Hoechst y TUNEL de blastocistos bovinos producidos *in vitro*, provenientes de CCO colectados durante el invierno y el verano, y madurados y fecundados *in vitro* al 5 ó 20% de tensión de oxígeno. **26**

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la estación, sobre la competencia ovocitaria tras la MIV-FIV a 5% o 20% de O₂. En regiones templadas, durante el verano, el ganado en actividad de pastoreo puede estar expuesto a estrés calórico agudo, el cual puede afectar la calidad y la competencia de los ovocitos. La tensión suprafisiológica de oxígeno (20%), utilizada normalmente durante la maduración (MIV) y fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos bovinos, puede causar un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, exacerbando la magnitud de los daños experimentados por los ovocitos bovinos bajo altas temperaturas, por lo que usar bajas tensiones de oxígeno podría ser una alternativa para minimizar los efectos adversos del estrés calórico sobre la competencia ovocitaria. En el norte de Uruguay, recolectamos ovarios de vacas de frigorífico durante el verano (diciembre de 2021 y de enero a marzo de 2022) y el invierno (junio a agosto de 2022) y calculamos el índice de temperatura y humedad (ITH) durante todo el tiempo del estudio. Los CCO (complejos cumulus-ovocito) colectados fueron madurados en TCM 199 (Gibco 11150059), y suplementado con FCS (suero fetal bovino), piruvato de sodio, hormona folículo estimulante (FSH), gonadotropina coriónica equina (eCG, v/v) y gentamicina (v/v), durante 24 h un grupo con baja tensión de oxígeno (5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂) y otro con alta tensión de oxígeno (5% CO₂, 20% O₂ y 75% N₂). La selección de espermatozoides se llevó a cabo mediante la técnica de *swim-up*, en el medio TL-FIV + HEPES. Para la FIV los espermatozoides y los CCO se mantuvieron en cultivo durante 22 h, en el medio TL-FIV suplementado con aminoácidos esenciales, aminoácidos no esenciales, hipotaurina y heparina. Los presuntos cigotos (n = 163-206 por grupo) se cultivaron en mSOFaaci con BSA y FCS a 38,5°C, y con las siguientes condiciones atmosféricas 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂, durante 8 días. En los blastocistos expandidos de cada grupo se determinó el número de blastómeras e índice apoptótico mediante la tinción de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase fluorescein-dUTP nick-end labeling*). Las tasas de división embrionaria y de blastocistos, el número total de células y el índice apoptótico en blastocistos expandidos (n= 8-11 por grupo) obtenidos en invierno y verano bajo ambas tensiones de oxígeno se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y la prueba de Tukey. El ITH promedio de verano fue de 72,1, lo que indica un nivel de alerta para las vacas en condiciones de estrés por calor agudo. Los resultados mostraron que la estación y la tensión de oxígeno durante la MIV-FIV afectaron significativamente las tasas de división, de blastocistos y la calidad de los embriones. Los ovocitos recolectados en invierno con 5% de O₂ arrojaron los mejores resultados, mientras que los ovocitos recolectados en verano con 20% de O₂ durante MIV-FIV arrojaron los peores resultados. Estos hallazgos corroboran que el estrés por calor sumado a la alta tensión de oxígeno tiene un efecto negativo sobre la competencia de desarrollo de los ovocitos bovinos.

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the effect of the season on oocyte competence after IVM-IVF at 5% or 20% O₂. In temperate regions, during the summer, grazing cattle may be exposed to acute heat stress, which may affect oocyte quality and competence. The supraphysiological oxygen tension (20%), normally used during maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF) of bovine oocytes, can cause an increase in the production of reactive oxygen species, exacerbating the magnitude of the damage experienced by bovine oocytes under high temperatures, so using low oxygen tensions could be an alternative to minimize the adverse effects of heat stress on oocyte competition. In the north of Uruguay, We collected ovaries from refrigerator cows during the summer (December 2021 and January to March 2022) and winter (June to August 2022) and calculated the temperature and humidity index (THI) throughout the study time. The collected CCOs (cumulus-oocyte complexes) were matured in TCM 199 (Gibco 11150059), and supplemented with FCS (fetal calf serum), sodium pyruvate, follicle-stimulating hormone (FSH), equine chorionic gonadotropin (eCG, v/v) and gentamicin (v/v), for 24 hours; a group with low oxygen tension (5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂) and another with high oxygen tension (5% CO₂, 20% O₂ and 75% N₂). Sperm selection was carried out using the *swim-up* technique, in the TL-FIV + hepes medium. For IVF, the spermatozoa and the CCO were kept in culture for 22 hours, in the TL-FIV medium supplemented with essential amino acids, nonessential amino acids, hypotaurine and heparin. Presumptive zygotes (n=163-206 per group) were cultured in mSOFaaci with BSA (m/v) and FCS at 38.5°C, and with the following atmospheric conditions 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂, for 8 days. In the expanded blastocysts of each group, the number of blastomeres and apoptotic index were determined by TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase fluorescein-dUTP nick-end labeling) staining. The embryonic and blastocyst division rates, Total cell number and apoptotic index in expanded blastocysts (n=8-11 per group) obtained in winter and summer under both oxygen tensions were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's test. The average summer THI was 72.1, indicating an alert level for cows under acute heat stress conditions. The results showed that the season and the oxygen tension during IVM-IVF significantly affected the cleavage rates, blastocyst rates, and embryo quality. Oocytes collected in winter with 5% O₂ gave the best results, while oocytes collected in summer with 20% O₂ during IVM-IVF gave the worst results.

INTRODUCCIÓN

El sector ganadero uruguayo ocupa un lugar fundamental en la economía del país y por esto es importante la investigación destinada a optimizar la productividad de este rubro. Teniendo en cuenta que la producción ganadera se desarrolla fundamentalmente en sistemas extensivos pastoriles, existe alta probabilidad de que los bovinos estén expuestos a condiciones de estrés calórico en los meses más calurosos del año. El estrés calórico es una condición que resulta de la incapacidad del animal para disipar el calor corporal de manera efectiva y mantener la temperatura corporal normal (Morrell, 2020). El aumento de la temperatura ambiental, especialmente en verano, es una cuestión crítica en el desempeño del ganado ya que tiene repercusiones a nivel productivo y reproductivo (Sakatani, 2017). La intensidad del estrés calórico puede ser categorizada por el Índice de Temperatura y Humedad (ITH). En función del valor obtenido de ITH se han descrito cuatro niveles: sin riesgo (menor a 69); alerta (entre 70 y 74); peligro (entre 75 y 79), y emergencia (mayor a 80) (Du Preez, Hattingh, Giesecke, Eisenberg y Giesecke, 1990).

A nivel nacional, en los departamentos ubicados al norte del Río Negro en los meses de verano, se han documentado valores de $ITH \geq 79$ (Rovira, 2012). Resultados recientes de nuestro equipo de trabajo describen que durante el entore (llevado a cabo en la región Norte de Uruguay) ocurren condiciones de estrés calórico, y que en veranos muy calurosos se ve afectado el momento de la concepción en vacas para carne (Santa Cruz, da Silva, Fedrigo, Benítez y Viñoles, 2019; Santa Cruz, Fedrigo, Benítez y Viñoles, 2018). Las vacas de las razas Hereford, Angus y sus cruzas, muestran un aumento lineal de la temperatura vaginal a partir de un ITH superior a 72,8, lo que conduciría a una reducción en la tasa de preñez (Fedrigo, Báez, Santa Cruz y Viñoles, 2021).

La hipertermia materna, provocada por las altas temperaturas, puede modificar el ambiente folicular y comprometer la competencia para el desarrollo ovocitario a través de una serie de daños celulares y moleculares, reduciendo el desempeño reproductivo. Varios estudios estacionales demuestran que la exposición de las vacas al estrés calórico durante el verano reduce la competencia ovocitaria para el desarrollo embrionario (Al-Katanani, Paula-Lopes y Hansen, 2002; Ferreira et al., 2011; Rocha et al., 1998; Torres-Júnior et al., 2008). Complejos cumulus-ovocito colectados durante los meses calurosos presentaron mayor número de alteraciones cromosómicas (Maya-Soriano, López-Gatius, Andreu-Vázquez y López-Béjar, 2013), menores tasas de maduración (Abdoon, Gabler, Holder, Kandil y Einspanier, 2014), consecuentemente, menor tasa de desarrollo hasta el estadio de blastocistos (Al-Katanani et al., 2002; Báez, López Darríulat, Rodríguez-Osorio y Viñoles, 2022; Gendelman, Aroyo, Yavin y Roth, 2010) y menor calidad embrionaria (Ferreira et al.,

2011). Estos hallazgos sugieren que existe un efecto estacional deletéreo sobre el desarrollo de la competencia del ovocito, con un retraso en la división embrionaria y variación en la expresión de genes (Gendelman et al., 2010).

Un estudio reciente determinó que en ovocitos bovinos expuestos a choque térmico durante la maduración *in vitro* (MIV), aumentó el nivel de especies oxígeno reactivas (ROS) intracelular (Yaacobi-Artzi, Shimoni, Kalo, Hansen y Roth, 2020). La exposición de los ovocitos a ROS, incluyendo el peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y aniones superóxido, pueden dañar el ADN, las mitocondrias, los fosfolípidos de las membranas, las proteínas (Tannetta, Dragovic, Alyahyaei y Southcombe, 2014) y consecuentemente, aumentar el índice de apoptosis (Pasquariello, Bocchi, Brevini y Gandolfi, 2017).

Un aspecto relevante es que la MIV se realiza generalmente a altas tensiones de oxígeno (~20%) (Sohel et al., 2013), y que estas condiciones de cultivo *in vitro* también están asociadas al aumento de los niveles de ROS (Hung, Christenson y McGinnis, 2015). Por lo tanto, la tensión alta de oxígeno representa un desafío para la adquisición de la capacidad de desarrollo de ovocitos y embriones en cualquier estación del año (Tannetta et al., 2014). Existen trabajos que demuestran que una baja tensión de oxígeno (5% O₂) durante las fases de producción de embriones se puede acercar a los valores fisiológicos, encontrados en el folículo, oviducto y útero de la hembra bovina (1.5-8% O₂, revisado por Harvey, 2007). Estas condiciones permiten reducir la producción de ROS en ovocitos madurados (Bermejo-Álvarez, Lonergan, Rizos y Gutiérrez-Adan, 2010; Roelen, 2019), propiciando mayores tasas de desarrollo y sin llegar a comprometer la calidad del embrión (Bermejo-Álvarez et al., 2010). Sin embargo, la tensión atmosférica de oxígeno (~20% O₂) se ha utilizado durante mucho tiempo para la producción *in vitro* (PIV) de embriones para reducir costos al evitar el uso de una atmósfera controlada artificialmente (Sciorio y Smith, 2019).

Por lo tanto, es importante evaluar el impacto de utilizar alta vs baja tensión de O₂ en la producción de embriones a partir de ovocitos colectados en verano e invierno, para probar el efecto acumulativo de ambas situaciones estresantes. Actualmente, las diferencias en el desarrollo embrionario a partir de ovocitos sometidos a diferentes condiciones como la tensión de oxígeno y estrés calórico pueden ser parcialmente explicadas mediante las evaluaciones convencionales como la tasa de desarrollo embrionario y conteo de blastómeras. Sin embargo, mediante la aplicación de tinciones diferenciales como la de apoptosis, TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase fluorescein-dUTP nick-end labeling*) se puede detectar el porcentaje de fragmentación del ADN, número de blastómeras y mostrar diferencias en la calidad embrionaria. Por tanto, este trabajo se planteó comparar las tasas de desarrollo y la calidad de los embriones obtenidos a partir de ovocitos bovinos provenientes de invierno, y verano, los cuales se maduraron y fecundaron bajo dos tensiones de oxígeno, y además evaluar la calidad embrionaria.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

I. Efecto del cambio climático sobre la producción animal

El calentamiento global, y sus efectos sobre el cambio climático, es una problemática con consecuencias verdaderamente preocupantes. El cambio climático ha sido notable en todo el mundo en las últimas décadas, independientemente de las fronteras geográficas (Carvajal et al., 2021). Estos cambios no solo se limitan a las regiones tropicales o subtropicales, sino también a las templadas (revisado por Rahman, Schellander Luceño y Van Soom, 2018). Según la Organización Meteorológica Mundial, el aumento de la temperatura global es un factor perturbador en la producción ganadera, y durante este siglo se esperan elevaciones de 3 a 5°C (World Meteorological Organization, 2019). Estos cambios ambientales representan una condición estresante que compromete el bienestar, la salud y la eficiencia reproductiva de los animales a través del aumento de la temperatura corporal por encima de su punto fisiológico homeotérmico, que conduce al estrés calórico (Boni, 2019).

