



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON  $\alpha$ -TOCOFEROL SOBRE LA  
CAPACIDAD DE DESARROLLO DE COMPLEJOS CUMULUS-OVOCITOS  
BOVINOS COLECTADOS DURANTE EL VERANO**

**Por**

**GOMEZ MAZZEI, Belén**

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

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2023**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por:



Presidente:

---

Dra. Andrea Fernández

Segundo miembro (Tutor):



---

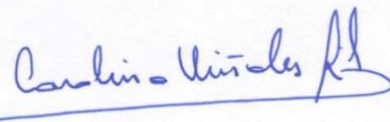
Dr. Francisco Báez Contreras

Tercer miembro:



---

Dra. Isabel Vázquez



Cuarto miembro (co-Tutor):

---

Dra. Carolina Viñoles Gil

Fecha de aprobación: 27/03/2023

Autor:



---

Br. Belén Gomez Mazzei

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero quiero agradecerles a mis padres, que a pesar de los tropezones del camino siempre me dieron la mano para levantarme y seguir adelante, me enseñaron a tener perseverancia. Y también a mi hermano, que me tuvo que aguantar varios años en la capital (y yo a él).

A mi tutor Dr. Francisco Baez, que cada vez que lo necesite estuvo y me guió en cada paso de este trabajo. También quiero agradecerle a mi co-tutora Dra. Carolina Viñoles por su ayuda y apoyo.

A mi novio que siempre estuvo para empujarme y dispuesto a ayudarme cuando lo necesitaba.

Por último, pero no menos importantes, gracias Virginia y Emilio por recibirme en su casa y hacerme sentir parte de su familia.

## TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
RESUMEN	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
Producción nacional de ganado para carne	10
Influencia del ambiente en el animal	12
Respuesta fisiológica y reproductiva al estrés calórico	13
Efecto del estrés calórico en el ovocito	14
Moléculas termoprotectoras en ovocitos expuestos a altas temperaturas	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	17
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	29
PERSPECTIVAS FUTURAS	29
BIBLIOGRAFÍA	29

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Páginas

- Tabla 1.** Valores máximos, mínimos y promedios de temperatura (°C), humedad relativa (%) e Índice de Temperatura y Humedad (ITH) recuperados entre 21 de diciembre de 2020 y el 9 de marzo de 2021 que fueron reportados en la Región Norte de Uruguay. 23
- Tabla 2.** Tasa de progresión meiótica (proporción, con porcentaje en paréntesis) de ovocitos colectados durante el verano y madurados *in vitro* en presencia y ausencia de etanol al 0,05% (v/v). 24
- Tabla 3.** Tasas de formación de pronúcleos y progresión meiótica (proporción, con porcentaje en paréntesis) de ovocitos bovinos cultivados en ausencia (Control) o presencia de etanol al 0,05% (0.05% EtOH) o activados con etanol al 3 o 7% (3 y 7% EtOH) durante 7 minutos. 24
- Tabla 4.** Tasa de maduración (metafase II + cuerpo polar, inmaduros y degenerados) y fecundación (totales, normales, polispérmicos, asincrónicos y no fecundados) en ovocitos bovinos recolectados en verano y madurados *in vitro* en ausencia (control y etanol al 0,05%) o presencia de  $\alpha$ -tocoferol a 50 ( $\alpha$ -50), 100 ( $\alpha$ -100) y 200 ( $\alpha$ -200)  $\mu$ M. 26
- Figura 1.** Esquema del Diseño Experimental. Experimento 1: Evaluación de la activación partenogenética de ovocitos bovinos en presencia de etanol. COCs, complejos cumulus-ovocitos; MIV, maduración *in vitro*; EtOH, etanol; AP, activación partenogenética. TL-FIV, medio de fecundación *in vitro*; mSOFaaci, medio de cultivo *in vitro*. 19
- Figura 2.** Esquema del Diseño Experimental. Experimento 2: Efecto del  $\alpha$ -tocoferol durante la MIV sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos bovinos. COCs, complejos cumulus-ovocitos (del inglés cumulus-oocytes complexes); MIV, maduración *in vitro*; EtOH, etanol; AP, activación partenogenética; vitE, vitamina E; FIV, fecundación *in vitro*; CIV, cultivo *in vitro*. 20
- Figura 3.** Índices de Temperatura y Humedad (ITH) diarios calculados durante los días de colecta de los ovarios para el periodo de verano 2020-2021. Los ITH fueron calculados a partir de los datos del Banco Agroclimático del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) de las estaciones de Salto y Tacuarembó. 23
- Figura 4.** Efecto de la concentración de etanol (EtOH) al 0,05%, 3% y 7% comparado con un grupo control (sin EtOH) en la activación partenogenética del ovocito bovino. Porcentaje (%) de divididos (día 3), desarrollo de blastocistos (día 7 y 9). Las letras (a, b) diferentes sobre cada barra representan una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ). 25
- Figura 5.** Efecto de la concentración de etanol en la activación partenogenética del ovocito bovino. Núcleos de blastómeras teñidos con Hoechst en embriones 25

partenogénicos derivados de (a) ovocitos bovinos madurados sin (Control) o (b) con etanol al 0,05 % (0.05% EtOH) durante 24 horas o activado con etanol al (c) 3 o (d) 7% (3 y 7% EtOH) durante 7 minutos. La barra blanca representa la marca de 50  $\mu\text{m}$ .

**Figura 6.** Efecto de diferentes concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol durante el ovocito bovino maduración *in vitro* en las tasas de división, blastocisto y eclosión. Control: 0% etanol y 0,0  $\alpha$ -tocoferol; Etanol: 0,05% de etanol y 0,0  $\alpha$ -tocoferol;  $\alpha$ -50: 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -tocoferol;  $\alpha$ -100:  $\alpha$ -tocoferol 100  $\mu\text{M}$ ;  $\alpha$ -200:  $\alpha$ -tocoferol 200  $\mu\text{M}$ . Las letras (a, b) diferentes sobre cada barra representan una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ). 26

**Figura 7.** Efecto de diferentes concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol durante la maduración *in vitro* en el ovocito bovino (A) número total de blastómeras, y (B) índice de apoptosis de blastocistos. Letras diferentes encima de cada barra indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ). 27

**Figura 8.** Imágenes digitales representativas de la tinción de Hoechst y TUNEL de blastocistos del día 9 derivados de ovocitos bovinos recolectados durante el verano y madurados *in vitro* en ausencia (control y etanol al 0,05%) o presencia de  $\alpha$ -tocoferol a 50 ( $\alpha$ -50), 100 ( $\alpha$ -100), 200 ( $\alpha$ -200)  $\mu\text{M}$  y controles de ensayo TUNEL positivos y negativos. La barra blanca representa la marca de 50  $\mu\text{m}$ . 27

## RESUMEN

El estrés calórico presenta gran relevancia en la actualidad y afecta de forma considerable la producción bovina. En nuestro país, la fertilidad del ganado se ve comprometida, principalmente porque el período de servicios de las vacas para carne ocurre en los meses más calurosos del año (diciembre-enero-febrero). La exposición de las vacas al estrés calórico durante el verano reduce la competencia ovocitaria para el desarrollo embrionario. El uso del  $\alpha$ -tocoferol durante la maduración *in vitro* (MIV) podría ser una alternativa para minimizar los efectos adversos del estrés calórico sobre la competencia de los ovocitos bovinos colectados durante el verano. Para utilizar el  $\alpha$ -tocoferol debe ser diluido en etanol puro, lo que puede inducir la activación partenogenética (AP) de los ovocitos. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el papel de la concentración de etanol sobre la AP y el efecto de la suplementación con  $\alpha$ -tocoferol durante la MIV sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos colectados durante el verano. Los ovarios fueron obtenidos de un frigorífico ubicado en Tacuarembó (Región Norte del Uruguay) y toda la producción de embriones se llevó a cabo al 5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> a 38,5°C. En el experimento 1: los ovocitos se cultivaron con o sin etanol al 0,05%. Como control positivo de AP se sometieron ovocitos maduros a etanol al 3% o al 7% durante 7 minutos. Los ovocitos de todos los grupos se colocaron en medio de fecundación (22 horas) y en medio de cultivo (9 días). En el experimento 2: los ovocitos se cultivaron en medio de maduración suplementado con 0, 50, 100 y 200  $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol, diluido en etanol al 0,05%. Después de la fecundación *in vitro* y el cultivo de presuntos cigotos, se evaluó el desarrollo embrionario y se evaluó el índice de apoptosis de los blastocistos. Los datos que no presentaron una distribución normal se analizaron mediante la prueba de rangos de Wilcoxon, y con distribución normal fueron analizadas con el análisis de varianza y la comparación de medias aplicando la prueba de Tukey. En el primer experimento, se encontró que el grupo control y etanol al 0,05% (v/v) presentaron un retraso en la formación de pronúcleos y tasas de blastocistos significativamente más bajas ( $P < 0,05$ ) que los grupos tratados con 3 y 7% de etanol. En el segundo experimento, la suplementación con 100  $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol redujo el índice de apoptosis ( $P < 0,05$ ) al compararlo con el resto de los grupos. En conclusión, el etanol a 0.05% (v/v) no induce la activación partenogenética de los ovocitos bovinos. Un tratamiento con etanol >3% (v/v) durante 7 minutos es un procedimiento eficaz para la activación partenogenética. La adición de  $\alpha$ -tocoferol a una concentración de 100  $\mu$ M (diluido en etanol al 0,05 %) durante la MIV, mejora la competencia de los ovocitos, lo que conduce a un aumento en la producción de blastocistos y una mayor calidad del embrión, sin el riesgo de inducir la activación partenogenética.