El estrés calórico es el resultado del balance negativo entre la cantidad neta de energía que fluye del animal a su entorno y la cantidad de energía térmica producida por el animal. Este desequilibrio es inducido por cambios en una combinación de factores ambientales (luz solar, radiación térmica, temperatura del aire), propiedades fisiológicas de animales (tasa metabólica y pérdida de humedad) y termorreguladores (conducción, radiación, convección y evaporación) (St-Pierre, Cobanov y Schnitkey, 2003). Hahn, Mader y Eigenberg (2003) describen a la temperatura ambiental como la variable más investigada y utilizada como indicador de estrés calórico, con importancia significativa, ya que existe una disminución notoria en los niveles de producción (Pires, Stafuzza, Lima, Negrao y Paz, 2019) y en la fertilidad de los animales en los meses más calurosos (Jia, Jia y Zhong, 2012). En este sentido, Aggarwal y Upadhyay (2013) manifiestan que las altas temperaturas ambientales generan cambios drásticos en las funciones fisiológicas del animal, incluyendo disminución de la ingesta de alimentos y alteraciones en el metabolismo del agua, proteínas, balances energéticos y minerales, secreciones hormonales y metabolitos sanguíneos (revisado por Gutiérrez, 2018).

El estrés calórico repercute negativamente en el bienestar, crecimiento, reproducción y salud del ganado (Brown-Brandl, 2018). Con la finalidad de caracterizar las condiciones meteorológicas que propician el estrés calórico, se ha creado un índice biometeorológico denominado índice de temperatura y humedad (ITH) (Thom, 1959), que se ha utilizado como base para sistemas de emergencia. En bovinos para carne, valores de ITH entre 70 y 74 podrían representar una señal de alerta y un riesgo potencial de estrés calórico (Du Preez et al., 1990).

Los efectos del cambio climático y el aumento de la temperatura global hacen que los bovinos criados en sistemas pastoriles en países de climas templados estén cada vez más expuestos al estrés calórico (Nardone, Ronchi, Lacetera, Ranieri y Bernabucci, 2010). En Uruguay, la mayoría del ganado es criado en sistemas pastoriles pudiendo verse afectado por el estrés calórico en momentos puntuales durante los meses de verano, sobre todo en los departamentos al norte del país (Fedrigo et al., 2021). Aproximadamente, durante un 50% del tiempo, en el periodo de verano, los animales están expuestos a condiciones ambientales con riesgo de estrés calórico (Rovira, 2012).

Bajo estas condiciones, la salud de los animales se puede afectar, tanto directa como indirectamente. Los efectos directos incluyen enfermedades y muertes relacionadas con la temperatura, y la morbilidad de los animales durante los fenómenos meteorológicos extremos. Los impactos indirectos se derivan del intento de los animales de adaptarse al ambiente térmico o de la influencia del clima en las poblaciones microbianas, la distribución de enfermedades transmitidas por vectores, la resistencia del huésped a los agentes infecciosos y la escasez de alimentos y agua (Nardone et al., 2010). Morignat et al., (2018) expresan que las temperaturas extremas aumentan la mortalidad del ganado, con efectos inmediatos y retardados, pudiendo verse exacerbado durante los períodos de exposición prolongada a tales condiciones.

Los sistemas ganaderos basados en el pastoreo y los sistemas agrícolas mixtos se verán más afectados por el calentamiento global que un sistema industrializado (Nardone et al., 2010). Esto será debido al efecto negativo de las menores precipitaciones y más sequías sobre el crecimiento de las pasturas y a los efectos directos de las altas temperaturas y la radiación solar sobre los animales (Delgado, 2003; Delgado, Rosegrant, Steinfeld, Ehui y Courbois, 1999; Nardone, 2002). Una pérdida del 25% de la producción animal por el calentamiento global está prevista en los países, que basan su producción en sistemas pastoriles (Seguín, 2008). A nivel mundial, la producción animal tiene que aumentar en las próximas décadas para satisfacer la creciente necesidad de proteína. De acuerdo con Cohen (2001) en el año 2050, la población mundial aumentará a 9.300 millones, se estima que, para entonces, el consumo mundial de carne será el doble del actual. El aumento global de temperaturas supera la capacidad general de la mayoría de los organismos para adaptarse y responder, lo que pone en riesgo su bienestar y disminuye los niveles de producción. El trabajo publicado por Carvajal et al. (2021), muestra el aumento gradual de regiones con climas cálidos y la aparición de las olas de calor, razones suficientes para promover el desarrollo de planes preventivos y adaptativos para atenuar o minimizar los efectos negativos del estrés calórico.

II. Respuesta fisiológica de las vacas al estrés calórico

Los bovinos son animales homeotermos, es decir que mantienen una temperatura corporal constante, alrededor de 38°C, siendo independientes de las variaciones en la temperatura ambiental (Hill, Wyse y Anderson, 2006; Klein, 2014). El control del equilibrio térmico es un factor indispensable para lograr el mantenimiento de la salud, el bienestar, y los niveles de producción del animal (Cruz, 2009). Hansen (2009) describe esta regulación como un proceso de control homocinético mediante el cual el equilibrio en la temperatura corporal involucra procesos dinámicos que pueden generar perturbaciones en otros procesos fisiológicos.

Para que se cumpla con el proceso de homeotermia el animal debe perder tanto el calor producido como el ganado desde el ambiente (Kadzere et al., 2002). En los bovinos, la temperatura corporal está finamente regulada por la combinación de procesos de producción y pérdida de calor, tales como conducción, convección, radiación y evaporación (Arias, Mader y Escobar, 2008). Los tres primeros mecanismos se conocen como pérdidas de calor sensible, sobre los cuales el animal tiene muy poco control; a diferencia de la evaporación, que tiene un marcado control fisiológico (Klein, 2014).

En un rango específico de temperatura ambiental, llamado zona termoneutral (ZTN) y en estado de reposo, los bovinos, así como otros mamíferos y aves, pueden mantener su propia temperatura dentro de los límites normales. Los valores extremos de la ZTN corresponden a la "temperatura crítica mínima" y la "temperatura crítica máxima" (Hill et al., 2006). Bartaburu (2007) describe que, en bovinos, la ZTN o de confort térmico, se encuentra entre los 15 y 25°C. Dentro de la ZTN la temperatura corporal es regulada por mecanismos vasomotores que aumentan o disminuyen el flujo sanguíneo de la dermis, lo que hace variar la cantidad de calor que se pierde por convección y radiación. Estos mecanismos son normales y pasivos desde el punto de vista del gasto energético (Klein, 2014).

Los ruminantes presentan una sensibilidad relativamente mayor al estrés calórico que otros mamíferos debido a la actividad termogénica adicional de la rumia del forraje y la fermentación en el rumen (Cheng et al., 2016). Ante una situación de sobrecarga térmica, primero ocurre una vasodilatación que incrementa el flujo de sangre hacia la piel y extremidades. De esta forma, aumenta el gradiente térmico entre la piel y el ambiente, produciéndose una mayor pérdida de calor por convección y radiación (Klein, 2014). Aggarwal y Upadhyay (2013) afirman que cuando la temperatura ambiental se encuentra por encima del valor crítico máximo de la ZTN se produce una situación de estrés calórico, donde la vasodilatación por sí misma no consigue mantener la temperatura normal. El animal debe entonces poner en marcha mecanismos de evaporación como, por ejemplo, aumento de la tasa respiratoria, que sí implican un gasto energético. En el ganado vacuno, las pérdidas por evaporación a través del aumento de la frecuencia respiratoria y del volumen de la

sudoración, son los mecanismos más importantes para disipar el exceso de calor (Kadzere, Murphy, Silanikove y Maltz, 2002).

La respuesta animal al estrés calórico es dinámica y cuenta con varias etapas. En la primera etapa el animal tiende a evitar la acumulación de calor, incrementando la vasodilatación, la tasa de sudoración y la frecuencia respiratoria (Rovira, 2012). Si con eso logra evitar el incremento de la temperatura corporal, el animal mantiene sus funciones básicas de producción sin ser afectadas. En caso contrario, si el riesgo de estrés calórico se mantiene, se puede atravesar el umbral por encima del cual ocurren pérdidas productivas significativas (Rovira, 2012). Fregley (1996), sugiere que la aclimatación es una respuesta fenotípica desarrollada por el animal a una fuente individual de estrés dentro del medio ambiente. La aclimatación de los animales para enfrentar los desafíos térmicos resulta en la reducción del consumo de alimento y la alteración de muchas funciones fisiológicas que se relacionan con el deterioro de la salud como mencionamos previamente, y la alteración de la eficiencia productiva y reproductiva (Beede y Collier, 1986; Lacetera, Bernabucci, Ronchi y Nardone, 2003a).

A corto plazo, los cambios adaptativos se ven reflejados en respuestas conductuales y adaptaciones fisiológicas que incluyen la función inmunológica; mientras que a largo plazo se altera el consumo de alimento y la pérdida de calor, lo que influye sobre el rendimiento productivo y reproductivo del animal (Nienaber y Hahn, 2007). Si una vaca desarrolla estrés por calor o no, depende de su capacidad para mantener la normotermia (Roth, 2021). La disminución en el consumo de energía debido a la reducción del consumo de alimento da como resultado un balance energético negativo y explica parcialmente por qué las vacas pierden cantidades significativas de peso corporal cuando se las somete a estrés calórico (Lacetera, Bernabucci, Ronchi y Nardone, 1996). La alteración del metabolismo de la glucosa y los lípidos, de la función hepática y del estado oxidativo pueden ser responsables del aumento de la sensibilidad de los animales estresados por el calor a enfermedades metabólicas con consecuencias negativas en la producción, la reproducción. El estrés térmico también puede generar una mayor sensibilidad a las enfermedades infecciosas en los sistemas de producción ganadera intensiva y extensiva (Nardone et al., 2010).

A un menor consumo de alimento le sigue una disminución en la secreción de hormonas calorígenicas (hormona del crecimiento, catecolaminas y glucocorticoides en particular), en los procesos termogénicos de la digestión y el metabolismo, y en la tasa metabólica (Johnson, 1980; Webster, 1991). Todos estos eventos juntos (menor consumo de alimento, cambio en el estado endócrino y menor tasa metabólica) tienden a reducir la producción de calor metabólico (Yousef, 1987) y podrían ser responsables de las modificaciones de la energía, el metabolismo de los lípidos, las proteínas y minerales y en la función hepática.

Los rumiantes que jadean como uno de los mecanismos para disipar el calor, babea y esto reduce la cantidad de saliva que normalmente se habría depositado en el rumen. Además, debido a la reducción del consumo de alimentos, rumian menos y, por lo tanto, producen menos saliva. Todo esto llevará a que la vaca sea mucho más susceptible a la acidosis ruminal subclínica y aguda (Kadzere et al., 2002), lo que indirectamente potencia el riesgo de otros problemas sanitarios y productivos concurrentes como: laminitis, disminución de la grasa láctea, etc. Estas circunstancias son más propias de los sistemas intensivos de producción ganadera para leche y carne (Nardone et al., 2010).

A nivel reproductivo, los datos obtenidos hasta el momento revelan que el efecto del estrés calórico sobre el aparato reproductor femenino es multifactorial e implica diversas respuestas fisiológicas y alteraciones endocrinológicas, celulares y moleculares que, en conjunto, se denominan "alteraciones inducidas por el calor" (Roth, 2021). Resultados recientes del trabajo de Santa Cruz describen que, durante el entore, en la región Norte de Uruguay, ocurren condiciones de estrés calórico, y que en veranos muy calurosos se ve afectado el momento de la concepción en vacas para carne (Santa Cruz et al., 2018; Santa Cruz et al., 2019). Las vacas de las razas Hereford, Angus y sus cruza, muestran un aumento lineal de la temperatura vaginal a partir de un ITM superior a 72,8, lo que conduciría a una reducción en la tasa de preñez (Fedrigo et al., 2021). Además, se compromete entre otras funciones, el flujo sanguíneo uterino (Roman-Ponce, Thatcher, Caton, Barron y Wilcox, 1978), y el endometrial (Malayer, Hansen y Bui, 1988).

Uno de los cambios más prominentes documentados hasta el momento es en el eje hipotálamo-pituitario-ovárico, como la alteración de la secreción de gonadotropinas, la atenuación del desarrollo del folículo, la reducción de la producción de esteroides y la disminución de las concentraciones de progesterona en plasma (Wolfenson y Roth, 2019). El desarrollo de los folículos antrales depende de las gonadotropinas; por lo tanto, los cambios inducidos por el calor en el eje hipotálamo-pituitario-ovárico (Gilad, Meidan, Berman, Graber y Wolfenson, 1993) podrían causar deterioro en el desarrollo (Badinga et al., 1993; Wilson et al., 1998; Wolfenson et al., 2000) y función (Roth, 2008) del folículo. En condiciones de estrés calórico el folículo preovulatorio produce bajas concentraciones de androstenediona, estradiol e inhibina (Roth, Meidan, Braw-Tal y Wolfenson, 2000; Wolfenson, Lew, Thatcher, Graber y Meidan, 1997). La reducción en los niveles de estradiol compromete la expresión del estro en vacas estresadas, reduciendo la eficiencia de los programas de inseminación artificial durante el verano. Las alteraciones en la esteroidogénesis folicular también reducen el pico preovulatorio de hormona luteinizante (LH), comprometiendo los eventos involucrados en la ovulación (Gilad et al., 1993; Nanas et al., 2020; Wise, Armstrong, Huber, Hunter y Wiersma, 1988).

Es ampliamente conocido que cualquier fuente de estrés, incluido el estrés calórico, tiene el potencial de afectar la interacción entre el útero y el embrión (Thatcher, Meyer y Danet-Desnoyers, 1995), interrumpiendo el establecimiento y mantenimiento de la preñez. Se ha documentado que la muerte embrionaria en vacas sometidas a estrés calórico ocurre en los primeros seis días del desarrollo embrionario por el aumento de la temperatura interna de la vaca (mayor a 39°C), y se debe a la falta de producción de proteínas tolerantes al calor, que son las que protegen al embrión en el útero (Bailey, Sheets, McClary, Smith y Bridges, 2016).

Es común relacionar a la hipertermia con la alteración de la dinámica folicular (Badinga, Thatcher, Diaz, Drost y Wolfenson, 1993), incapacidad del folículo dominante para ejercer su dominancia, duración extendida de la dominancia del folículo preovulatorio (Wolfenson et al., 1995), aumento del estrés oxidativo en el oviducto (Matsuzuka et al., 2005; Kobayashi, Wakamiya, Kohka, Yamamoto y Okuda, 2013), reducción de la tasa de fecundación (Sartori et al., 2002) y de la competencia del ovocito (Baruselli et al., 2020).

Es particularmente relevante, considerar que la reducción de la fertilidad en los bovinos a causa del estrés calórico no se limita a los meses calurosos (verano) sino que puede persistir en los meses siguientes y más fríos, lo que resulta de un efecto prolongado desde el verano hasta el otoño (Roth, 2008). Varios estudios indican que se requieren dos o tres ciclos estrales para recuperar el daño ocasionado durante el verano sobre la población de folículos y la aparición de ovocitos competentes (revisado por De Rensis, Saleri, Garcia-Ispierto, Scaramuzzi y López-Gatiús, 2021). Probablemente, solo subpoblaciones de los folículos antrales ováricos, en lugar de toda la reserva de folículos, se dañen después de la exposición al estrés por calor (Roth, 2021). Se cree que los folículos antrales tempranos, de aproximadamente 0,5 a 1 mm de diámetro, son sensibles al estrés por calor (Roth, 2008; Wilson et al., 1998; Wolfenson, Roth y Meidan, 2000). Además de estar comprometido el desarrollo folicular, se infiere el hecho de que los ovocitos colectados durante el verano experimentan una reducción en la competencia para el desarrollo, observada en una menor proporción de embriones que alcanzan el estadio de blastocistos (Báez et al., 2022; Gendelman et al., 2010; Gendelman y Roth, 2012a).

III. Complejo cumulus-ovocito y el ambiente

a. Efecto de las altas temperaturas sobre los CCO

Existen evidencias, tanto *in vivo* como *in vitro*, que demuestran que los CCO son las estructuras más sensibles al estrés calórico materno (Gendelman y Roth, 2012a; Torres-Junior et al., 2008). También se ha demostrado que, dependiendo de la intensidad del estrés, la temperatura elevada puede causar daño celular reversible o irreversible en diferentes estructuras y organelos (Ju, Jiang, Tseng, Parks y Yang, 2005; Roth y Hansen, 2005). Un estudio *in vivo* demostró que el estrés calórico aumentó la proporción de CCO desnudos y degenerados (Tucker et al., 2007).

Yuan et al. (2008), después de exponer CCO porcinos a 41°C durante la MIV, concluyeron que el choque térmico aumenta la proporción de fragmentación del ADN de las células del cumulus, promoviendo daño al ovocito. En el estudio estacional conducido por nuestro equipo de trabajo, los CCO bovinos colectados durante el verano presentaron mayores índices de apoptosis en las células del cumulus, en comparación con los CCO colectados en el invierno (Báez et al., 2022).

A nivel ultraestructural, Báez et al. (2019) demostraron que una exposición de CCO por 22 horas a 41°C afecta la morfología de la zona pelúcida con la presencia de mayor número de poros y apariencia alterada, lo que podría comprometer la calidad de los ovocitos de las vacas estresadas por calor. El daño celular inducido por el calor en los ovocitos bovinos se puede observar en las membranas biológicas, así como en los compartimentos citoplásmico y nuclear (Paula-Lopes et al., 2012). Por otro lado, en un estudio *in vivo*, se puede apreciar que las membranas de las células de ovocitos bovinos recolectados durante el verano tienen menos ácidos grasos poliinsaturados y más ácidos grasos saturados, en comparación con los ovocitos recolectados durante el invierno (Zeron et al., 2001). Los niveles bajos de ácidos grasos poliinsaturados se han relacionado con la atresia folicular e infertilidad en ratones (Stoffel et al., 2020).

Adicionalmente, existe evidencia de que el citoplasma del ovocito es altamente susceptible a los efectos adversos de la temperatura elevada (Shen et al., 2010); afectando la organización de microtúbulos y microfilamentos (Ju y Tseng, 2004; Ju y otros., 2005; Roth y Hansen, 2005). Estas alteraciones comprometen el transporte y distribución de organelos citoplasmáticos, y las primeras divisiones mitóticas del embrión (Tseng, Chen, Chou, Yeh y Ju, 2004; Ju et al., 2005). Así, la temperatura elevada también puede alterar las reservas maternas de ARN mensajeros y la eficiencia de la traducción (Payton, Rispoli, Saxton y Edwards, 2011). Otros estudios demuestran que la cantidad de ADN mitocondrial se redujo en los ovocitos recolectados en verano (Ferreira et al., 2016), en comparación con el invierno. Esta ocurrencia puede estar relacionada con la capacidad de desarrollo, siendo las mitocondrias los organelos responsables de la producción de energía, e incluso se ha observado que la cantidad de mitocondrias aumenta durante el crecimiento del ovocito (Dumollard, Duchén y Carroll, 2007). Dichos efectos pueden desencadenar una respuesta adaptativa y/o de muerte celular (Paula-Lopes y Hansen, 2002a). Es posible que la apoptosis tenga un papel esencial en los ovocitos expuestos a condiciones de estrés. Los cambios en la actividad mitocondrial del ovocito pueden estar asociados con la activación de la cascada apoptótica (Paula-Lopes et al., 2012).

La exposición de ovocitos al choque térmico a 41°C por 16 horas seguido de 6 horas a 38,5°C durante la MIV redujo el porcentaje de desarrollo en los primeros estadios (2, 4 y 8 células) embrionarios (Latorraca, Feitosa y Paula-Lopes, 2019).

Balboula et al., (2013) observaron que los ovocitos bovinos que recibieron choque térmico durante las últimas 17 horas (a 41°C) durante la MIV, tuvieron un aumento significativo en el número de células del cúmulus apoptóticas. En consecuencia, la exposición de los ovocitos a temperaturas elevadas redujo los porcentajes de embriones divididos y de blastocistos tempranos, expandidos y eclosionados (Gendelman y Roth, 2012b).

b. Efecto de la tensión de oxígeno sobre el ovocito

Actualmente, se podría decir que existe un consenso en el uso de oxígeno atmosférico para la maduración y la fecundación *in vitro* de los ovocitos (Guarneri et al., 2015). Sin embargo, otros estudios sugieren que la MIV y FIV deberían también realizarse en oxígeno a baja tensión (Banwell, Lane, Russell, Kind y Thompson, 2007; Bermejo-Álvarez et al., 2010; Bontekoe et al., 2012; Hashimoto, 2009; Hashimoto et al., 2007; Son, Lee y Lim, 2005; Wei et al., 2008). Existen trabajos que demuestran que el uso de baja tensión de oxígeno (5% O₂) durante todas las fases de producción de embriones podría acercarse a los valores encontrados en el folículo, oviducto y útero de la hembra bovina (1,5-8%, revisado por Harvey, 2007), obteniendo una reducción en la producción de especies oxígeno reactivas en ovocitos madurados (Bermejo-Álvarez et al., 2010; Roelen, 2019) y mayores tasas de desarrollo sin llegar a comprometer la calidad del embrión (Bermejo-Álvarez et al., 2010). Ovocitos de yak (*Bos grunniens*) madurados con tensión de 5% O₂ mostraron un menor índice de apoptosis en las células del cumulus, en comparación a los madurados con 20% de oxígeno (He et al., 2020). De Castro e Paula y Hansen (2007), sugieren que la baja tensión de oxígeno durante la MIV no aumentaría los efectos adversos del choque térmico y que podría acercar las condiciones de cultivo al ambiente *in vivo* en los animales. La aplicación de 5% O₂ en todas las fases de producción de embriones *in vitro* podría simular el ambiente materno, mejorar la calidad y criotolerancia de los blastocistos producidos *in vitro* (Báez et al., 2022).

La tensión de oxígeno al 20% O₂ se ha utilizado durante mucho tiempo para la producción *in vitro* de embriones por ser más económica, ya que corresponde a la tensión atmosférica y no requiere el uso de una atmósfera controlada artificialmente (Sciorio y Smith, 2019). El cultivo embrionario en 20% de oxígeno es posible gracias a que el embrión activa sus defensas contra el exceso de ROS, aumenta la expresión de la proteína p66Ssc, la enzima superóxido dismutasa y la unidad catalítica de la glutamilcisteina ligasa (*Gclc*), todas estas, involucradas en la respuesta al estrés oxidativo y reducción de las ROS (Balasubramanian et al., 2007; Calder, Watson y Watson, 2011; Edwards, Watson y Betts, 2016; Favetta, St John, King y Betts, 2007). Sin embargo, la alta tensión de oxígeno representa un desafío para la adquisición de la capacidad de desarrollo de ovocitos y embriones en cualquier estación del año (Tannetta et al., 2014). Otra de las ventajas de la incorporación de 5% O₂, es que los blastocistos son más saludables, visto desde el número de blastómeras e índice de apoptosis, probablemente por la menor

acumulación de ROS (Katz-Jaffe, Linck, Schoolcraft y Gardner, 2005; Ealy, Wooldridge y Mccoki, 2019). La incubación en oxígeno atmosférico no sólo afecta la transcripción de genes sensibles al estrés oxidativo, sino que se ha asociado a alteraciones en la transcripción de múltiples genes involucrados en diversos procesos de importancia para el embrión (Bagheri et al., 2017; Balasubramanian et al., 2007; Gardner y Lane, 2005; Leite et al., 2017; Rinaudo, Giritharan, Talbi, Dobson y Schultz, 2006).

Los estudios revisados hasta ahora han descrito los efectos de las altas temperaturas en ovocitos bovinos MIV a 20% de O₂ y su influencia sobre la adquisición de la competencia ovocitaria, pero no encontramos trabajos que comparen alta y baja tensión de oxígeno durante la MIV y FIV de ovocitos provenientes de vacas expuestas o no al estrés calórico.

HIPÓTESIS:

Los ovocitos colectados en verano tienen menor capacidad de desarrollo que los colectados en invierno. Los ovocitos madurados y fecundados *in vitro* a tensión atmosférica (20%) de oxígeno tienen menor calidad y desarrollo que aquellos mantenidos a baja tensión (5%) de oxígeno. Los efectos del estrés calórico y altas tensiones de oxígeno son aditivos, con los resultados deficientes en la calidad y desarrollo embrionario.

OBJETIVOS:

I. General:

- Evaluar el efecto de la estación del año y la tensión de oxígeno durante la maduración y la fecundación, sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos *in vitro*.

II. Específicos:

- Valorar el efecto estacional sobre la capacidad de desarrollo hasta el estadio de blastocisto de ovocitos bovinos madurados y fecundados *in vitro* en baja y alta tensión de oxígeno.
- Comparar la calidad de blastocistos de ovocitos madurados y fecundados *in vitro*, en dos tensiones de oxígeno y provenientes de vacas expuestas o no a estrés calórico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental: en la Figura 1, se resumen las actividades de este trabajo. Se realizaron al menos diez réplicas, con ovarios colectados durante verano (20 de diciembre de 2021 al dd de febrero de 2022) e invierno (12 de junio al 28 de agosto de 2022). Los ovarios fueron colectados del Frigorífico Tacuarembó (31°42'22" S, 57°53'27" W) y transportados al laboratorio. Se realizó la aspiración de los folículos antrales de 2-8 mm con aguja 18G. Luego de la aspiración de los folículos, se procedió a la búsqueda y selección de los CCO bajo un microscopio estereoscópico. Los ovocitos fueron madurados, fecundados, y los presuntos cigotos se cultivaron *in vitro* siguiendo el protocolo general establecido por el grupo de trabajo (Báez et al., 2019). Durante las etapas de **maduración** y **fecundación** *in vitro* los ovocitos se desarrollaron a 38,5°C en dos diferentes atmósferas gaseosas: un grupo de ovocitos a 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ y otro a 5% CO₂, 20% O₂ y 75% N₂; mientras que los presuntos cigotos se desarrollaron a una temperatura de 38,5°C en una atmósfera 5%CO₂, 5%O₂ y 90%N₂. Los indicadores calculados para cada grupo fueron: tasa de división al día 3, tasa de blastocistos al día 8 y tasa de blastocistos eclosionados.