## SUMMARY

The impact of heat stress on bovine production is currently of high relevance. In our country, cattle fertility is compromised, mainly because the service period of beef cows occurs in the hottest months of the year (December-January-February). Exposure of cows to heat stress during the summer reduces oocyte competence for embryonic development. The use of  $\alpha$ -tocopherol during *in vitro* maturation (IVM) could be an alternative to minimize the adverse effects of heat stress on the competence of bovine oocytes collected during the summer. To use  $\alpha$ -tocopherol it must be diluted in pure ethanol, which can induce parthenogenetic activation (PA) of oocytes. This work aimed to evaluate the role of ethanol concentration on PA and the effect of  $\alpha$ -tocopherol supplementation during IVM on the developmental capacity of bovine oocytes collected during summer. Ovaries were obtained from a slaughterhouse located in Tacuarembó (Northern Region of Uruguay) and all embryo production was carried out at 5% O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub> at 38.5°C. Experiment 1: oocytes were cultured with or without 0.05% ethanol. As positive PA control matured oocytes were subjected to 3% or 7% ethanol for 7 min. Oocytes from all groups were placed in fertilization medium (22 hours) and culture medium (9 days). Experiment 2: oocytes were cultured in maturation medium supplemented with 0, 50, 100 and 200 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol, diluted in 0.05% ethanol. After *in vitro* fertilization and embryo culture, we assessed blastocyst apoptotic. Data without normal distribution were analyzed using the Wilcoxon rank test, and with normal distribution were analyzed with analysis of variance and comparison of means using Tukey's test. In experiment 1, it was found that the control group and 0.05% (v/v) ethanol showed a delay in pronucleus formation and blastocyst rates significantly lower ( $P<0.05$ ) than the groups treated with 3 and 7% ethanol. Ethanol at 0.05% during IVM did not induce oocyte PA, however, 3% and 7% ethanol were effective parthenogenetic inducers. In experiment 2, the supplementation with 100 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol reduced apoptotic index ( $P<0.05$ ). In conclusion, 0.05% (v/v) ethanol does not induce parthenogenetic activation of bovine oocytes. In contrast, a single >3% (v/v) ethanol treatment for 7 min is an effective procedure for parthenogenetic activation. The addition of 100 $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol diluted in 0.05% ethanol during IVM improves oocyte competence leading to an increase in blastocyst production and higher embryo quality, without the risk of inducing parthenogenetic activation.



## INTRODUCCIÓN

La economía en Uruguay tiene como base la actividad agropecuaria, siendo la carne bovina uno de los principales productos producidos y exportados (Gomez, 2019). Actualmente, el país cuenta con una existencia de 11.8 millones de vacunos (Instituto Nacional de Carne, 2021). La carne bovina producida para el mercado interno y externo proviene de sistemas de producción de base pastoril (Uruguay XXI, 2022). Bajo estas condiciones, los animales se encuentran sometidos continuamente a la radiación solar, cambios de temperatura, humedad del aire y velocidad del viento, que inciden en la producción de calor asociada a las funciones de mantenimiento y producción (Arias & Mader, 2011; Gonzalez-Rivas et al., 2020; Huertas et al., 2020; Naranjo-Gómez et al., 2021)

A nivel nacional, se ha descrito la existencia de “olas de calor” durante los meses de diciembre y enero, particularmente en los departamentos situados al norte del país (Rovira, 2012; Saravia & Cruz, 2003). A pesar de la relevancia del porcentaje de preñez en la cadena cárnica nacional, en Uruguay es incipiente el estudio del impacto del estrés calórico en la fertilidad del rodeo de cría. Esto es particularmente relevante, considerando que el período de servicios de las vacas para carne ocurre en los meses más calurosos del año (diciembre-enero-febrero). 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 & Hansen, 2002; Ferreira et al., 2011; Rocha et al., 1998; Torres-Júnior et al., 2008). Complejos cumulus-ovocitos (COCs) colectados durante los meses calurosos presentaron mayor número de alteraciones cromosómicas (Maya-Soriano, Lopez-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; Gendelman, Arroyo, Yavin & Roth, 2010) y menor calidad embrionaria (Ferreira et al., 2011). Resultados recientemente publicados por nuestro equipo de trabajo demuestran que los ovocitos colectados durante el verano presentaron mayor proporción de fragmentación en el ADN de las células del cumulus, y menor proporción de blastocistos (Báez, Lopez Darriulat, Rodriguez-Osorio & Viñoles, 2022). Estos hallazgos sugieren que existe un efecto deletéreo estacional sobre el desarrollo de competencia del ovocito, con un retraso en la división embrionaria y variación en la expresión de genes (Gendelman et al., 2010).

Dada las limitantes del modelo *in vivo* para estudiar los mecanismos moleculares y celulares que alteran la competencia de gametos y embriones, se propone el cultivo *in vitro* como un modelo relevante y confiable para evaluar el efecto del estrés calórico y las condiciones de cultivo en ovocitos (Gendelman et al., 2010), espermatozoides (Llamas Luceño et al., 2020) y embriones pre-implantacionales (Gendelman et al., 2010; Paula-Lopes, Al-Katanani, Majewski, McDowell & Hansen 2003). Uno de los mecanismos por los cuales el estrés por calor parece inducir daño al ovocito y al embrión en desarrollo es un aumento en la producción de especies oxígeno reactivas (ROS, del inglés reactive oxygen species) (Yaacobi-Artzi, Shimoni, Kalo, Hansen & Roth, 2020). Aunque las ROS pueden regular la función celular y activar vías de señalización clave (Morado, Cetica, Beconi & Dalvit, 2009), en exceso también están implicadas en muchos tipos de lesiones celulares, como peroxidación lipídica de la membrana, oxidación de ácidos nucleicos, apoptosis y necrosis (Kitagawa, Suzuki, Yoneda & Watanabe, 2004; Rakha et al., 2022). Uno de los

enfoques para combatir el efecto del estrés por calor en la competencia de desarrollo de los ovocitos bovinos es agregar moléculas termoprotectoras o antioxidantes durante la maduración *in vitro* (MIV).

El uso de antioxidantes ha permitido atenuar los efectos ocasionados por el estrés calórico, tanto *in vivo* como *in vitro* (Roth, 2008). Recientemente, Moura y Paula-Lopes (2020), afirman que tanto la calidad ovocitaria como la supervivencia embrionaria pueden ser atenuadas por la administración de antioxidantes, al tiempo que Hansen (2011) propone que pueden desarrollarse tratamientos farmacológicos que reducen los efectos de la hipertermia experimentada por las vacas expuestas al estrés calórico. La vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol es un fuerte agente reductor que puede donar electrones a los lípidos sometidos a peroxidación, además de ser un importante antioxidante presente en las membranas plasmáticas (Wang & Quinn, 2000). La administración de  $\alpha$ -tocoferol reduce la incidencia de trastornos reproductivos posparto tales como membranas fetales retenidas, metritis y ovarios quísticos (Abedelahi, Salehnia, Allameh & Davoodi, 2010). La suplementación del medio de MIV con 100 y 10  $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol redujo la tasa de apoptosis en células del cumulus de conejas (Arias-Álvarez et al., 2018) y cerdas (Tao et al., 2004), respectivamente, y mejoró la capacidad de desarrollo de los ovocitos hasta el estadio de blastocistos. Estudios previos informaron que la incorporación de esta vitamina a una concentración de 100-200  $\mu$ M al medio de cultivo *in vitro* aumentó en la producción de blastocistos en ovejas (Natarajan, Shankar & Munuswamy, 2010), cerdos (Kitagawa et al., 2004) y bovinos (Olson & Seidel, 2000b). Hasta el momento se ha probado el efecto de la incorporación de 100  $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol sobre el cultivo de embriones (Paula-Lopes et al., 2003) pero no se ha reportado la incorporación de  $\alpha$ -tocoferol durante la MIV de ovocitos bovinos proveniente de hembras expuestas a estrés calórico.

Debido a su naturaleza hidrófoba, el  $\alpha$ -tocoferol es diluido en etanol absoluto, para obtener una concentración de trabajo de 20-400 micromoles de  $\alpha$ -tocoferol en etanol al 0.05% (v/v) en el medio de cultivo. Sin embargo, es importante destacar que el etanol es un potente activador partenogenético en ovocitos (Guo et al., 2010), por lo que se hace necesario comprobar primero su actividad partenogenética a concentraciones diluidas (0,05%) durante la MIV. El uso del  $\alpha$ -tocoferol durante la MIV podría ser una alternativa para revertir los efectos negativos del estrés calórico sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos bovinos y mejorar la calidad de los embriones obtenidos. Este trabajo se puede consultar en la siguiente publicación: Effect of ethanol on partenogenetic activation and  $\alpha$ -tocopherol supplementation during *in vitro* maturation on developmental competence of summer-collected bovine oocytes (Báez, Gómez, de Brun, Rodríguez-Osorio, Viñoles; Curr. Issues Mol. Biol. 2021, 43, 2253–2265. <https://doi.org/10.3390/cimb43030158>).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. Producción nacional de ganado para carne:

Uruguay es un país de base agropecuaria y la cadena cárnica es un sector clave de su economía (Aguirre, 2018; Gomez, 2019). Según el Anuario Estadístico Agropecuario 2022 del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, la actividad ganadera ocupa unos 13,02 millones de hectáreas, 75% de la superficie del país, ubicando a Uruguay como uno de los países del mundo con más cabezas vacunas

por habitante (3,25 cabezas/habitante). La encuesta más reciente reporta que hay 11,8 millones de bovinos en todo el territorio. La estructura del stock bovino presenta estabilidad en los últimos años, con una alta proporción de vacas de cría (36%) llegando a los 4,3 millones de cabezas, lo que demuestra cierto crecimiento (5%) al compararla con la de 10 años atrás (Instituto Nacional de Carne, 2021). Con relación a las razas, 88,7% correspondió a razas carniceras, mientras que el 11,3% a razas lecheras (Instituto Nacional de Carne, 2021). La principal raza carnicera es la Hereford, siendo el 49% del rodeo nacional (considerando rodeos puros y sus cruza), sigue la raza Aberdeen Angus, con 30% (considerando rodeos puros y cruza) (MGAP-OPYPA, 2018). El resto está representado por las razas Braford y Brangus, formadas por la crusa entre la raza Brahman y las razas británicas (Hereford y A. Angus), y que se utilizan para obtener mayores niveles de producción, ya que presentan características favorables de las dos razas como rusticidad, vigor híbrido generado, adaptación al ambiente, entre otras (Llaneza & Perez, 2008).