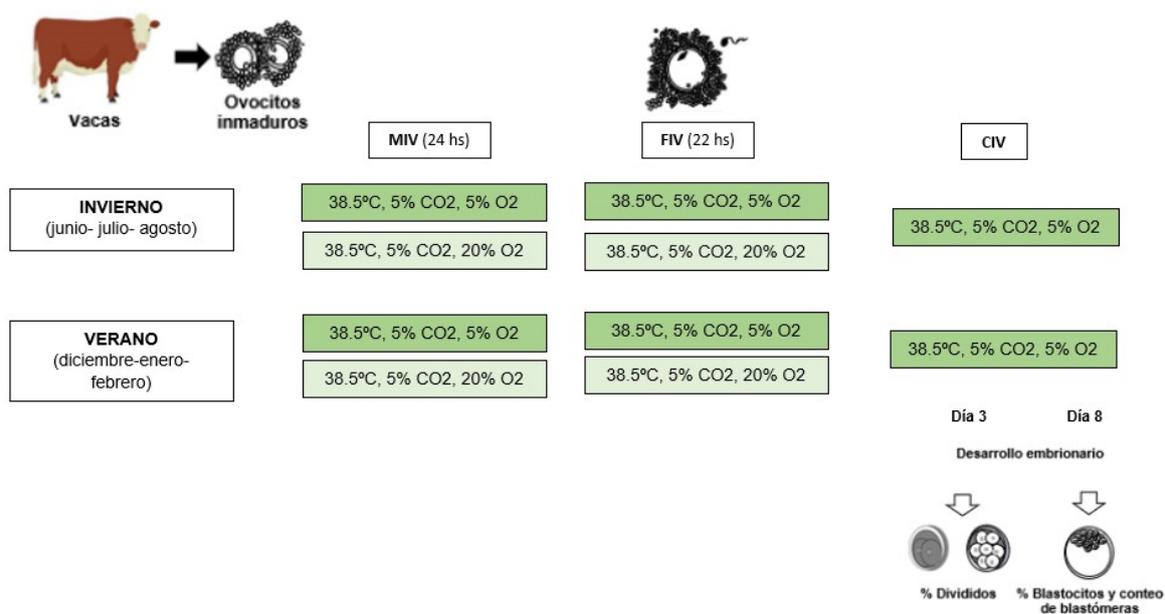


Figura 1. Representación esquemática del diseño experimental. Cuatro grupos experimentales se incluyen en este estudio: un grupo de ovocitos colectados en verano (diciembre de 2021 y enero-marzo de 2022) y otro en invierno (junio-agosto de 2022). Los ovocitos de cada estación del año se subdividieron en dos grupos, según la tensión de oxígeno empleada durante la maduración y fecundación, con lo cual se tuvieron 4 grupos experimentales. Se valoró el desarrollo y la calidad embrionaria. MIV, maduración *in vitro*; FIV, fecundación *in vitro*; CIV, cultivo *in vitro*.

Finalizadas ambas estaciones, se registraron los datos de temperatura del aire y humedad relativa de dos estaciones meteorológicas del Banco Agroclimático del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) localizadas en el Norte del país: Salto (31°16'22" S, 57°53'27" W) y Tacuarembó (31°42'32" S, 55°49'36" W). El

Índice de Temperatura y Humedad (ITH) se calculó con la siguiente fórmula desarrollada por Thom (1959):

$$ITH = (0.8 * T) + (HR/100) * (T - 14.4) + 46.4$$

Donde T es la temperatura del aire en grados Celsius y HR es la humedad relativa (Thom, 1959). En la Tabla 1, se muestra el Índice de Temperatura y Humedad (ITH) determinado para ambas estaciones del año.

Tabla 1. Valores medios, máximos y mínimos del Índice de Temperatura y Humedad (IHT) calculados entre el 20 de diciembre de 2021 y el 28 de marzo de 2022 y el 12 de junio y 28 agosto de 2022.

Estación del año	Verano	Invierno
Media ± DE	72,1± 5,2	54,6± 6,3
Valor máximo	83,0	69,8
Valor mínimo	55,3	45,5

En la figura 2, se observan las oscilaciones en los valores de ITH calculados en el verano y en el invierno austral en los departamentos Salto y Tacuarembó de la Región Norte del país. En el verano 2021-2022, un 25% de los días estuvieron en el rango descrito como “sin riesgo de estrés calórico” que incluye valores de $ITH \leq 68,9$; un 45% de los días corresponden a la franja descrita como “alerta de estrés calórico” ($ITH 69-74,9$). Para los intervalos de “peligro de estrés calórico” ($ITH 75-78,9$) y “emergencia de estrés calórico” ($ITH \geq 79$) los valores fueron 24% y 6%, respectivamente. En cuanto al invierno del año 2022 el 96% de los días estuvieron dentro de la franja “sin riesgo de estrés calórico”, y solo un 4 % restante de los días, fueron clasificados como en “alerta de estrés calórico”.

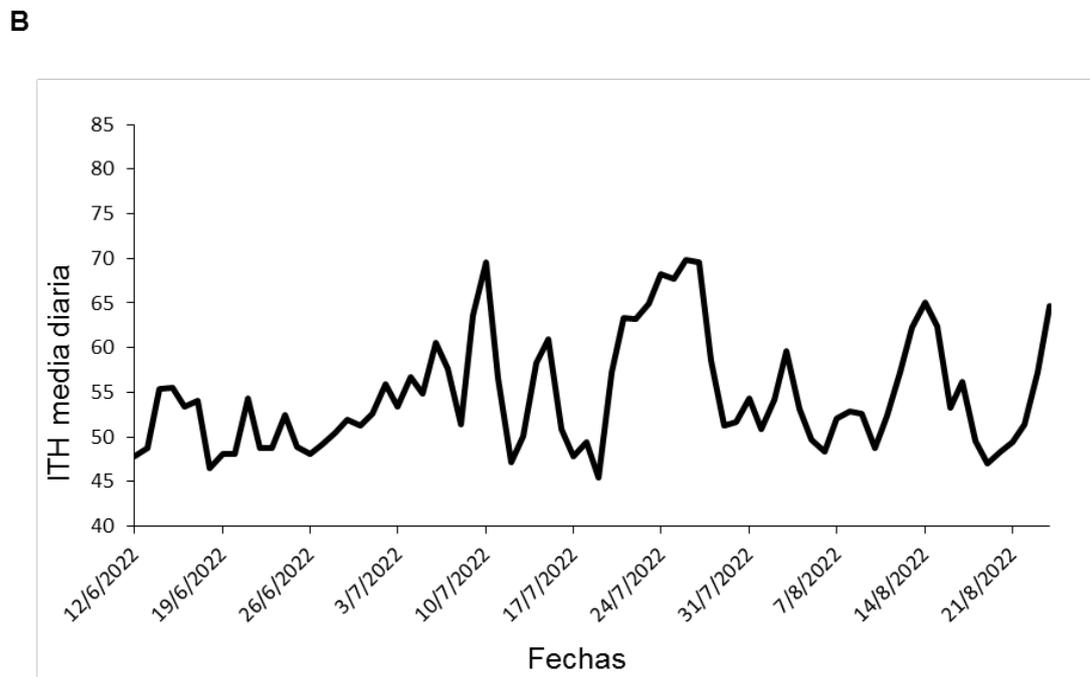
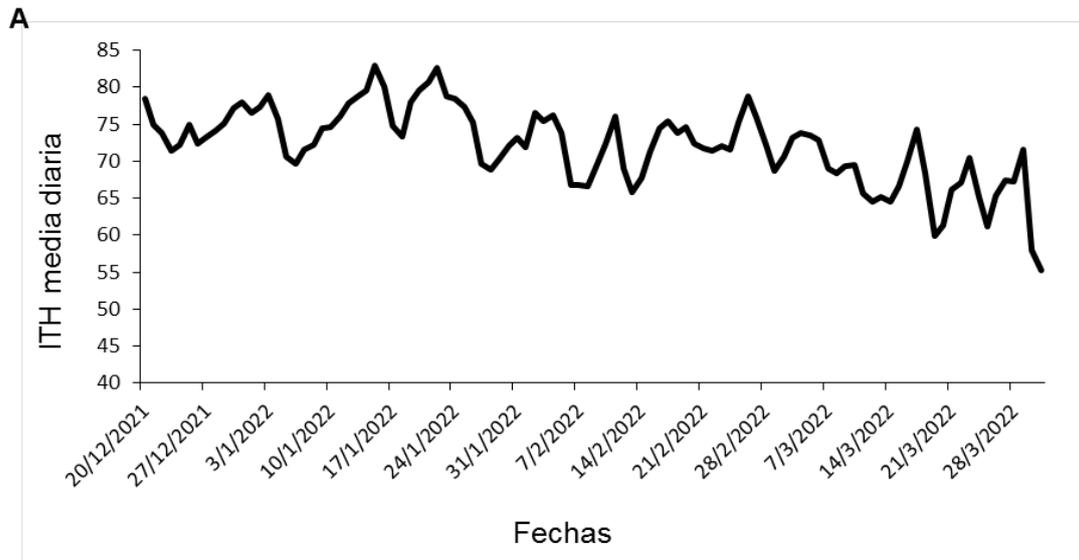


Figura 2. Índice de Temperatura y Humedad (ITH) diarios calculados durante el verano 2021-2022 (A) e invierno 2022 (B). a partir de los datos del Banco Agroclimático del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) de las estaciones de Salto y Tacuarembó.

Producción in vitro de embriones: los CCO fueron madurados en TCM 199 (Gibco 11150059), y suplementado con 10% FCS (v/v), 0,2 mM de piruvato de sodio, 1 µg/mL de hormona foliculo estimulante (FSH, v/v), 5 UI/mL de gonadotropina coriónica equina (eCG, v/v) y 5 µg/mL gentamicina (v/v), durante 24 hs; un grupo con baja tensión de oxígeno (5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂) y otro con alta tensión de oxígeno (5% CO₂, 20% O₂ y 75% N₂). La selección de espermatozoides se llevó a cabo mediante la técnica de *swim-up*, en el medio TL-FIV + hepes. Para la FIV los espermatozoides y los CCO se mantuvieron en cultivo durante 22 hs, en el medio

TL-FIV suplementado con, 50 μ L aminoácidos esenciales, 50 μ L de aminoácidos no esenciales, 20 μ L hipotaurina y 20 μ L heparina. Los presuntos cigotos se cultivaron en mSOFaaci con 5 g/L de BSA (m/v) y 2,5% de FCS a 38,5°C, y con las siguientes condiciones atmosféricas 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂. El desarrollo embrionario se registró en los días 3, 5 y 8 después de la fecundación.

Para calcular el índice de apoptosis se realizó la tinción TUNEL (*In Situ Cell Death Detection Kit*; Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. Los blastocistos se fijaron con paraformaldehído al 2,5 % en PBS durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron dos veces en PBS antes de permeabilizarlos (0,5 % [v/v] Triton X-100 en PBS) durante 40 min a 4°C y se lavaron tres veces durante 5 min en PBS a temperatura ambiente. Luego, los blastocistos se incubaron en la oscuridad con dUTP conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y desoxinucleotidil transferasa terminal a 37°C durante 1 h. Posteriormente, los blastocistos teñidos con TUNEL se lavaron con PBS y se incubaron en PBS que contenía 10 μ g/mL de Hoechst 33342 durante 5 min. Después de lavar con PBS, los blastocistos se montaron en un portaobjetos de vidrio y se tiñeron con Hoechst 33342 diluido en glicerol (1 μ L/mL). En cada ronda de tinción, los controles negativos se prepararon mediante la omisión de la desoxinucleotidil transferasa terminal en la mezcla de reacción, mientras que los controles positivos se prepararon mediante pretratamiento con 1 mg/mL de DNasa I (Roche Diagnostics) en 5 μ L de tampón Tris-HCl, 1 μ L de DNasa, y 30 μ L de H₂O por 50 min a 37,5°C. Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 50i con filtros para FITC (emisión 520 nm y excitación 460–490 nm) y Hoechst (emisión 420 nm y excitación 330–385 nm). Las células positivas para TUNEL se marcaron con fluorescencia verde, lo que indica apoptosis. El número total de células se determinó contando las células marcadas con Hoechst. Todas las células de cada muestra se contaron manualmente utilizando el software de código abierto Fiji/ ImageJ (Schindelin et al., 2012). Finalmente, el índice apoptótico se calculó como un porcentaje de células positivas para FITC dentro de todas las células positivas para Hoechst detectadas.