Uruguay es un gran consumidor de proteína cárnica, con un perfil concentrado en la carne bovina (Tiscornia, Montossi, Manna, Paruelo & Rovira, 2022). En el año 2021, el consumo total estimado de carne alcanzó los 91,2 kg/hab./año, observándose un crecimiento de 3,9 kg con respecto al año anterior (Instituto Nacional de Carne, 2021). Sin embargo, con un mercado interno reducido, de tan solo 3,5 millones de personas, la creciente producción del sector agroindustrial del país se destina a la exportación. En este sentido, las exportaciones totales de alimentos de nuestro país cubren las necesidades alimenticias de 28 millones de personas en el resto del mundo (Uruguay XXI, 2020). El principal producto de exportación dentro de la agroindustria en 2021 fue la carne bovina (21%), seguido por celulosa (14%), soja (8%) y productos lácteos (6%) (Instituto Nacional de Carne, 2021). La ganadería representó el 35% del total de las exportaciones del país contando la venta de carne, productos lácteos y ganado en pie, con un margen de ganancia de 2.300 millones de dólares (MGAP, 2021). En el primer semestre del 2021 las ventas de carne bovina al exterior recaudaron 1.001 millones de dólares, superando en un 13% a cifras prepandemia (Uruguay XXI, 2021), por lo que genera un gran ingreso al país. A nivel internacional, Uruguay se ubica en el octavo lugar de exportadores en toneladas de carne vacuna, siendo China uno de sus principales destinos (MGAP-OPYPA, 2021).

Como se mencionó anteriormente, la ganadería bovina es una de las actividades más importantes de Uruguay, su sistema productivo es sustentable, en donde la mayoría del ganado es criado en sistemas pastoriles. Esto hace que la carne uruguaya sea natural, segura, altamente nutritiva, extra magra y de un sabor distintivo (Saadoun & Cabrera, 2013; Uruguay XXI, 2020). Si bien, las condiciones de dicha producción posicionan favorablemente al país en varios aspectos, especialmente en lo que tiene que ver con la expresión de los comportamientos naturales, existen algunas amenazas reales como la exposición a situaciones climáticas adversas, la carencia de abrigo y de sombra (Rovira, 2012). A pesar de las consecuencias negativas de la variabilidad climática sobre el bienestar animal y su potencial de producción, la mayoría de las investigaciones se centran en la intensificación de la ganadería, mientras que el estudio del impacto del cambio climático sobre el ganado sigue siendo un tema desafiante y menos estudiado (Carvajal et al., 2021). Además, existe un concepto equivocado de que los sistemas pastoriles no presentan inconvenientes desde el punto de vista del bienestar animal (Rovira, 2012). Aunque nuestras condiciones de producción son positivas en varios aspectos, no se puede dejar de lado la gran importancia del confort térmico para el bienestar de los animales

(Huertas et al., 2020). A la luz de los efectos del cambio climático y el aumento de la temperatura global, que hacen que los bovinos criados en sistemas pastoriles en países de climas templados estén cada vez más expuestos al estrés calórico, parece emergente implementar estrategias para minimizar, revertir o prevenir los efectos del estrés calórico en los animales de producción.

## 2. Influencia del ambiente sobre el animal

La productividad de los animales es afectada directa e indirectamente por el medio ambiente y los factores climáticos (Arias, Mader & Escobar, 2008; Saravia & Cruz, 2003). La temperatura ambiente, la humedad del aire, la radiación solar, la velocidad del viento, la presión y la precipitación tienen un efecto importante sobre los animales (Saravia & Cruz, 2003). Este conjunto de factores afecta el balance térmico de los animales influyendo en su producción y, por lo tanto, en su bienestar (Arias et al., 2008). El bienestar animal es definido como el funcionamiento normal y satisfactorio de los sistemas biológicos (homeostasis) y está determinado por la ausencia de situaciones de estrés prolongadas o severas y por la capacidad de los animales de adaptarse al ambiente en el que se encuentran (Rovira, 2012). La OMS (Organización Mundial de la Salud) en 1965 planteó unas directrices llamadas “cinco libertades” en lo que refiere al bienestar animal cuando estos están bajo el control del hombre: (1) libre de hambre, de sed y de desnutrición, (2) libre de temor y de angustia, (3) libre de molestias físicas y térmicas, (4) libre de dolor, de lesión y de enfermedad y (5) libre de manifestar un comportamiento natural. Un buen nivel de bienestar para el animal requiere prevenir las enfermedades, brindar cuidados veterinarios apropiados, refugio, manejo y nutrición adecuados, un entorno estimulante y seguro, una manipulación correcta y el sacrificio o faena de manera humanitaria (Huertas et al., 2020).

En cuanto a las agresiones que afectan el balance térmico, podemos notar que la exposición a situaciones climáticas adversas, la frecuente carencia de abrigo y sombras, y el mal manejo en general son factores que influyen en el confort de los bovinos (Rovira, 2012). El confort térmico es de gran importancia para el bienestar del ganado (Huertas et al., 2020) y en los sistemas extensivos, como lo son a nivel nacional, las agresiones nombradas anteriormente se encuentran presentes (Rovira, 2012). Existen situaciones en las que las respuestas fisiológicas para regular la temperatura corporal pueden verse comprometidas, sobre todo cuando el animal está expuesto al calor, ambiente húmedo y no puede adoptar mecanismos comportamentales para minimizar la exposición al calor, resultando en estrés calórico (Morrell, 2020). El estrés calórico puede ser un problema serio para el ganado, disminuyendo el rendimiento, la productividad, y generando grandes pérdidas económicas (Roth, 2021). Los cambios climáticos, el calentamiento global, y el estrés calórico se han convertido en un problema de carácter mundial, incluso en las regiones más frías durante el verano (Llamas Luceño et al., 2020; Morrell, 2020).

Para poder estimar el estrés calórico al cual los animales son expuestos fue desarrollado y adaptado el Índice de Temperatura y Humedad (ITH) por Thom en 1959. Este índice relaciona la temperatura (T) y la humedad relativa (HR) con la respuesta fisiológica y es el más utilizado para evaluar las condiciones climáticas y el efecto del estrés calórico en la ganadería de todo el mundo (Hansen, 2007; Llamas Luceño et al., 2020; J. Wang et al., 2020). El valor de ITH obtenido en la fórmula se considera como la intensidad de las condiciones de estrés calórico a la que se

encuentra expuesto el animal. Esta intensidad se categoriza en bovinos para carne como alerta (leve) para valores de ITH  $\geq 75$ , peligro (moderado) para valores de ITH  $\geq 79$  o emergencia (severo) cuando se alcanzan valores de ITH  $\geq 84$  (Armendano, 2016). Un ITH entre 70 y 74 en ganado para carne es una señal para los productores de que existe el potencial de estrés por calor en el ganado (McGlone, 2010).

En Uruguay, se ha descrito la existencia de ITH superiores a 72 para el mes de enero al Norte del Río Negro y su impacto negativo sobre la cantidad y calidad de leche y variables comportamentales en vacas lecheras (Celmira et al., 2011; García et al., 2018; Ribas et al., 2018). El impacto negativo del estrés calórico en la eficiencia reproductiva en vacas para carne en sistemas pastoriles se encuentra subestimado, a pesar de que el período de servicio de las vacas para carne ocurre en los meses más calurosos del año (diciembre-enero-febrero). Resultados recientes de nuestro equipo de trabajo describen que durante el entore ocurren condiciones de estrés calórico, y que en veranos muy calurosos se ve afectado el momento de la concepción en vacas para carne (Fedrigo, Baez, Santa Cruz & Viñoles 2021). Vacas de las razas Hereford, A. Angus y sus cruza, 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 et al., 2021). Por lo tanto, existen claros indicios de que el rodeo de cría en condiciones pastoriles sufre estrés calórico, y que la sombra de los árboles podría ser un método de atenuación efectivo (Martins et al., 2020). Esto es particularmente relevante, considerando 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).

## 2.1 Respuesta fisiológica y reproductiva al estrés calórico

A nivel fisiológico, los bovinos son animales capaces de mantener su temperatura constante alrededor de 38°C en reposo, a pesar de las fluctuaciones en la temperatura ambiental. Pero cuando la temperatura del cuerpo está por encima de la temperatura ambiente, hay intercambio de calor del cuerpo hacia el medio ambiente. Sin embargo, cuando la temperatura ambiental alcanza o supera la temperatura corporal, estas rutas se pierden y se activan rutas fisiológicas alternativas como la sudoración y el jadeo (Kadzere, Murphy, Silanikove & Maltz, 2002; Roth, 2021). Estas condiciones ambientales conducen a la hipertermia, también conocida como estrés calórico, comprometiendo las características fisiológicas y reproductivas de los animales (de Rensis, Saleri, Garcia-Ispierto, Scaramussi & Lopez-Gatius, 2021).

La principal consecuencia del estrés calórico en el ganado es la reducción de la ingesta de alimento, que es un mecanismo natural, protector y adaptativo utilizado por los animales bajo temperaturas ambiente altas para poder contrarrestar el aumento de la producción de calor metabólico (Gonzalez-Rivas et al., 2020; Lees et al., 2019). Los requerimientos de agua de los animales estresados por calor aumentan hasta el doble en comparación con condiciones termoneutrales (Gonzalez-Rivas et al., 2020), ya que el agua es fundamental para que la termorregulación contrarreste la evaporación (Arias & Mader, 2011; Gonzalez-Rivas et al., 2020). Estas evidencias de cambios fisiológicos son consecuencia del aumento de la frecuencia respiratoria y del consumo de oxígeno, una vasodilatación masiva de la piel, y aumento de la frecuencia cardíaca (Roth, 2020).

Altas temperaturas ambientales acompañadas de elevada humedad relativa pueden reducir la eficiencia reproductiva tanto en hembras como en machos, afectando la gametogénesis, la libido, el estro, la ovulación, la fertilidad, la implantación, la supervivencia embrionaria, la duración de la gestación y la habilidad materna, así como el aumento de los problemas en el momento del parto (Castaño, Rugeles, Bentancur & Ramirez-Lopez, 2014). La reducción de la fertilidad asociada al estrés calórico es un problema multifactorial ya que la hipertermia puede afectar la función celular en varios tejidos del aparato reproductor femenino (Abdoon et al., 2014; Torres-Júnior et al., 2008). El estrés calórico puede interrumpir directamente la dinámica folicular (Bandinga, Thatcher, Diaz, Drost & Wolfenson, 1993; Wolfenson, Lew, Thatcher, Graber & Meidan, 1997), el desarrollo de folículos pre-antrales (Aguar, Hyde, Pedroza & Denicol, 2020; Paes et al., 2016), antrales (dominantes y pre-ovulatorios) (Roth, 2017), la capacidad esteroidogénica, la secreción hormonal (Roth et al., 2001; Wolfenson et al., 1997; Wolfenson, Roth & Meidan, 2000), e incluso puede alterar la composición del fluido folicular (Rispoli et al., 2019).