Análisis estadístico: la proporción de embriones divididos, blastocistos y eclosionados, e índice de apoptosis fueron analizados mediante el análisis de varianza de dos vías. La prueba de medias se realizó con el test de Tukey del procedimiento PROC GLM de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). En todos los casos el nivel de significancia fue de 5% (P<0.05).

RESULTADOS

Los resultados del análisis de varianza para los parámetros que describen el desarrollo y calidad de los embriones producidos *in vitro* durante el verano e

invierno, y con baja y alta tensión de oxígeno son presentados en la Tabla 2. En este trabajo, los ovocitos colectados en invierno presentaron los valores más altos de desarrollo embrionario y menos índices de apoptosis, a diferencia de los ovocitos colectados en verano que arrojaron las menores tasas de blastocistos. Independientemente de la estación del año, el uso de la baja tensión de oxígeno durante todas las fases de la producción *in vitro* de embriones bovinos resultó la condición con mayor número de blastocistos y embriones de mayor calidad, visto desde el número de blastómeras e índice de apoptosis.

Tabla 2. Valores de significancia de los efectos fijos evaluados en el modelo estadístico para la tasa de división temprana, total de blastocistos, blastómeras e índice de apoptosis en embriones bovinos producidos *in vitro* en el invierno y verano y con baja y alta tensión de oxígeno durante la maduración y fecundación *in vitro*.

Variable	Estación	Tensión O ₂	Estación*Tensión O ₂
División	**	**	NS
Blastocistos	**	**	NS
Blastómeras	*	NS	NS
Índice de apoptosis	**	*	NS

NS: no significativo, *P<0,01,**P<0,001.

La baja tensión de O₂ durante la MIV-FIV incrementó significativamente la tasa de división embrionaria y de blastocistos bovinos producidos *in vitro* tanto durante el invierno (89% división embrionaria, 37% blastocistos) como en el verano (80% división embrionaria, 32% blastocistos). Contrariamente, el grupo de ovocitos colectados durante el verano y MIV-FIV con 20% O₂ (71%) presentaron las tasas de desarrollo embrionario más bajas (Figura 3).

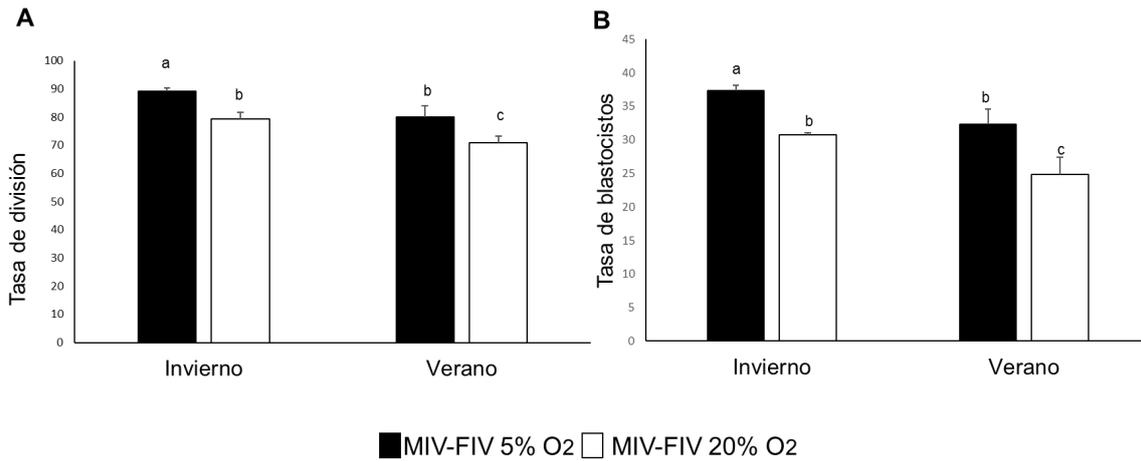


Figura 3. Efecto de la estación (invierno, verano) y tensión de oxígeno (5 y 20%) sobre las tasas de desarrollo embrionario temprano (A) y total de blastocistos (B) bovinos producidos in vitro. Diferentes letras sobre las barras indican diferencia significativa entre los distintos grupos, $P < 0.05$.

El número total de blastómeras fue similar en los grupos de blastocistos producidos durante el invierno con un esquema de MIV-FIV de 5% ($n=137$) y 20% ($n=132$) de O₂ y los blastocistos del verano con 5% ($n=127$) de O₂ (Figura 4A). El menor índice de apoptosis fue observado en el grupo de blastocistos producidos durante el invierno y a un esquema 5% O₂ durante la PIV de embriones (Figuras 4B y 5).

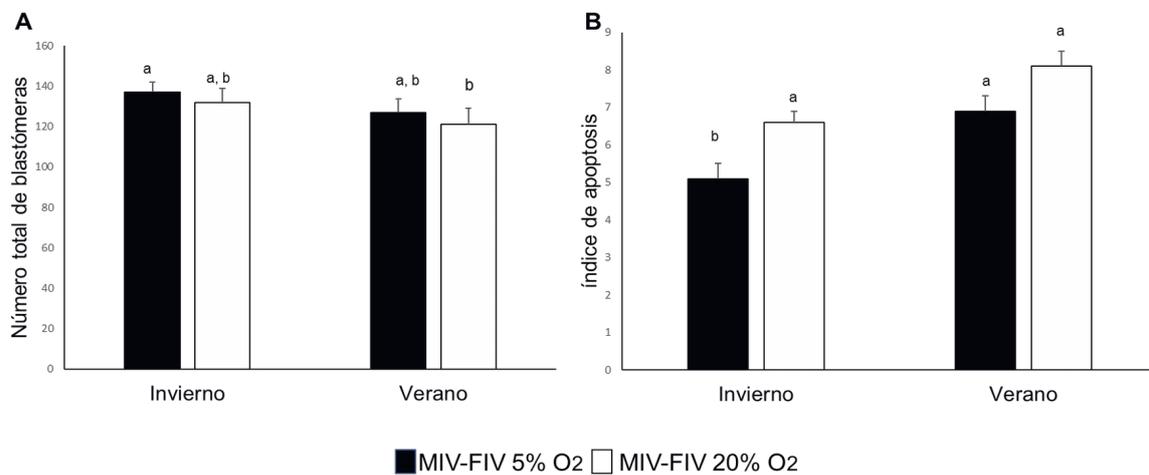


Figura 4. Efecto de la estación (invierno, verano) y tensión de oxígeno (5 y 20%) sobre el número total de blastómeras (A) e índice apoptótico (B) de blastocistos bovinos producidos in vitro y cultivados hasta el día 8. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa entre distintos grupos, $P < 0.05$.

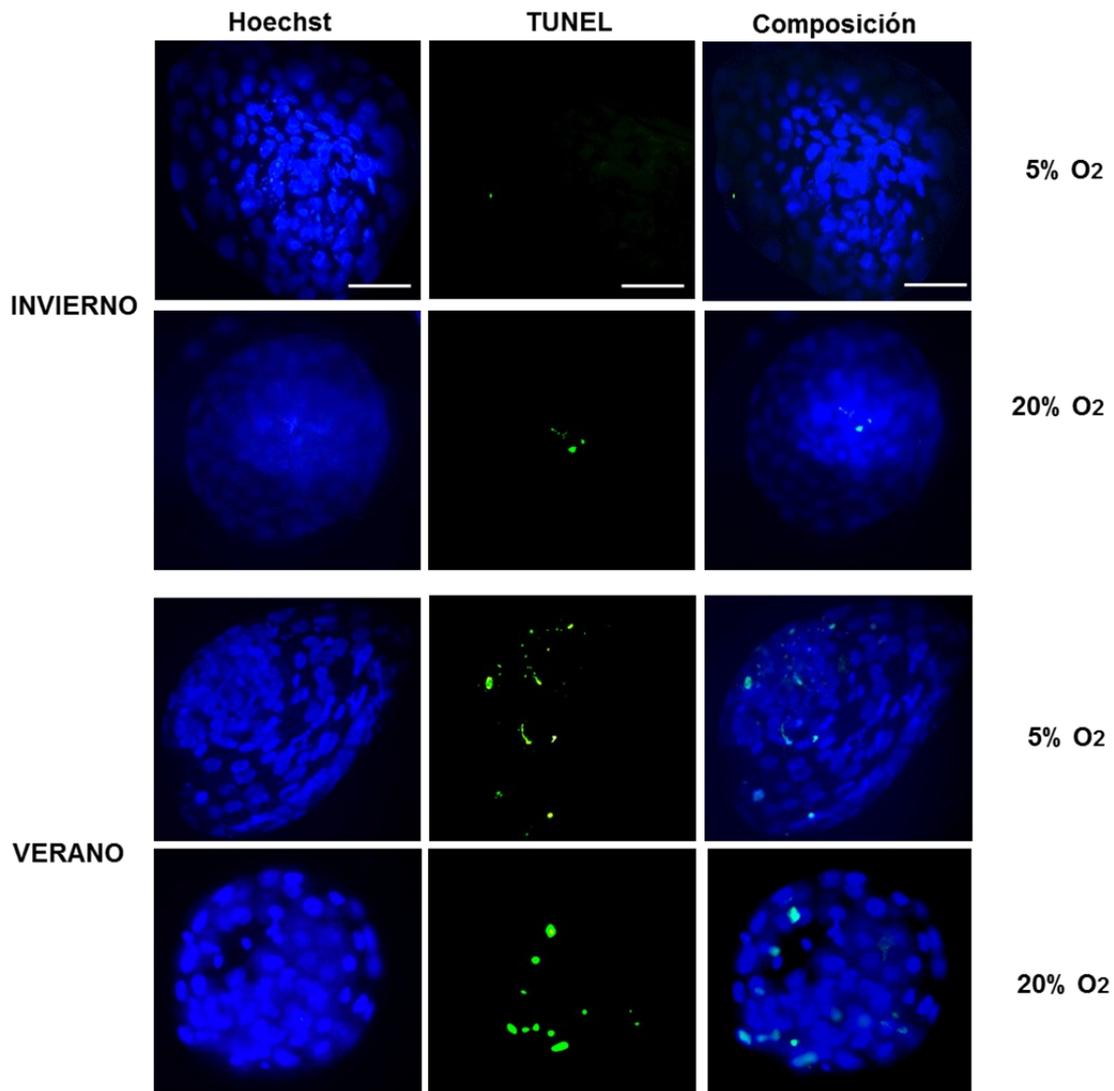


Figura 5. Imágenes digitales de la tinción de Hoechst y TUNEL de blastocistos bovinos producidos in vitro, provenientes de CCO colectados durante el invierno y el verano, y madurados y fecundados in vitro al 5 ó 20% de tensión de oxígeno. La primera fila muestra la tinción con Hoechst (azul) utilizada para la detección de núcleos, la segunda muestra la tinción TUNEL (verde) utilizada para detectar la apoptosis, y la tercera fila es la fusión de las dos imágenes. La barra blanca es equivalente a 50 micras.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio permiten aceptar la hipótesis que los ovocitos colectados en verano tienen menor capacidad de desarrollo que los colectados en invierno, y los madurados y fecundados *in vitro* en alta tensión de oxígeno tienen condiciones menos propicias para su desarrollo que aquellos sometidos a baja tensión de oxígeno. Sin embargo, se rechaza la hipótesis de que haya un efecto de interacción entre los efectos del estrés térmico y altas tensiones de oxígeno. Los índices de ITH calculados demuestran que el 75% de los días del verano estuvieron en el rango de “alerta de estrés calórico agudo” o superior, coincidiendo con Carvajal et al. (2021), quienes describieron una alta frecuencia de calor moderado (ITH > 75) en el centro de América del Sur y en la cuenca del Amazonas. En coincidencia con el ITH reportado en este estudio, Báez et al. (2022), estiman valores de $72,6 \pm 4,9$ durante el verano y $56,6 \pm 3,7$ durante el invierno, para los años 2018-2019 en la misma zona geográfica. Por lo tanto, los bovinos en esta zona geográfica están sometidos con frecuencia a estrés calórico y a sus consecuencias negativas en producción y reproducción en los meses de verano (Báez et al., 2022; Carvajal et al., 2021; Torres-Junior et al., 2008). Los resultados sugieren que el uso de bajas tensiones de oxígeno, durante todas las etapas de la PIV de embriones, podría ser una alternativa para revertir los efectos negativos del estrés calórico sobre la capacidad de desarrollo de los CCO bovinos.

En este trabajo, los CCO colectados durante el verano presentaron una reducción de la competencia para llegar al estadio de blastocistos, comparándolos con los grupos no expuestos a estrés calórico (invierno). Estos resultados coinciden con los de varios autores, quienes describen que el estrés calórico puede comprometer el desarrollo y calidad de los embriones preimplantacionales (Paula-Lopes et al., 2003; Baruselli et al., 2020; Zheng et al., 2020; Ferreira et al. 2011; Báez et al., 2022). De forma opuesta, Silva, Rosa y Knight (2006) realizaron un estudio estacional en el Reino Unido, observando que la proporción de embriones que llegaron a blastocistos fue significativamente mayor en verano (junio-agosto) que en invierno (diciembre-febrero). El desarrollo de ovocitos hasta embriones de ocho o más células y blastocistos, fue más bajo en la primavera. Podemos atribuir las diferencias descritas en los resultados de este trabajo con los nuestros a dos razones fundamentales. Primero, dicho experimento se llevó a cabo en una zona geográfica donde el ITH reportado fue de 58,9 y los veranos son más frescos que en Sudamérica (NASA, 2023). Segundo, los autores plantean que la alimentación de las vaquillonas previo a la recolección de ovocitos pudo tener un efecto en los resultados, ya que es probable que los ovarios obtenidos a principios de la primavera provengan de animales que fueron alimentados con una dieta de concentrado y ensilaje, mientras que los recolectados a fines del verano o principios del otoño fueron probablemente de novillas con una dieta a base de pasturas. Considerando la relevancia que tienen el balance energético y las hormonas

metabólicas en la calidad ovocitaria, consideramos que este es un factor muy relevante a tener en cuenta (Ulloa, 2019).

Embriones obtenidos de ovocitos colectados en verano tuvieron un mayor índice de apoptosis que los obtenidos de ovocitos colectados en invierno. Báez et al. (2022) observaron un aumento en la fragmentación del ADN de las células del cumulus de ovocitos obtenidos en los meses de verano. La reducción en la proporción de blastocistos podría explicarse por un incremento en los niveles de ROS experimentado por los CCO expuestos a estrés calórico. Las ROS dañan el ADN, inducen la apoptosis y comprometen la función de las mitocondrias, organelos clave en el metabolismo celular (Sakatani, 2017). Estos mecanismos podrían explicar la menor capacidad de desarrollo de los ovocitos colectados en verano.

Los resultados de este estudio demuestran que los CCO bovinos tienen una mayor capacidad de desarrollo cuando son madurados, fecundados y cultivados al 5% O₂. Sin embargo, existen resultados inconsistentes en la literatura, probablemente asociado al impacto de la tensión de O₂ en la PIV de embriones de diferentes especies domésticas. Bermejo-Álvarez et al. (2010) concluyen que la baja tensión de oxígeno durante la maduración mejora el desarrollo embrionario, pero no la calidad de los blastocistos bovinos. Preis, Seidel y Gardner (2007) sugieren que los ovocitos bovinos madurados a concentraciones fisiológicas de oxígeno mejoran la actividad metabólica y potencial de desarrollo, asemejándose más a la maduración *in vivo*. Cagliao (2012) evaluó el efecto de la concentración de oxígeno (6% vs 20%) durante la fase de FIV de embriones bovinos, observando que las tasas de división a las 48 horas y el total de blastocistos al día 7 y 8 fueron superiores en el grupo de ovocitos fecundados en 6% de O₂. Leivas et al. (2006) demostraron una mayor proporción de blastocistos eclosionados cuando los ovocitos bovinos fueron madurados y fecundados con 5% O₂. Sin embargo, otro grupo de autores presenta resultados opuestos. Rodrigues et al. (2013) muestran que las tasas de formación de pronúcleos y división embrionaria temprana no estuvieron afectadas por la concentración de oxígeno (5% ó 20%) utilizada durante todas las fases de PIV de embriones caninos. Sánchez-Ajofrín et al. (2020), empleando alta y baja tensión de oxígeno para la MIV y FIV en ovocitos de oveja (*Ovis orientalis aries*) y cierva (*Cervus elaphus*), no encontraron diferencias significativas en la proporción de embriones divididos y blastocistos totales. Pinyopummintr y Bavister (1995) observan que el uso de 5% O₂ no es adecuado para los ovocitos de bovinos durante la MIV y la FIV, pero sin llegar a valorar el desarrollo embrionario. Las diferencias observadas en la especie bovina podrían estar asociadas a la concentración de glucosa en combinación al empleo de diferentes concentraciones de oxígeno. En este sentido, la asociación de altas concentraciones de glucosa y altas tensiones de O₂, favorecen la producción de ROS en el interior del ovocito y comprometen su competencia para soportar el desarrollo embrionario (Hashimoto et al., 2000a, b). Por el contrario, cuando el incremento de la concentración de glucosa tiene lugar en

una atmósfera con una baja tensión de O₂, aumenta el porcentaje de ovocitos que adquieren su competencia para el desarrollo, y como consecuencia presentan mayor producción de energía (Bermejo-Álvarez et al., 2010). En este grupo de ovocitos existe un balance positivo en la producción de ROS y esto repercute de manera favorable en la producción de blastocistos (Hashimoto et al., 2000a; Oyamada y Fukui, 2004). Teniendo en cuenta nuestros resultados y los de otros autores, podemos inferir que el uso de 5% O₂ durante la MIV-FIV de los ovocitos bovinos, podría ser beneficioso para el desarrollo y la calidad embrionaria.

Los blastocistos producidos con baja tensión de O₂, tuvieron un menor índice apoptótico que los producidos a alta tensión de O₂. Los resultados del estudio de He et al. (2020), donde se compararon diferentes tensiones de oxígeno (1%, 5%, 10% y 20% O₂) durante la MIV, FIV y CIV de ovocitos de yak (*Bos grunniens*), concuerdan con los del presente estudio. Los autores reportan que bajo 5% O₂ se obtuvieron menores tasas de apoptosis en las células del cúmulus, mayores tasas de maduración y blastocistos, al igual que mayor número de blastómeras y menor índice de apoptosis. Adicionalmente, estos resultados son similares a lo reportado por Katz-Jaffe et al. (2005) y Ealy et al. (2019), quienes describen que otra de las ventajas de la incorporación de 5% O₂, es que los blastocistos son más saludables, con mayor número de blastómeras, menor producción de ROS y menor índice de apoptosis. En este estudio, queda demostrado el impacto positivo de la baja tensión de O₂ en las diferentes etapas de PIV, aunque estudios de expresión génica de los embriones son necesarios para dilucidar los mecanismos.

Los CCO provenientes de la época más calurosa y MIV-FIV a 20% O₂ presentaron la menor proporción y calidad en los embriones PIV. De Castro Paula y Hansen (2005) comprobaron que un ambiente con alto contenido de oxígeno exacerba la magnitud de los efectos nocivos del choque térmico durante el cultivo *in vitro* de los embriones bovinos. Sin embargo, la proporción de blastocistos fue similar para los grupos de ovocitos que fueron sometidos a choque térmico durante MIV en alta y baja tensión de oxígeno (De Castro Paula y Hansen, 2007). Según, Yuan et al. (2008), afirman que la exposición de los CCO a altas temperaturas induce a la síntesis de sustancias tóxicas por parte de las células del cumulus que comprometen la calidad de los ovocitos y su posterior desarrollo embrionario. En el grupo del invierno, la proporción de células apoptóticas se redujo, empleando 5% O₂ durante la MIV y FIV; mientras que para el grupo del verano y MIV-FIV a 20% de oxígeno presentó la mayor proporción de células apoptóticas. En consecuencia, la baja capacidad de desarrollo de los ovocitos durante el verano, acompañados con protocolos de MIV con alta tensión de O₂, podría deberse a una menor calidad de las células del cumulus, considerando la relevancia de la comunicación entre el cumulus y el ovocito durante esta etapa de desarrollo (Báez et al., 2022). Por tanto, el uso de bajas concentraciones de O₂ (5%) podría ser una alternativa para mejorar las tasas de

desarrollo y calidad embrionaria *in vitro* en ovocitos bovinos colectados durante las épocas más calurosas o provenientes de vacas estresadas por calor.

CONCLUSIONES

El estrés calórico y la alta tensión de oxígeno en forma independiente tienen un efecto negativo sobre la tasa de desarrollo embrionario, número de blastómeras y porcentaje de apoptosis. La utilización de baja tensión de oxígeno durante todas las fases de PIV embriones mejora los efectos negativos del estrés calórico sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

El aumento en la temperatura global producto del cambio climático tiene importantes repercusiones en la productividad y bienestar animal, particularmente en los sistemas pastoriles (Nardone et al., 2010). La mayor frecuencia de fenómenos climáticos extremos (sequías en verano), afecta la productividad del forraje, cantidad y calidad del agua, producción de carne y eficiencia reproductiva de las vacas de cría (Blanco-Penedo, Cantalapiedra y Llonch, 2020). Por lo tanto, la generación de conocimiento y herramientas tendientes a atenuar los efectos negativos del estrés calórico, son relevantes para mantener una buena salud reproductiva que derivará en la producción de terneros y ganancia económica del país. Los resultados de este trabajo sugieren que se mitiga el efecto negativo del estrés calórico sobre los ovocitos bovinos con el uso de baja tensión de oxígeno durante todas las fases de la producción *in vitro* de embriones. Sin embargo, se debe continuar investigando la expresión génica en los ovocitos y embriones producidos *in vitro*, para comprender los mecanismos y generar herramientas para revertir los daños ocasionados por el calor, son aspectos de gran relevancia para nuestros sistemas de producción pastoriles.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdoon, A. S., Gabler, C., Holder, C., Kandil, O. M., & Einspanier, R. (2014). Seasonal variations in developmental competence and relative abundance of gene transcripts in buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Theriogenology*, *82*(8), 1055-1067.
- Aggarwal, A., & Upadhyay, R.C. (2013). *Heat Stress and Animal Productivity*. New Delhi: Springer.
- Al-Katanani, Y. M., Paula-Lopes, F. F., & Hansen, P. J. (2002). Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, *85*(2), 390-396. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(02\)74086-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(02)74086-1)
- Arias, R.A., Mader, T.L., & Escobar, P.C. (2008). Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne y leche. *Archivos de medicina veterinaria*, *40*(1), 7-22. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2008000100002>
- Badinga, L., Thatcher, W. W., Diaz, T., Drost, M., & Wolfenson, D. (1993). Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, *39*(4), 797-810. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(93\)90419-6](https://doi.org/10.1016/0093-691x(93)90419-6)
- Báez, F., Camargo, Á., Reyes, A. L., Márquez, A., Paula-Lopes, F., & Viñoles, C. (2019). Time-dependent effects of heat shock on the zona pellucida ultrastructure and in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Reproductive Biology*, *19*(2), 195-203.
- Báez, F., López Darriulat, R., Rodríguez-Osorio, N., & Viñoles, C. (2022). Effect of season on germinal vesicle stage, quality, and subsequent in vitro developmental competence in bovine cumulus-oocyte complexes. *Journal of Thermal Biology*, *103*, 103171. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103171>
- Bagheri, D., Kazemi, P., Sarmadi, F., Shamsara, M., Hashemi, E., Daliri Joupari, M., & Dashtizad, M. (2018). Low oxygen tension promotes invasive ability and embryo implantation rate. *Reproductive Biology*, *18*(3), 295-300. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.05.003>

- Bailey, T., Sheets, J., McClary, D., Smith, S., & Bridges, A. (2016). *Heat Abatement*. Recuperado de <https://assets.ctfassets.net>
- Balasubramanian, S., Son, W. J., Kumar, B. M., Ock, S. A., Yoo, J. G., Im, G. S., y Rho, G. J. (2007). Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. *Theriogenology*, 68(2), 265-275. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.044>
- Balboula, A. Z., Yamanaka, K., Sakatani, M., Kawahara, M., Hegab, A. O., Zaabel, S. M., & Takahashi, M. (2013). Cathepsin B activity has a crucial role in the developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes exposed to heat shock during *in vitro* maturation. *Reproduction (Cambridge)*, 146(4), 407-417. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0179>
- Banwell, K. M., Lane, M., Russell, D. L., Kind, K. L., & Thompson, J. G. (2007). Oxygen concentration during mouse oocyte in vitro maturation affects embryo and fetal development. *Human Reproduction (Oxford)*, 22(10), 2768-2775. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem203>
- Bartaburu, D. (2007). Stress Calórico: un tema de bienestar animal y productivo. *Plan Agropecuario*, 121, 46-49.
- Baruselli, P. S., Ferreira, R. M., Vieira, L. M., Souza, A. H., Bó, G. A., & Rodrigues, C. A. (2020). Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. *Theriogenology*, 155, 1-11.
- Beede, D. K., & Collier, R. J. (1986). Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. *Journal of Animal Science*, 62(2), 543-554.
- Bermejo-Alvarez, P., Lonergan, P., Rizos, D., & Gutiérrez-Adan, A. (2010). Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. *Reproductive Biomedicine Online*, 20(3), 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.12.006>