En condiciones de estrés calórico moderado y crónico la cantidad de proteínas totales en el fluido folicular se ve reducida, al igual que la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (Moura & Paula-Lopes, 2020). La reducción de la actividad de esta enzima en el fluido folicular puede resultar en el aumento de peróxido de hidrógeno y la acumulación de especies oxígeno reactivas (ROS) con daño directo al ovocito (Rodrigues & Paula-Lopes, 2018). El fluido folicular es un componente esencial del microambiente ovocitario necesario para su crecimiento, maduración y donde adquiere parte de su capacidad de desarrollo. Alteraciones en este ambiente pueden estar involucradas en la pérdida de la calidad de los ovocitos (Hailay et al., 2019; Pasquariello et al., 2020; Rispoli et al., 2019) y en la reducción de la tasa de fertilidad (Rispoli et al., 2019).

## 2.2 Efecto del estrés calórico sobre el ovocito

A pesar de los múltiples efectos negativos del estrés calórico sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, que afectan incluso el ambiente uterino (De Rensis et al., 2021; Roth, 2020; Wolfenson et al., 2000), existen suficientes evidencias tanto *in vivo* como *in vitro* que muestran que el ovocito es la estructura más sensible a los efectos deletéreos causados por el estrés calórico materno (Gendelman & Roth, 2012; Rocha et al., 1998; Roth et al., 2001; Ticianelli et al., 2017; Torres-Júnior et al., 2008). Varios estudios estacionales demuestran que la exposición de las vacas a estrés calórico durante el verano reduce la competencia ovocitaria para el desarrollo embrionario (Al-Katanani et al., 2002; Ferreira et al., 2011; Rocha et al., 1998; Torres-Júnior et al., 2008). Varios estudios estacionales, llevados a cabo en distintas latitudes, demuestran que la exposición de las vacas a estrés calórico durante el verano reduce la competencia ovocitaria para el desarrollo embrionario (Al-Katanani et al., 2002; Ferreira et al., 2011; Gendelman et al., 2010; Rocha et al., 1998; Torres-Júnior et al., 2008). En el estudio estacional conducido por nuestro equipo de trabajo, los ovocitos bovinos colectados durante el verano presentaron un menor nivel de compactación de la cromatina y las células del cúmulus tenían niveles más altos de fragmentación de ADN en comparación con los ovocitos colectados en el invierno. En consecuencia, la baja capacidad de desarrollo de los ovocitos durante el verano podría deberse a un retraso en la transición de compactación nuclear de los ovocitos y menor calidad de las

células de cúmulus, considerando la relevancia de la comunicación entre el cúmulus y el ovocito durante esta etapa de desarrollo (Báez et al., 2022).

Ovocitos colectados durante los meses calurosos presentaron mayor número de alteraciones cromosómicas (Maya-Soriano et al., 2013), menores tasas de maduración y disminución de la actividad mitocondrial (Abdoon et al., 2014; Payton & Rispoli, 2018; Roth, 2021), y consecuentemente, menores tasas de desarrollo hasta el estadio de blastocistos (Al-Katanani et al., 2002; Ferreira et al., 2011; Gendelman et al., 2010; Silva, Rosa & Knight, 2006) y embriones de menor calidad (Ferreira et al., 2011). Estos hallazgos sugieren que existe un efecto deletéreo estacional 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; Roth, 2021).

En un estudio *in vitro*, demostramos que los ovocitos expuestos a choque térmico (41,5°C) durante la maduración *in vitro* (MIV) es tiempo dependiente, lo que incrementa el porcentaje de ovocitos con organizaciones cromosómicas anormales, y reduce la tasa de fecundación y producción total de blastocistos. La Microscopía Electrónica de Barrido revela que una exposición de 22-hs de choque térmico afecta la ultraestructura de la zona pelúcida con mayor número de poros y apariencia amorfa, lo que podría comprometer la fertilidad de las vacas estresadas por calor y aumentar las pérdidas embrionarias tempranas (Báez, Camargo, Reyes, Márquez, Paula-Lopes, Viñoles, 2019).

Otro estudio reciente determinó que en ovocitos bovinos expuestos a 41,5°C por un período de 22 horas durante la MIV, aumentó el nivel de ROS intracelular (Yaacobi-Artzi et al., 2020). La exposición de los ovocitos a ROS, incluyendo el peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y aniones superóxido, pueden dañar el ADN, los fosfolípidos de las membranas y las proteínas (Roelen, 2019), y aumentar el índice de apoptosis (Yuan et al., 2008). Se debe tomar en cuenta que la MIV se realiza generalmente a altas tensiones de oxígeno (~20%). Altas tensiones de oxígeno durante el cultivo *in vitro* también están asociada al aumento de los niveles de ROS (Pereira, Machado, Costa, Serapiao, Viana & Camargo, 2010), por lo que la tensión alta de oxígeno representa un desafío para la adquisición de la capacidad de desarrollo de ovocitos y embriones (Roelen, 2019).

Cuando la producción de ROS, potencialmente destructivas, excede la defensa antioxidante natural del cuerpo se genera el estrés oxidativo (Mutwedu, Nyongesa, Oduma, Kitaa & Mbaria, 2020). Por lo tanto, los ovocitos bovinos madurados en condiciones de calor muestran tasas más bajas de maduración nuclear, fragmentación de la cromatina y reacción prematura de los gránulos corticales provocando el envejecimiento prematuro de los ovocitos (Maya-Soriano et al., 2013).

### 2.3 Moléculas termoprotectoras en ovocitos expuestos a altas temperaturas

El uso de antioxidantes ha permitido atenuar los efectos ocasionados por el estrés calórico, tanto *in vivo* como *in vitro* (Paula-Lopes et al., 2003). Recientemente, Moura y Paula-Lopes (2020), reportaron que tanto la calidad ovocitaria como la supervivencia embrionaria pueden ser atenuadas por la administración de antioxidantes. Las moléculas antioxidantes *in vivo* son los principales factores de defensa de la célula frente al estrés oxidativo inducido por ROS (Maya-Soriano, 2012). El sistema reproductivo femenino es naturalmente rico en antioxidantes como la catalasa, el glutatión, entre otros, y es considerablemente diferente al medio sintético

utilizado para el cultivo y maduración *in vitro* de ovocitos y embriones (Rakha et al., 2022; Sovernigo et al., 2017). Para poder disminuir la generación de ROS durante la producción *in vitro* de embriones bovinos y poder neutralizar el efecto negativo sobre la calidad del ovocito y el embrión, se han probado diferentes moléculas antioxidantes para complementar los medios de cultivo (Torres et al., 2019). Entre las estudiadas se encuentran la melatonina (Yaacobi-Artzi et al., 2020), el retinol (Lawrence et al., 2004), las antocianinas (Sakatani et al., 2007), el dithiothreitol (de Castro e Paula & Hansen, 2008), el ácido ascórbico (Torres et al., 2019) y flavonoides (Cajas et al., 2020).

La vitamina A (retinol), E ( $\alpha$ -tocoferol) y C (ácido ascórbico) han sido ampliamente reportadas como antioxidantes que protegen a las células ante procesos degenerativos que son causados por el estrés oxidativo (revisado por (Maya-Soriano, 2012). El  $\alpha$ -tocoferol, es una de las sustancias no enzimáticas más estudiadas, tanto *in vivo* como *in vitro* (Natarajan, Shankar & Munuswamy, 2010; Torres et al., 2019). Es una vitamina liposoluble que protege los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y evita la peroxidación lipídica, manteniendo la función de las membranas celulares de los mamíferos (Arias-Álvarez et al., 2018; Tao et al., 2004). Por tanto, el  $\alpha$ -tocoferol protege contra el daño celular inducido por el estrés oxidativo (Tao et al., 2004). En el ovario, el  $\alpha$ -tocoferol es el antioxidante más importante que brinda defensa celular contra las ROS (Arias-Álvarez et al., 2018). En el fluido folicular de búfalas se ha encontrado la presencia de  $\alpha$ -tocoferol de hasta 2  $\mu$ M (Cassano, Tosto, Balestrieri, Zicarelli & Abrescia, 1999).

Varios estudios han demostrado que la adición de 100  $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol al medio de MIV redujo el índice de apoptosis de los complejos cumulus-ovocitos de conejas (Arias-Álvarez et al., 2018). Yashiro et al., (2015), encontraron que la adición de 300  $\mu$ M de esta vitamina podría revertir satisfactoriamente el efecto de la congelación de ovocitos bovinos, observando con una mayor proporción de blastocistos después de la congelación/descongelación y fecundación de los ovocitos. Recientemente, (Tripathi, Nandi, Gupta & Mondal, 2023), publicaron que una concentración de 100 y 200  $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol, durante la MIV de ovocitos ovinos, disminuyó el estrés oxidativo, y aumentó la proporción y calidad de blastocistos. Esta molécula a una concentración de 200  $\mu$ M previene el daño oxidativo embriones ovinos, y mejora su desarrollo y proporción de blastocistos (Natarajan et al., 2010). Olson & Seidel, (2000a) observaron que la suplementación de 100  $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol durante el cultivo *in vitro* de embriones bovinos incrementó el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocistos.

Una de las características del  $\alpha$ -tocoferol es que es una molécula hidrófoba, y que debe ser diluida en etanol puro antes de ser empleada. Sin embargo, el etanol es un conocido activador partenogenético en concentraciones superiores al 3% (Minamihashi, Watson & Watson, 1993) y es ampliamente utilizado en protocolos para producir embriones partenogenéticos (Suvá, Canel & Salamone, 2019). Se ha descubierto que el etanol al 1% y 20 % de oxígeno es ineficiente para promover la activación partenogenética en ovocitos bovinos (Minamihashi et al., 1993). Un estudio reciente informó que al agregar 0,3% de etanol al medio MIV aumentó la tasa de blastocistos, independientemente de las condiciones de cultivo (Novaes et al., 2021).

En otros estudios han probado el etanol como vehículo para la dilución de diferentes moléculas durante el cultivo de ovocitos (Yaacobi-Artzi et al., 2020), pero pocos estudios sistemáticos han investigado el papel del etanol en bajas concentraciones en la activación partenogenética y el desarrollo embrionario. Por



tanto, es necesario evaluar si, bajo tensión fisiológica de oxígeno, el etanol al 0,05% (v/v) puede inducir la activación partenogenética en ovocitos inmaduros, en comparación con una alta concentración de etanol durante unos minutos como control positivo, para promover la activación partenogenética en el desarrollo de ovocitos. Aunque se ha investigado el efecto beneficioso del  $\alpha$ -tocoferol en los ovocitos de mamíferos, hasta la fecha no existen estudios sobre el efecto de la suplementación con  $\alpha$ -tocoferol (y 0,05 % de etanol) durante la MIV y su influencia en la competencia de los ovocitos bovinos recolectados durante el verano.

## **HIPÓTESIS:**

El etanol a 0,05% utilizado como diluyente del  $\alpha$ -tocoferol no promueve el aumento de la activación partenogenética en ovocitos bovinos. El  $\alpha$ -tocoferol puede revertir el efecto negativo del estrés calórico sobre el ovocito visualizado durante la maduración y su posterior desarrollo embrionario *in vitro*. El  $\alpha$ -tocoferol puede ejercer un efecto termoprotector al aumentar las tasas de desarrollo y calidad de los blastocistos bovinos producidos *in vitro*.

## **OBJETIVOS:**

### **General:**

- Evaluar el efecto de la suplementación del  $\alpha$ -tocoferol durante la maduración *in vitro* de complejos cúmulus-ovocitos (COCs) de vacas de cría colectados durante el verano.

### **Específicos:**

- Valorar la activación partenogenética de COCs en presencia de etanol.
- Determinar el efecto de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol sobre la capacidad de desarrollo *in vitro* de los ovocitos hasta el estadio de blastocisto.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### Obtención de los ovarios

En este estudio, los experimentos fueron realizados utilizando ovocitos provenientes de ovarios de vacas de razas para producción de carne (Hereford, A. Angus y sus cruza). Los ovarios fueron obtenidos de un frigorífico del Departamento de Tacuarembó, Uruguay (entre el 21 de diciembre de 2020 y el 9 de marzo de 2021). Las temperaturas máximas, mínimas y la humedad relativa fueron obtenidas de dos estaciones meteorológicas del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-Uruguay), Banco Agroclimático ubicado en dos departamentos del Norte del país: Salto (31°16'22" S, 57°53' 27" O) y Tacuarembó (31°42'32" S, 55°49'36" O). El índice de temperatura humedad (ITH) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$ITH = (0,8 + T + (RH (\%) / 100) (T - 14,4) + 46,4).$$

Donde T es la temperatura del aire en grados Celsius y RH es la humedad relativa del aire (Thom, 1959).

Se transportaron grupos de 35-45 ovarios al laboratorio en un recipiente térmico con NaCl al 0,9 % (p/v) a 37°C dentro de los 45 minutos posteriores a la colecta. Se obtuvieron complejos cumulus-ovocitos (COCs) provenientes de la aspiración de

folículos de 2 a 8 mm de diámetro con jeringa de 10 mL y aguja 18G. Para cada repetición, se seleccionaron alrededor de 150 COCs con citoplasma homogéneo y con varias capas compactas de células del cúmulus (Hawk & Wall, 1994). El protocolo para la producción *in vitro* de embriones es similar al reportado por (Speckhart, Wooldridge & Ealy (2023) con ligeras modificaciones. Todas las fases de la producción *in vitro* de embriones se llevaron a cabo a baja tensión de oxígeno (5% O<sub>2</sub>), una concentración más cercana al contenido de oxígeno en el folículo y el tracto reproductivo femenino (Harvey, 2007).

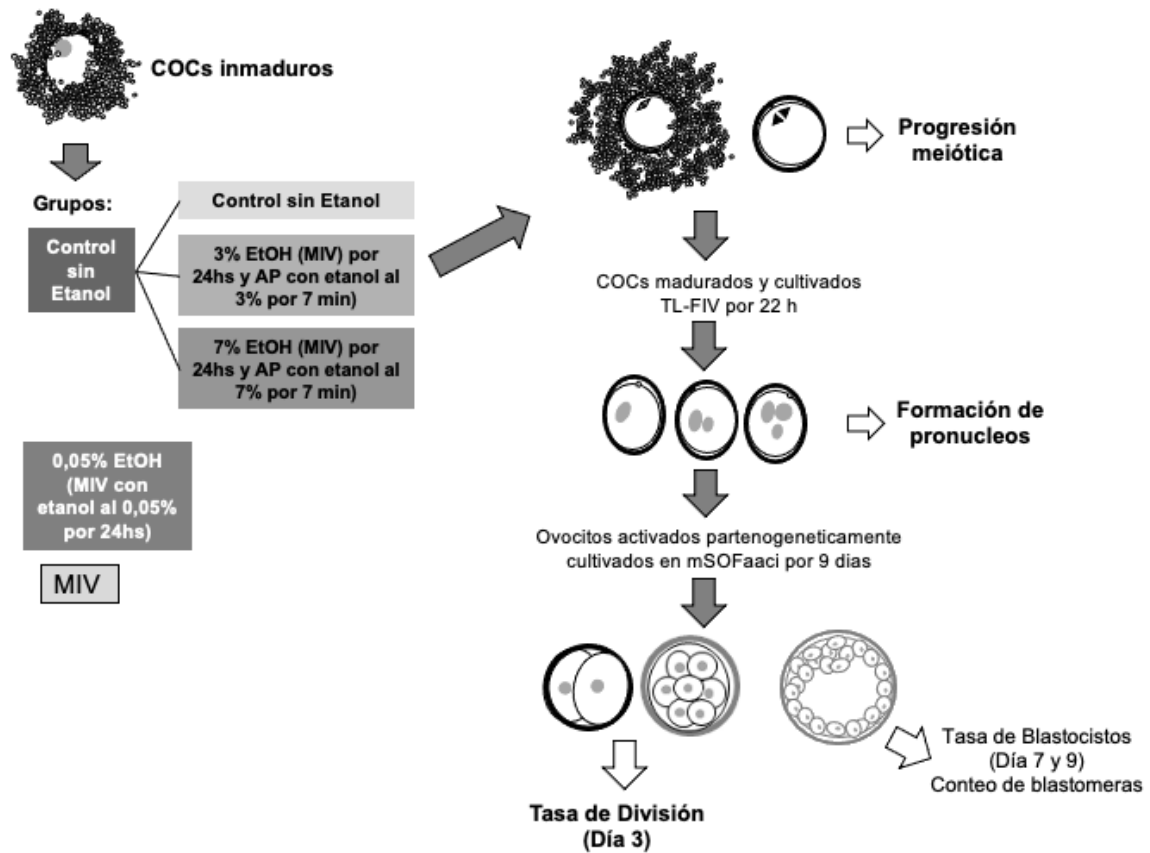
## Diseño experimental

La representación esquemática del diseño de los dos experimentos que se realizaron en este estudio se resume en la Figura 1 y 2.

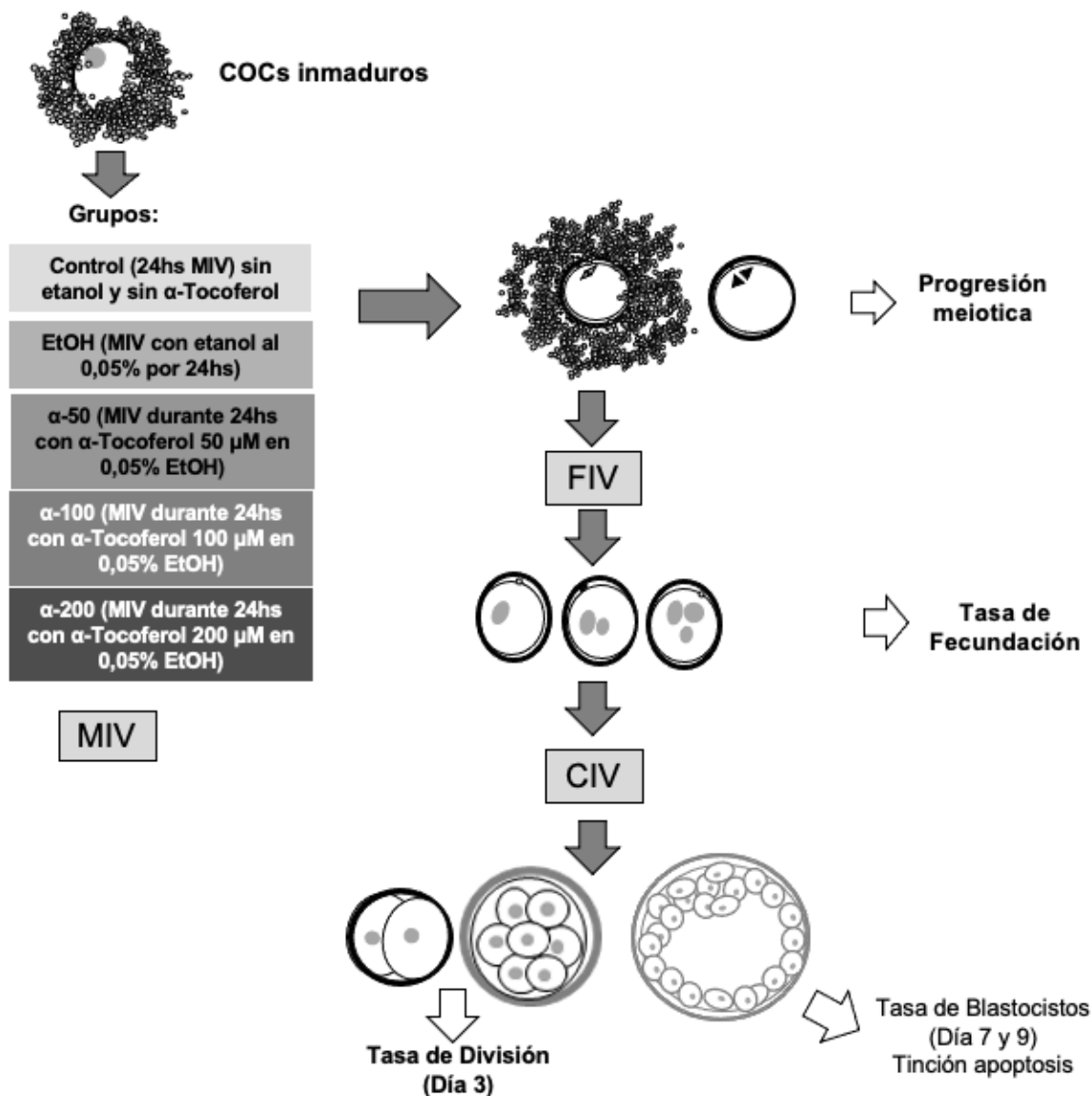
Experimento 1: Evaluación de la activación partenogenética de ovocitos bovinos en presencia de etanol. Se utilizaron un total de 826 COCs en seis repeticiones independientes. Los COCs seleccionados se maduraron *in vitro* en ausencia ( $n=584$ ) y presencia de etanol al 0,05% (v/v) ( $n = 242$ ) durante 24 horas. Después de la maduración *in vitro* (MIV), 50–51 COCs por grupo fueron denudados aleatoriamente de las células del cúmulus, fijados y procesados para la tinción de ADN con Hoechst 33342 para determinar la progresión meiótica. Se incorporó un grupo control como testigo y no tratado con agentes activadores de la partenogénesis. Los COCs madurados en ausencia de alcohol se distribuyeron en el grupo Control ( $n=180$ ) y dos grupos que se activaron con 3% ( $n=176$ ) y 7% ( $n=178$ ) de etanol (v/v) en solución de medios de Holding a 38°C durante 7 minutos. Todos los grupos se lavaron dos veces en medios Holding y se cultivaron durante 22 horas en el medio de fecundación *in vitro* (TL-FIV) en ausencia de espermatozoides. Después de este periodo, se fijaron y tiñeron un total de 48-53 ovocitos por grupo para determinar la formación de los pronúcleos. Los ovocitos restantes (125-138 por grupo) se cultivaron *in vitro* durante 9 días. Las tasas de escisión y de blastocistos se determinaron en los días 3, 7 y 9 de cultivo, respectivamente. Al final del cultivo, los embriones con un blastocele visible se consideraron blastocistos. Los blastocistos partenogenéticos de todos los grupos (2–9 por tratamiento) se fijaron y tiñeron con Hoechst 33342 y se contaron el número total de blastómeras (Figura 1).