- Blanco-Penedo, I., Cantalapiedra, J., & Llonch, P. (2020). Impacto del cambio climático sobre el bienestar animal en los sistemas ganaderos. *ITEA Información Técnica Económica Agraria*, 116(5), 0424-443.
- Boni, R. (2019). Heat stress, a serious threat to reproductive function in animals and humans. *Molecular Reproduction and Development*, 86(10), 1307-1323. <https://doi.org/10.1002/mrd.23123>
- Bontekoe, S., Mantikou, E., van Wely, M., Seshadri, S., Repping, S., & Mastenbroek, S. (2012). Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *The CCOhrane Database of Dystematic Reviews*, (7), CD008950. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008950.pub2>
- Brown-Brandl, T. M. (2018). Understanding heat stress in beef cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47, e20160414.
- Cagiao, J. M. C. (2012). *Diseño de un medio definido para la maduración in vitro de ovocitos bovinos en baja tensión de oxígeno* (Doctoral dissertation). Universidade de Santiago de Compostela.
- Calder, M. D., Watson, P. H., & Watson, A. J. (2011). Culture medium, gas atmosphere and MAPK inhibition affect regulation of RNA-binding protein targets during mouse preimplantation development. *Reproduction*, 142(5), 689-698. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0082>
- Carvajal, M. A., Alaniz, A. J., Gutiérrez-Gómez, C., Vergara, P. M., Sejian, V., & Bozinovic, F. (2021). Increasing importance of heat stress for cattle farming under future global climate scenarios. *Science of the Total Environment*, 801. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149661>
- Cheng, Y., Liu, S., Zhang, Y., Su, D., Wang, G., Lv, C., ... Zhang, J. (2016). The effect of heat stress on bull sperm quality and related HSPs expression. *Animal Biology*, 66(3-4), 321-333. <https://doi.org/10.1163/15707563-00002507>
- Cohen, J. E. (2001, June). World population in 2050: assessing the projections. En *Conference Series-Federal Reserve Bank of Boston* (Vol. 46, pp. 83-113). Boston: Federal Reserve Bank of Boston.

- Cruz, G. (2009). *Biometeorología del calor sobre la producción de leche de vacas Holstein en Uruguay* (Tesis). Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo.
- de Castro, E., Paula, L. A., & Hansen P. J. (2005). Effect of oxygen tension on heat-shock induced apoptosis and development of preimplantation bovine embryos. *Biology of Reproduction*, (special issue), 155 [abstract].
- de Castro, E., Paula, L. A., & Hansen, P. J. (2007). Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology*, 68(5), 763-770. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.005>
- De Rensis, F., Saleri, R., Garcia-Ispierito, I., Scaramuzzi, R., & López-Gatiús, F. (2021). Effects of Heat Stress on Follicular Physiology in Dairy Cows. *Animals*, 11(12), 3406. <https://doi.org/10.3390/ani11123406>
- Delgado, C. L. (2003). Rising consumption of meat and milk in developing countries has created a new food revolution. *The Journal of Nutrition*, 133(11), 3907S-3910S.
- Delgado, C.L., Rosegrant, M., Steinfeld, H., Ehui, S., & Courbois, C. (1999). *Livestock to 2020: the next food revolution*. Washington: IFPRI.
- Du Preez, J. H., Hattingh, P. J., Giesecke, W. H., & Eisenberg, B. E. (1990). Heat stress in dairy cattle and other livestock under southern African conditions. III. Monthly temperature-humidity index mean values and their significance in the performance of dairy cattle. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 57(4), 243-248.
- Dumollard, R., Duchon, M., & Carroll, J. (2007). The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Current Topics in Developmental Biology*, 77, 21-49. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)77002-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)77002-8)
- Ealy, A. D., Wooldridge, L. K., & MCCOKi, S. R. (2019). Board invited review: Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. *Journal of Animal Science*, 97(6). <https://doi.org/10.1093/jas/skz116>
- Edwards, N. A., Watson, A. J., & Betts, D. H. (2016). P66Shc, a key regulator of metabolism and mitochondrial ROS production, is dysregulated by mouse embryo culture. *Molecular Human Reproduction*, 22(9), 634-647. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw043>

- Favetta, L. A., St John, E. J., King, W. A., & Betts, D. H. (2007). High levels of p66shc and intracellular ROS in permanently arrested early embryos. *Free Radical Biology & Medicine*, 42(8), 1201-1210. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.018>
- Fedrigo, J. K., Báez, F., Santa Cruz, R., & Viñoles, C. (2021). Heat tolerance in cows of British breeds and their crosses with bonsmara under grazing conditions. *Journal of Thermal Biology*, 102, 103118.
- Ferreira, R. M., Ayres, H., Chiaratti, M. R., Ferraz, M. L., Araújo, A. B., Rodrigues, C. A., ... Baruselli, P. S. (2011). The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2383-2392. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3904>
- Ferreira, R. M., Chiaratti, M. R., Macabelli, C. H., Rodrigues, C. A., Ferraz, M. L., Watanabe, Y. F., ... Baruselli, P. S. (2016). The Infertility of Repeat-Breeder Cows During Summer Is Associated with Decreased Mitochondrial ADN and Increased Expression of Mitochondrial and Apoptotic Genes in Oocytes. *Biology of Reproduction*, 94(3), 66. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.133017>
- Fregley, M.J. (1996). Adaptations: some general characteristics. En M.J. Fregley, B.latteis, C.M. (Eds.), *Handbook of Physiology. Section 4. Environmental Physiology* (Vol. I., pp. 3-15). Oxford: Oxford University.
- Gardner, D. K., & Lane, M. (2005). Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reproduction, Fertility, and Development*, 17(3), 361-370. <https://doi.org/10.1071/rd04103>
- Gendelman, M., Aroyo, A., Yavin, S., & Roth, Z. (2010). Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction (Cambridge)*, 140(1), 73-82. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0055>
- Gendelman, M., & Roth, Z. (2012a). Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine oocytes is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos associated with reduced developmental competence. *Biology of Reproduction*, 86(1), 8-1.
- Gendelman, M., & Roth, Z. (2012b). *In vivo* vs. *in vitro* models for studying the effects of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent

developmental competence and gene expression. *Animal Reproduction science*, 134(3-4), 125-134.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.07.009>

- Gilad, E., Meidan, R., Berman, A., Graber, Y., & Wolfenson, D. (1993). Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *Reproduction*, 99(2), 315-321. doi: 10.1530/JRF.0.0990315
- Guarneri, C., Restelli, L., Mangiarini, A., Ferrari, S., Somigliana, E., & Paffoni, A. (2015). Can we use incubators with atmospheric oxygen tension in the first phase of in vitro fertilization? A retrospective analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(1), 77-82.
<https://doi.org/10.1007/s10815-014-0368-z>
- Gutiérrez Abad, M. (2018). *Estrés calórico en la hembra bovina: cambios fisiológicos in vivo y modelo de estudio in vitro de ovocitos* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.
- Hansen P. J. (2009). Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1534), 3341-3350.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0131>
- Hahn, G. L., Mader, T. L., & Eigenberg, R. A. (2003). Perspective on development of thermal indices for animal studies and management. *EAAP Technical Series*, 7, 31-44.
- Harvey, A. J. (2007). The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Animal Reproduction Science*, 98(1-2), 113-128.
- Hashimoto, S. (2009). Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. *The Journal of Reproduction and Development*, 55(1), 1-10.
<https://doi.org/10.1262/jrd.20127>
- Hashimoto, S., Minami, N., Takakura, R., Yamada, M., Imai, H., & Kashima, N. (2000a). Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus–oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 57(4), 353-360.

- Hashimoto, S., Minami, N., Yamada, M., & Imai, H. (2000b). Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 56(4), 520-526.
- Hashimoto, S., Murata, Y., Kikkawa, M., Sonoda, M., Oku, H., Murata, T., ... Morimoto, Y. (2007). Successful delivery after the transfer of twice-vitrified embryos derived from in vitro matured oocytes: a case report. *Human Reproduction (Oxford)*, 22(1), 221-223. <https://doi.org/10.1093/humrep/del354>
- He, H., Zhang, H., Li, Q., Fan, J., Pan, Y., Zhang, T., ... Yu, S. (2020). Low oxygen concentrations improve yak oocyte maturation and enhance the developmental competence of preimplantation embryos. *Theriogenology*, 156, 46-58.
- Hill, R.W., Wyse, G.A., & Anderson, M. (2006). *Fisiología Animal*. Madrid: Médica Panamericana.
- Hung, W. T., Hong, X., Christenson, L. K., & McGinnis, L. K. (2015). Extracellular Vesicles from Bovine Follicular Fluid Support Cumulus Expansion. *Biology of Reproduction*, 93(5), 117. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.132977>
- Jia, T., Jia, X., & Zhong, C. (2012, May). Effects of Heat Stress on the Reproductive Performance of Mammals. En *2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology* (pp. 1408-1411). Macau: IEEE.
- Johnson, H. D. (1980). Depressed chemical thermogenesis and hormonal functions in heat. En *Environmental Physiology: aging, heat, and altitude* (pp. 3-9). New York: Elsevier.
- Ju, J., Jiang, S., Tseng, J.K., Parks, J.E., & Yang, X. (2005). Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 64,1677-1689.
- Ju, J.C., & Tseng, J-K. (2004). Nuclear and cytoskeletal alterations of in vitro matured porcine oocytes under hyperthermia. *Molecular Reproduction and Development*, 68, 125-133.

- Kadzere, C.T., Murphy, M.R., Silanikove, N., & Maltz, E. (2002). Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science*, 77, 59-91.
- Katz-Jaffe, M. G., Linck, D. W., Schoolcraft, W. B., & Gardner, D. K. (2005). A proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development, *Reproduction*, 130(6), 899-905. Recuperado de <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/130/6/1300899.xml>
- Klein, B.G. (2014). *Fisiología Veterinaria* (5ª. ed.). Barcelona: Elsevier.
- Kobayashi, Y., Wakamiya, K., Kohka, M., Yamamoto, Y., & Okuda, K. (2013). Summer heat stress affects prostaglandin synthesis in the bovine oviduct. *Reproduction*, 146, 103-10. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0479>
- Lacetera, N., Bernabucci, U., Ronchi, B., & Nardone, A. (1996). Body condition score, metabolic status and milk production of early lactating dairy cows exposed to warm environment. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 90(1), 43-55.
- Lacetera, N., Bernabucci, U., Ronchi, B., & Nardone, A. (2003). Physiological and productive consequences of heat stress. The case of dairy ruminants. *Proceedings of the Symposium on interaction between climate and animal production: EAAP Technical Series*, 7, 45-60.
- Latorraca, LL., Feitosa, W.B., & Paula-Lopes, F. (2019). *Respuestas de los ovocitos al estrés calórico* (Tesis de maestría). Instituto de Biociências, Universidad Estadual de San Pablo "Júlio Mesquita Filho", Botucatu.
- Leite, R. F., Annes, K., Ispada, J., de Lima, C. B., Dos Santos, É. C., Fontes, P. K., ... Milazzotto, M. P. (2017). Oxidative stress alters the profile of transcription factors related to early development on *in vitro* produced embryos. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1502489. <https://doi.org/10.1155/2017/1502489>
- Leivas, F. G., Brum, D. S., Saliba, W. P., Alvim, M. T. T., Bernardi, M. L., Rubin, M. I. B., & Silva, C. A. M. (2018). Oxygen tension in IVM and IVF of bovine oocytes: effect on embryonic development and pregnancy rate. *Animal Reproduction (AR)*, 3(4), 439-445.
- Malayer, J. R., Hansen, P. J., & Buhi, W. C. (1988). Effect of day of the oestrous cycle, side of the reproductive tract and heat shock on in-vitro protein secretion by bovine endometrium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 84(2), 567-578. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0840567>