Experimento 2: Efecto del  $\alpha$ -tocoferol durante la MIV sobre la capacidad de desarrollo de los COCs bovinos. Como se muestra en la Figura 2, se utilizaron un total de 1.818 COCs en ocho repeticiones independientes, divididos en cinco tratamientos, y colocados en medio de maduración suplementado con diferentes concentraciones (Control (grupo testigo, sin etanol y sin  $\alpha$ -tocoferol); 0,05 % de etanol; 50; 100 y 200  $\mu$ M) de  $\alpha$ -tocoferol (v/v) por 24 horas a 38,5°C y 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub>. Después de este período, un grupo de ovocitos ( $n = 59–73$  por tratamiento) fueron denudados de células del cúmulus y teñidos para evaluar la progresión meiótica. Luego, se fecundaron 1,482 COCs *in vitro*. De esos, 353 presuntos cigotos ( $n = 66–73$  por tratamiento) fueron denudados, fijados y teñidos para determinar la tasa de fecundación. Los presuntos cigotos restantes ( $n = 208–244$  por tratamiento) se cultivaron *in vitro* y se evaluó el desarrollo embrionario el día 3 (% de divididos) y el día 9 (% de blastocistos tempranos, expandidos y eclosionados). Finalmente, se usaron blastocistos expandidos (11–14 por tratamiento) para evaluar el número total

de células y el índice apoptótico mediante la tinción de TUNEL (etiquetado de extremo de muesca dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal).



**Figura 1.** Esquema del Diseño Experimental. Experimento 1: Evaluación de la activación partenogenética de ovocitos bovinos en presencia de etanol. COCs, complejos cumulus-ovocitos; MIV, maduración *in vitro*; EtOH, etanol; AP, activación partenogenética. TL-FIV, medio de fecundación *in vitro*; mSOFaaci, medio de cultivo *in vitro*.



**Figura 2.** Esquema del Diseño Experimental. Experimento 2: Efecto del  $\alpha$ -tocoferol durante la MIV sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos bovinos. COCs, complejos cumulus-ovocitos (del inglés cumulus-oocytes complexes); MIV, maduración *in vitro*; EtOH, etanol; AP, activación partenogénica; vitE, vitamina E; FIV, fecundación *in vitro*; CIV, cultivo *in vitro*.

Maduración *in vitro* (MIV): se maduraron grupos de 45–50 COCs *in vitro* en 500  $\mu$ L de medio de maduración cubierto con aceite mineral durante 24 horas a 38,5°C y 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub> con máxima humedad. El medio para MIV consistió en: TCM 199 (Gibco Invitrogen, 1115005) suplementado con 1  $\mu$ g/mL de Folltropin-V® (Bioniche) v/v), 5 UI/mL de gonadotropina coriónica equina (Biogón®) (v/v), 10 % de suero bovino fetal (Gibco Invitrogen) (v/v), 5  $\mu$ g/mL de gentamicina (v/v) y 0,2 mM de piruvato de sodio (p/v) (Báez et al., 2019). Para los grupos de tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol, el medio IVM se suplementó con diferentes concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol (Sigma, 258024) (50, 100 y 200  $\mu$ M). Primero se diluyó en etanol absoluto para obtener la solución stock de concentración 0,1; 0,2 y 0,4 M, se almacenó en la

oscuridad a 4°C y se diluyó en medios de maduración hasta una concentración final de 50; 100 y 200 µM de α- tocoferol, respectivamente, en etanol al 0,05% (v/v), y preparado 4 horas antes del cultivo.

Activación partenogenética: después de MIV durante 24 horas, los COCs se lavaron tres veces en medio Holding (114 mM de cloruro de sodio, 3,2 mM de cloruro de potasio, 0,34 mM de bifosfato de sodio, 0,5 mM de cloruro de magnesio, 2,0 mM de cloruro de calcio, 2 mM de bicarbonato de sodio, 10 mM de lactato de sodio, 0,2 mM de piruvato de sodio, 4 mg/mL de BSA fracción V y 50 µg/mL de gentamicina) y luego se incubaron en etanol al 3 y 7 % (v/v) en medio Holding a 38 °C durante 7 minutos. Después de la activación, los ovocitos se lavaron tres veces con el mismo medio y se transfirieron a 500 µL de medio de fecundación *in vitro* (TL-FIV) en ausencia de espermatozoides. El grupo control se cultivó en TL-FIV en las mismas condiciones de cultivo, pero en ausencia de etanol.

Evaluación de la progresión meiótica: los COCs de MIV se desnudaron de las células del cúmulus mediante pipeteo en buffer fosfato salino (PBS) suplementada con 200µg/mL de hialuronidasa durante 5 minutos. Los ovocitos desnudos se fijaron en paraformaldehído al 2,5 % (p/v) en PBS durante 25 minutos y se tiñeron con 1 µg/mL de Hoechst 33342 durante 5 minutos. Estos ovocitos se colocaron en un portaobjetos y se observaron inmediatamente con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 50i equipado con un filtro de excitación UV a 330-385 nm y un filtro de emisión a 420 nm. Los ovocitos se clasificaron como maduros (ovocitos en metafase II + cuerpo polar), inmaduros (vesícula germinal, metafase I, anafase I, telofase I) y degenerados (cromatina difusa o degradada) (Tseng, Chen, Chou, Yeh & Ju, 2004).

Fecundación *in vitro* (FIV): los COCs maduros se lavaron dos veces en el medio de fecundación *in vitro* (TL-FIV) que contiene 10 µg/mL de heparina (v/v), 10 µM de hipotaurina (v/v) y se colocaron en placas de cultivo de 4 pocillos. Los espermatozoides se seleccionaron con gradiente de densidad BoviPure (Nidacon International AB, Suecia) mediante centrifugación a 300 xg durante 10 minutos. La FIV se realizó incubando los COCs con  $1 \times 10^6$  de espermatozoides/mL en 500 µL de medio TL-FIV durante 22 horas a 38,5 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> con máxima humedad.

Evaluación de la formación de pronúcleos: después de 22 horas en TL- FIV, los COCs se despojaron de las células del cúmulus, se fijaron, tiñeron con Hoechst 33342 y evaluaron como en las secciones anteriores. En el experimento 1, los ovocitos se clasificaron según el estadio: uno o dos pronúcleos (PN), telofase II, metafase II o degenerados; mientras que en el experimento 2, los presuntos cigotos con dos PN se consideraron como de fecundación normal; los que tenían tres PN como poliespérmicos; los que tenían un PN, como asincrónicos y los que no tenían PN como no fecundados. Se consideró tasa de fecundación total cuando el ovocito presentaba uno, dos o más PN (Magata, Urakawa, Matsuda & Oono, 2021).

Cultivo *in vitro*: a las 22 horas de co-cultivo, los COCs y los presuntos cigotos se desnudaron por completo de las células del cúmulus mediante pipeteo en medio Holding y se lavaron dos veces en el medio de cultivo de fluido oviductal sintético modificado (mSOF) (Holm, Booth, Schmidt, Greve & Callesen, 1999), suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales, citrato, mio-inositol, 5 g/L (p/v) de BSA

y 0,5 % de FCS (v/v). Los presuntos cigotos se colocaron en grupos de 20 a 25 en mSOF y se cubrieron con aceite mineral a 38,5 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> con humedad máxima durante 9 días. El medio de cultivo se reemplazó por medio fresco (50% de reemplazo) a las 72, 120 y 168 horas de cultivo. Las tasas de división, blastocistos tempranos, expandidos y eclosionados se determinaron los días 3, 7 y 9 de cultivo, respectivamente.

Recuento de células en blastocistos partenogénéticos: los blastocistos del día 9 se fijaron y tiñeron con 1 µg/mL de Hoechst 33342 a 38,5 °C durante 10 minutos, se lavaron dos veces en PBS y se montaron en portaobjetos. Se observaron bajo un microscopio de fluorescencia y se contó el número total de núcleos por cada blastocisto. Los blastocistos teñidos se fotografiaron y las imágenes se evaluaron utilizando el software ImageJ.

Evaluación del número total de células y fragmentación del ADN: la tinción de TUNEL se realizó como fue descrito por Rodrigues y col. (2016). Los blastocistos eclosionados y expandidos se fijaron con paraformaldehído al 2,5 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron en PBS y se permeabilizaron en Triton X-100 al 0,5 % (v/v) en PBS durante 40 minutos a 4°C y se lavaron dos veces en PBS. Las muestras se incubaron en la mezcla de reacción TUNEL (dUTP conjugado con isotiocianato de fluoresceína y desoxinucleotidil transferasa terminal) a 37 °C durante 1 hora. Los blastocistos teñidos con TUNEL se lavaron con PBS y se incubaron en PBS que contenía 10 µg/mL de Hoechst 33342 durante 10 minutos. Los blastocistos se lavaron y montaron en un portaobjetos de vidrio. Los controles negativos se prepararon mediante la omisión de la desoxinucleotidil transferasa terminal en la mezcla de reacción, al mismo tiempo que los controles positivos se prepararon mediante pretratamiento con 1 mg/mL de ADNasa I (Roche Diagnostics, Suiza) en 5 µL buffer Tris-HCl, 1 µL de ADNasa, y 30 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ durante 45 minutos a 37°C. Todas las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 50i con filtros para FITC (emisión 520 y excitación 460–490 nm) y Hoechst (emisión 420 y excitación 330–385 nm). Los blastómeros positivos para TUNEL se marcaron con fluorescencia verde, lo que indica apoptosis. La fluorescencia azul (Hoechst) indicó la presencia de núcleos. Los blastómeros se contaron y analizaron utilizando el software de código abierto Fiji/ImageJ. El índice apoptótico se determinó dividiendo el número total de blastómeros positivos para TUNEL por el número total de blastómeros.

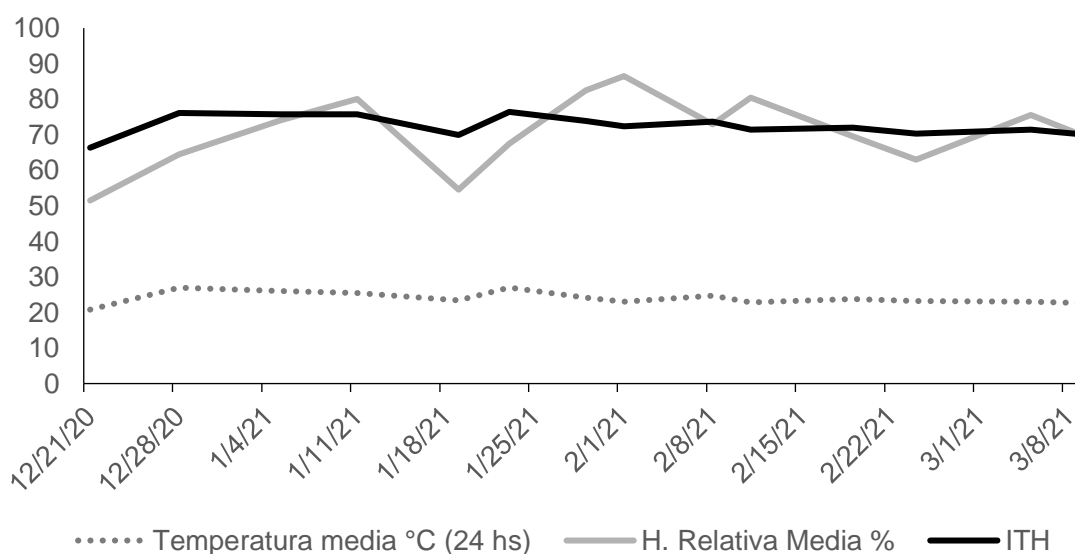
Análisis estadístico: la normalidad y homogeneidad de la varianza se examinaron con la prueba de Kolmogórov-Smirnov y Levene, respectivamente. Se realizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para los datos que no presentaron una distribución normal. Los datos fueron analizados mediante el ANOVA, usando el modelo lineal general (GLM) y prueba de medias mediante el tests de Tukey, utilizando el software SAS (Versión 8.0, SAS Inst. Inc; Cary, NC, EE. UU.). La fuente de variación en el modelo incluyó el periodo de exposición de etanol y las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol, considerados como efectos fijos. Donde:  $Y$  (variable respuesta asociada a las repeticiones y a los tratamientos) =  $\mu$  (media general del experimento) + efecto de los tratamientos + efecto residual (asociado a las repeticiones y a los tratamientos). Las diferencias entre medias se consideraron significativas para un  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los datos ambientales recuperados durante el período de estudio. En la Figura 3 se observan los índices de temperatura y humedad (ITH), alcanzando un promedio de  $73 \pm 3$ . Este ITH fue calculado para los días de colecta del ovarios y puesta a maduración de los COCs, y seleccionados para los dos experimentos propuestos en este estudio. En general, el promedio de ITH reportado en el verano fue de alrededor de 72, lo que indica un nivel de alerta por estrés calórico para las vacas (du Preez et al., 1990).

**Tabla 1.** Valores máximos, mínimos y promedios ( $\pm$  DE) de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa (%) e índice de temperatura y humedad (ITH) recuperados entre 21 de diciembre de 2020 al 9 de marzo de 2021 reportado en el Norte de Uruguay.

	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Humedad relativa (%)	ITH
Máxima	25 - 29,8	87 - 94	75,78 - 83,94
Mínima	19,7- 21,8	44 - 71	64,81 - 67,88
Promedio	$23,31 \pm 1,22$	$70,38 \pm 5,05$	$71,31 \pm 1,5$



**Figura 3.** Índices de Temperatura y Humedad (ITH) diarios calculados durante los días de colecta de los ovarios para el periodo de verano 2020-2021. Los ITH fueron calculados a partir de los datos del Banco Agroclimático del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) de las estaciones de Salto y Tacuarembó.

### Experimento 1

No se encontraron diferencias significativas en la proporción de ovocitos maduros, inmaduros y degenerados durante la MIV por 24 horas en presencia (0,05%) o ausencia de etanol, respectivamente (Tabla 2). Después de 22 horas de cultivo en ausencia de espermatozoides, los ovocitos de los grupos control y etanol al 0,05% mostraron un claro retraso en la formación de pronúcleos (Tabla 3). La tasa de división y la tasa de blastocistos partenogenéticos también fueron significativamente más bajas en ambos grupos (Figura 4). En la Figura 5 se muestran imágenes digitales

representativas de blastocistos partenogénéticos teñidos con Hoechst 33324. El número total de células de blastocistos partenogénéticos no fue significativamente diferente ( $P = 0,086$ ) entre el grupo control; 0,05 %; 3 y 7 % de etanol ( $62 \pm 3,0$ ;  $63 \pm 2,67$ ;  $77,66 \pm 5,58$  y  $75,77 \pm 3,3$ , respectivamente).

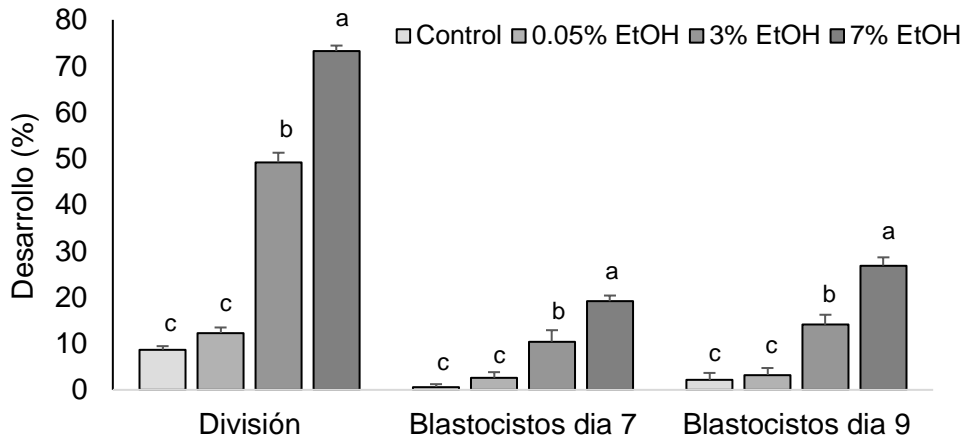
**Tabla 2.** Tasa de progresión meiótica (proporción, con porcentaje en paréntesis) de ovocitos colectados durante el verano y madurados *in vitro* en presencia y ausencia de etanol al 0,05% (v/v).

	Control (%)	0.05% EtOH (%)	<i>P</i> -valor
<b>Estadios nucleares</b>			
Maduros	36/50 (72)	37/51 (72,5)	0,77
Inmaduros	10/50 (20)	10/51 (19,6)	0,9
Degenerados	4/50 (8)	4/51 (7,8)	0,9

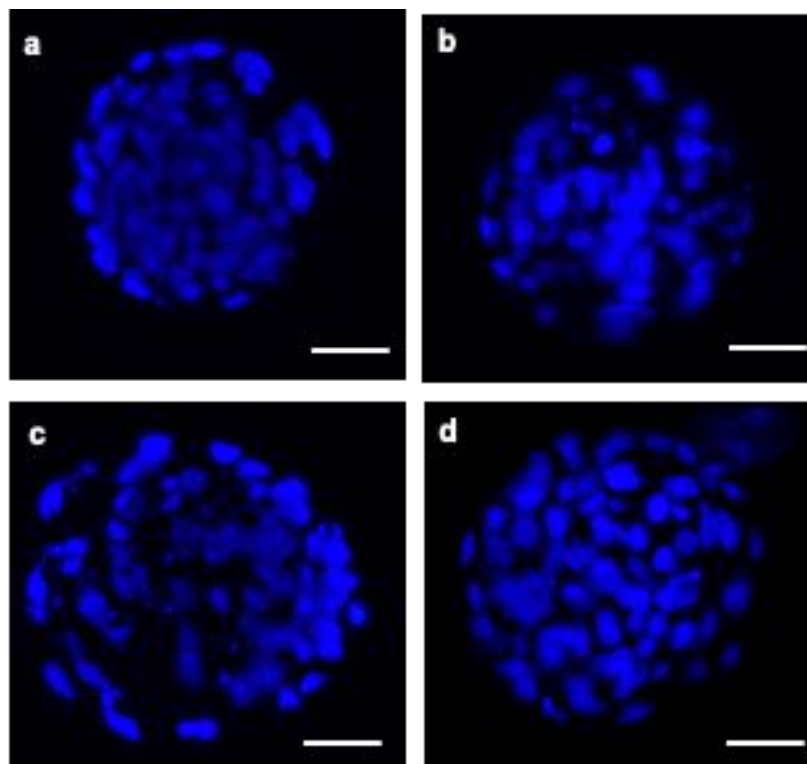
**Tabla 3.** Tasas de formación de pronúcleos y progresión meiótica (proporción, con porcentaje en paréntesis) de ovocitos bovinos cultivados en ausencia (Control) o presencia de etanol al 0,05% (0.05% EtOH) o activados con etanol al 3 o 7% (3 y 7% EtOH) durante 7 minutos.