- Matsuzuka, T., Ozawa, M., Nakamura, A., Ushitani, A., Hirabayashi, M., & Kanai, Y. (2005). Effects of heat stress on the redox status in the oviduct and early embryonic development in mice. *Journal of Reproduction and Development*, 51(2), 281-287. <https://doi.org/10.1262/jrd.16089>
- Maya-Soriano, M. J., López-Gatius, F., Andreu-Vázquez, C., & López-Béjar, M. (2013). Bovine oocytes show a higher tolerance to heat shock in the warm compared with the cold season of the year. *Theriogenology*, 79(2), 299-305. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.08.020>
- Morignat, E., Gay, E., Vinard, J. L., Sala, C., Calavas, D., & Hénaux, V. (2018). Impact of heat and cold waves on female cattle mortality beyond the effect of extreme temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 78, 374-380. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.11.001>
- Morrell, J. M. (2020). Heat stress and bull fertility. *Theriogenology*, 153, 62-67. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.014>
- Nanas, I., Chouzouris, T. M., Dadouli, K., Dovolou, E., Stamperna, K., Barbagianni, M., ... Amiridis, G. S. (2020). A study on stress response and fertility parameters in phenotypically thermotolerant and thermosensitive dairy cows during summer heat stress. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(12), 1774-1783. <https://doi.org/10.1111/rda.13840>
- Nardone, A. (2002). Evolution of livestock production and quality of animal products. *Proceedings of the Annual Meeting of the Brazilian Society of Animal Science*, 39, 486-513.
- Nardone, A., Ronchi, B., Lacetera, N., Ranieri, M. S., & Bernabucci, U. (2010). Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. *Livestock Science*, 130(1-3), 57-69. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.02.011>
- National Aeronautics and Space Administration. (2023). *The Power Project*. Recuperado de <https://power.larc.nasa.gov/>
- Nienaber, J. A., & Hahn, G. L. (2007). Livestock production system management responses to thermal challenges. *International Journal of Biometeorology*, 52(2), 149-157.
- Oyamada, T., & Fukui, Y. (2004). Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *The Journal of Reproduction and Development*, 50(1), 107-117. <https://doi.org/10.1262/jrd.50.107>

- Pasquariello, R., Bocchi, V., Brevini, T. A. L., & Gandolfi, F. (2017). In search of the transcriptional blueprints of a competent oocyte. *Animal Reproduction*, 14(1), 34-47. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR894>
- Paula, L. A. D. E., & Hansen, P. J. (2005). Effect of oxygen tension on heat-shock induced apoptosis and development of preimplantation embryos. En *Biology of reproduction* (pp. 155-155). Madison: Soc Study Reproduction.
- Paula-Lopes, F. F., Al-Katanani, Y. M., Majewski, A. C., McDowell, L. R., & Hansen, P. J. (2003). Manipulation of antioxidant status fails to improve fertility of lactating cows or survival of heat-shocked embryos. *Journal of Dairy Science*, 86(7), 2343-2351. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73827-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73827-2)
- Paula-Lopes, F. F., Lima, R. S., Risolia, P. H. B., Ispada, J., Assumpção, M. E. O. A., & Visintin, J. A. (2012). Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. *Animal Reproduction*, 9(3), 395-403.
- Paula-Lopes, F. F., & Hansen, P. J. (2002). Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(1), 37-42. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)00619-8](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)00619-8). 2002a
- Payton, R. R., Rispoli, L. A., Saxton, A. M., & Edwards, J. L. (2011). Impact of heat stress exposure during meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo ARN populations. *The Journal of Reproduction and Development*, 57(4), 481-491. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-163m>
- Pinyopummintr, T., & Bavister, B. D. (1995). Optimum gas atmosphere for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 44(4), 471-477. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(95\)00219-x](https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00219-x)
- Pires, B. V., Stafuzza, N. B., Lima, S. B. G. P. N. P., Negrão, J. A., & Paz, C. C. P. (2019). Differential expression of heat shock protein genes associated with heat stress in Nelore and Caracu beef cattle. *Livestock Science*, 230, 103839.
- Preis, K. A., Seidel, G. E., Jr, & Gardner, D. K. (2007). Reduced oxygen concentration improves the developmental competence of mouse oocytes following *in vitro* maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 74(7), 893-903. <https://doi.org/10.1002/mrd.20655>

- Rahman, M. B., Schellander, K., Luceño, N. L., & Van Soom, A. (2018). Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. *Theriogenology*, 113, 102-112. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.012>
- Rocha, A., Randel, R. D., Broussard, J. R., Lim, J. M., Blair, R. M., Roussel, J. D., ... Hansel, W. (1998). High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, 49(3), 657-665. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00016-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00016-8)
- Rodrigues, B. A., Rodrigues, C. A., Salviano, M. B., Wilhelm, B. R., Collares, F. J., & Rodrigues, J. L. (2013). Similar patterns of embryo development in canine oocytes cultured in vitro at oxygen tensions of 5 and 20%. *Theriogenology*, 79(8), 1224-1228. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.022>
- Roelen, B. (2019). Bovine oocyte maturation: acquisition of developmental competence. *Reproduction, Fertility, and Development*, 32(2), 98-103. <https://doi.org/10.1071/RD19255>
- Roman-Ponce, H., Thatcher, W. W., Caton, D., Barron, D. H., & Wilcox, C. J. (1978). Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. *Journal of Animal Science*, 46(1), 175-180. <https://doi.org/10.2527/jas1978.461175x>
- Roth, Z. (2008). Heat Stress, the Follicle, and Its Enclosed Oocyte: Mechanisms and Potential Strategies to Improve Fertility in Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(Suppl.2), 238-244. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01168.x>
- Roth, Z. (2021). Heat stress reduces maturation and developmental capacity in bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 33(2), 66-75. <https://doi.org/10.1071/RD20213>
- Roth, Z., Meidan, R., Braw-Tal, R., & Wolfenson, D. (2000). Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120(1), 83-90.
- Roth, Z., & Hansen, P. J. (2005). Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction (Cambridge)*, 129(2), 235-244. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00394>

- Rinaudo, P. F., Giritharan, G., Talbi, S., Dobson, A. T., & Schultz, R. M. (2006). Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertility and Sterility*, 86(4 Suppl), .
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.05.017>
- Rovira, P. (2012). Uso de la sombra en la cría de novillos en sistemas pastoriles de la región este del Uruguay. *INIA Serie Técnica*, 202, 1-84.
- Sakatani M. (2017). Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced in vitro. *The Journal of Reproduction and Development*, 63(4), 347-352. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-045>
- Sánchez-Ajofrín, I., Iniesta-Cuerda, M., Sánchez-Calabuig, M. J., Peris-Frau, P., Martín-Maestro, A., Ortiz, J. A., ... Soler, A. J. (2020). Oxygen tension during in vitro oocyte maturation and fertilization affects embryo quality in sheep and deer. *Animal Reproduction Science*, 213, 106279.
- Santa Cruz, R., da Silva A., Fedrigo, J.K., Benítez, V., & Viñoles, C. (2019). El creep feeding y el ambiente atmosférico afectan el momento de concepción en vacas para carne en pastoreo. Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Jornada Uruguaya Buiatría* (Vol. XLVII, p. 5). Paysandú: CMVP.
- Santa Cruz, R., Fedrigo, J., Benítez, V., & Viñoles, C. (2018). Condiciones ambientales durante el entore en sistemas de cría pastoriles en Uruguay. En *Encuentro Investigadores de la Región Noreste*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/327112340_Condiciones_ambientales_durante_el_entore_en_sistemas_de_cria_pastoriles_en_Uruguay/link/5b7a97584585151fd121f243/download
- Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S. A., Guenther, J. N., Parrish, J. J., & Wiltbank, M. C. (2002). Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2803-2812.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74367-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74367-1)
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

- Sciorio, R., & Smith, G. D. (2019). Embryo culture at a reduced oxygen concentration of 5%: a mini review. *Zygote (Cambridge)*, 27(6), 355-361. <https://doi.org/10.1017/S0967199419000522>
- Shen, P.C., Lee, J.W., Cheng, W.T.K., Su, H.Y., Lee, S.N., Liu, B.T., ... Ju, J.C. (2010). Differential thermal sensitivity between the recipient ooplasm and the donor nucleus in Holstein and Taiwan native yellow cattle. *Theriogenology*, 74, 1587- 1595.
- Silva, C. C., Rosa, H. J. D., & Knight, P. G. (2006). Seasonal variations in the developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Veterinary Record*, 158(14), 473-475. <https://doi.org/10.1136/vr.158.14.473>
- Sohel, M. M., Hoelker, M., Noferesti, S. S., Salilew-Wondim, D., Tholen, E., Looft, C., ... Tesfaye, D. (2013). Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular micrnas in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. *PloS one*, 8(11), e78505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078505>
- Son, W. Y., Lee, S. Y., & Lim, J. H. (2005). Fertilization, cleavage and blastocyst development according to the maturation timing of oocytes in in vitro maturation cycles. *Human Reproduction (Oxford)*, 20(11), 3204-3207. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei195>
- St-Pierre, N. R., Cobanov, B., & Schnitkey, G. (2003). Economic losses from heat stress by US livestock industries1. *Journal of Dairy Science*, 86(Suppl. 1). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74040-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74040-5)
- Stoffel, W., Schmidt-Soltau, I., Binczek, E., Thomas, A., Thevis, M., & Wegner, I. (2020). Dietary ω 3-and ω 6-Polyunsaturated fatty acids reconstitute fertility of Juvenile and adult Fads2-Deficient mice. *Molecular Metabolism*, 36, 100974. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.100974>
- Sudano, M. J., Santos, V. G., Tata, A., Ferreira, C. R., Paschoal, D. M., Machado, R., ... Landim-Alvarenga, F. D. (2012). Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro-and in vivo-produced blastocysts. *Biology of Reproduction*, 87(6), 130-131.

- Tannetta, D., Dragovic, R., Alyahyaei, Z., & Southcombe, J. (2014). Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. *Cellular & Molecular Immunology*, 11(6), 548-563. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.42>
- Thatcher, W. W., Meyer, M. D., & Danet-Desnoyers, G. (1995). Maternal recognition of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 49 (Suppl), 15-28.
- Thom, E. C. (1959). The discomfort index. *Weatherwise*, 12(2), 57-61.
- Torres-Júnior, J. D. S., De FA Pires, M., De Sa, W. F., Ferreira, A. D. M., Viana, J. H. M., Camargo, L. S. D. A., ... Baruselli, P. S. (2008). Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 69 (2), 155-166.
- Tseng J.K., Chen C.H., Chou P.C., Yeh S.P., & Ju J.C. (2004). Influences of follicular size on parthenogenetic activation and in vitro heat shock on the cytoskeleton in cattle oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 39, 146-153.
- Ulloa Ulloa, L. A. (2019). *Efecto del balance energético negativo sobre el desarrollo ovárico en vacas lecheras posparto* (Tesis de maestría). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba.
- Webster, A. J. F. (1991). Metabolic responses of farm animals to high temperature. *EAAP Publication*, 55, 15-22.
- Wei, Z., Cao, Y., Cong, L., Zhou, P., Zhang, Z., & Li, J. (2008). Effect of metformin pretreatment on pregnancy outcome of in vitro matured oocytes retrieved from women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 90(4), 1149-1154. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.07.1385>
- Wilson, S. J., Marion, R. S., Spain, J. N., Spiers, D. E., Keisler, D. H., & Lucy, M. C. (1998). Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 81(8), 2124-2131.
- Wise, M. E., Armstrong, D. V., Huber, J. T., Hunter, R., & Wiersma, F. (1988). Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal

stress. *Journal of Dairy Science*, 71(9), 2480-2485.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79834-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79834-3)

Wolfenson, D., Lew, B. J., Thatcher, W. W., Graber, Y., & Meidan, R. (1997). Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Animal Reproduction Science*, 47(1-2), 9-19.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(96\)01638-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01638-7)

Wolfenson, D., Roth, Z., & Meidan, R. (2000). Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 535-547. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00102-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00102-0)

Wolfenson, D., Thatcher, W. W., Badinga, L., Savio, J. D., Meidan, R., Lew, B. J., ... Berman, A. (1995). Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biology of Reproduction*, 52(5), 1106-1113.

Wolfenson, D., & Roth, Z. (2019). Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Animal Frontiers*, 9(1), 32-38. <https://doi.org/10.1093/af/vfy027>

World Meteorological Organization. (2019). *World Meteorological Day*. Recuperado de <https://worldmetday.wmo.int/en/secretary-generals-message>

Yousef, M. K., (1987). Principles of Bioclimatology. En M.K. Yousef (Ed.), *Bioclimatology and Adaptation of Livestock* (pp. 17-29). Amsterdam: Elsevier.

Yuan, Y., Hao, Z. D., Liu, J., Wu, Y., Yang, L., Liu, G. S., ... Zeng, S. M. (2008). Heat shock at the germinal vesicle breakdown stage induces apoptosis in surrounding cumulus cells and reduces maturation rates of porcine oocytes in vitro. *Theriogenology*, 70(2), 168-178.

Zeron, Y., Ocheretny, A., Kedar, O., Borochoy, A., Sklan, D., & Arav, A. (2001). Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction (Cambridge)*, 121(3), 447-454.

Zheng, H. Y., Yang, C. Y., Yu, N. Q., Huang, J. X., Zheng, W., Abdelnour, S. A., & Shang, J. H. (2020). Effect of season on the in-vitro maturation and developmental competence of buffalo oocytes after somatic cell nuclear transfer. *Environmental Science and Pollution Research*

International, 27(7), 7729-7735. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07470-3>