	Control (%)	0.05% EtOH (%)	3% EtOH (%)	7% EtOH (%)	<i>P</i> -valor
<b>Estadios nucleares</b>					
2 Pronúcleos	0/54 (0)	0/53 (0)	1/50 (2)	3/53 (5,6)	0,098
1 Pronúcleo	4/54 (7,4) <sup>b</sup>	4/53 (7,5) <sup>b</sup>	9/50 (18) <sup>a</sup>	13/53 (24,5) <sup>a</sup>	0,006
Telofase II	2/54 (3,7)	2/53 (3,8)	5/50 (10)	2/53 (3,7)	0,62
Metafase II + cuerpo polar	35/54 (64,8)	30/53 (56,6)	25/50 (50)	26/53 (49,1)	0,062
Inmaduro	6/54 (11,1)	7/53 (13,2)	2/50 (4)	4/53 (7,5)	0,32
Degenerado	7/54 (12,9)	10/53 (18,8)	8/50 (16)	5/53 (9,4)	0,21





**Figura 4.** Efecto de la concentración de etanol (EtOH) al 0,05%, 3% y 7% comparado con un grupo control (sin EtOH) en la activación partenogenética del ovocito bovino. Porcentaje (%) de divididos (día 3), desarrollo de blastocistos (día 7 y 9). Las letras (a, b) diferentes sobre cada barra representan una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ).



**Figura 5.** Efecto de la concentración de etanol en la activación partenogenética del ovocito bovino. Núcleos de blastómeras teñidos con Hoechst en embriones partenogénicos derivados de (a) ovocitos bovinos madurados sin (Control) o (b) con etanol al 0,05 % (0.05% EtOH) durante 24 horas o activado con etanol al (c) 3 o (d) 7% (3 y 7% EtOH) durante 7 minutos. La barra blanca representa la marca de 50  $\mu\text{m}$ .

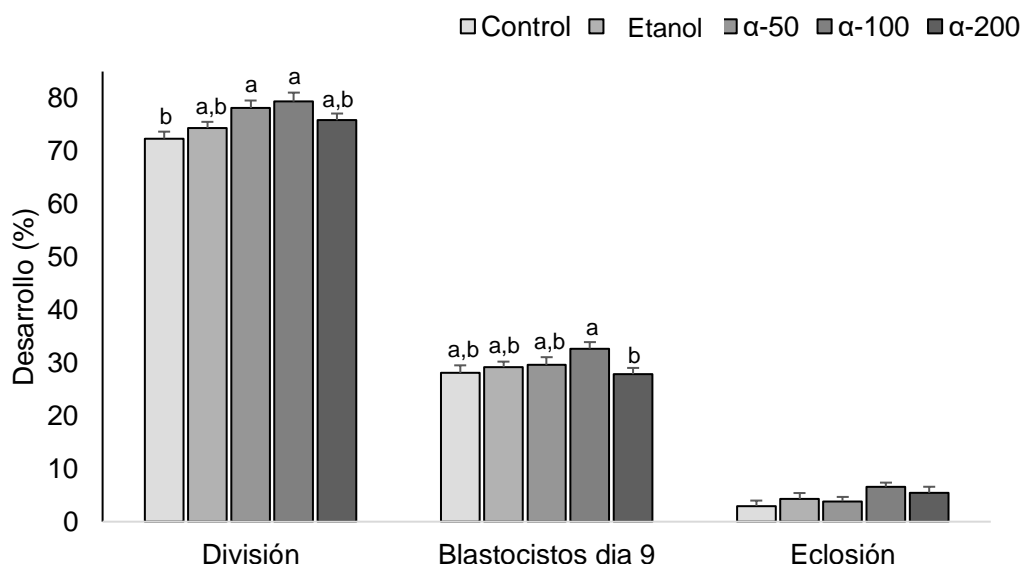
### Experimento 2

El porcentaje de ovocitos en metafase II y presuntos cigotos con fecundación normal fue similar en todos los tratamientos (Tabla 4). La proporción de divididos de

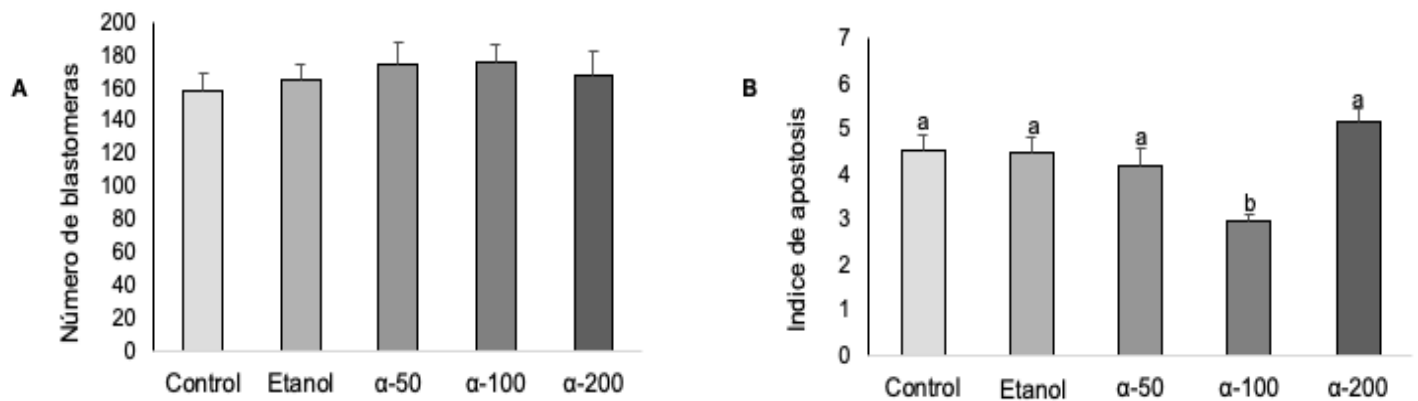
embriones derivados de COCs suplementados con  $\alpha$ -50 y  $\alpha$ -100 fue significativamente mayor que la del grupo de control ( $P < 0,05$ ). La mayor tasa de blastocistos en el día 9 se obtuvo en el grupo  $\alpha$ -100, pero solo difirió significativamente del grupo  $\alpha$ -200. Las tasas de blastocistos eclosionados fueron similares en todos los grupos (Figura 6). Aunque el número total de células de blastocisto no difirió entre tratamientos ( $P = 0,825$ ), la adición de 100  $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol durante MIV redujo la proporción de blastómeros positivos para TUNEL (Figura 8).

**Tabla 4.** Tasa de maduración (metafase II + cuerpo polar, inmaduros y degenerados) y fecundación (totales, normales, poliespéricos, asincrónicos y no fecundados) en ovocitos bovinos recolectados en verano y madurados *in vitro* en ausencia (control y etanol al 0,05%) o presencia de  $\alpha$ -tocoferol a 50 ( $\alpha$ -50), 100 ( $\alpha$ -100) y 200 ( $\alpha$ -200)  $\mu$ M.

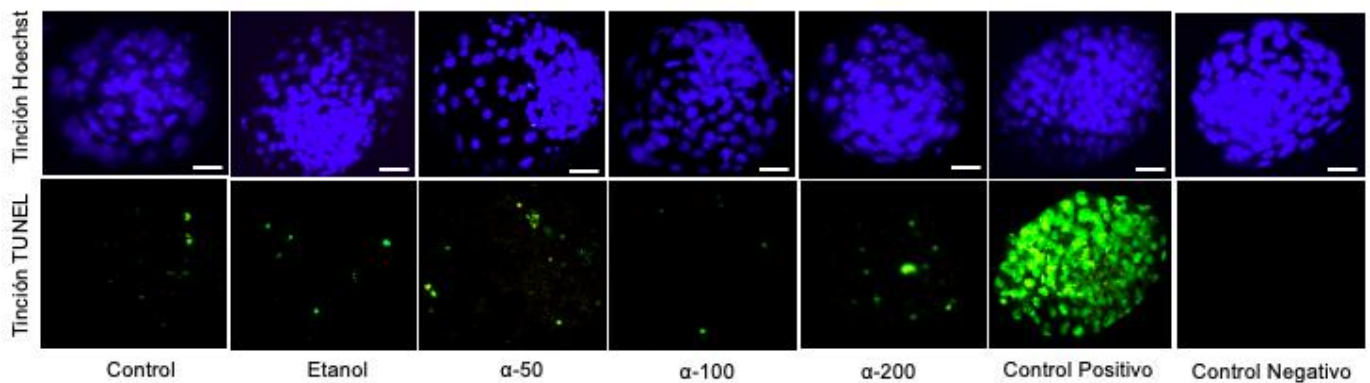
	Control (%)	Etanol (%)	$\alpha$ -50 (%)	$\alpha$ -100 (%)	$\alpha$ -200 (%)	P-valor
<b>Tasa de maduración</b>						
Metafase II + cuerpo polar	53/73 (72,6)	50/69 (72,4)	48/67 (71,6)	50/66 (75,7)	45/59 (76,2)	0,14
Inmaduros	13/73 (17,8)	14/69 (20,2)	14/67 (20,8)	11/66 (16,6)	11/59 (18,6)	0,63
Degenerados	7/73 (9,5)	5/69 (7,2)	5/67 (7,4)	5/66 (7,5)	3/59 (5)	0,27
<b>Tasa de fecundación</b>						
Total fecundados	56/71 (78,8)	55/73 (75,3)	54/70 (77,1)	43/66 (80,3)	54/73 (73,9)	0,25
Normal	43/71 (60,5)	42/73 (57,5)	41/70 (58,5)	43/66 (65,1)	43/73 (58,9)	0,25
Poliespermia	5/71 (7)	3/73 (4,1)	4/70 (5,27)	0/66 (0)	1/73 (1,3)	0,2
Asincrónico	8/71 (11,2)	10/73 (13,7)	9/70 (18,3)	10/66 (15,1)	10/73 (13,6)	0,5
No fecundados	15/71 (21,1)	18/73 (24,6)	16/70 (22,8)	13/66 (19,4)	19/73 (26)	0,26



**Figura 6.** Efecto de diferentes concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol durante el ovocito bovino maduración *in vitro* en las tasas de división, blastocisto y eclosión. Control: 0% etanol y 0,0  $\alpha$ -tocoferol; Etanol: 0,05% de etanol y 0,0  $\alpha$ -tocoferol;  $\alpha$ -50: 50  $\mu$ M  $\alpha$ -tocoferol;  $\alpha$ -100:  $\alpha$ -tocoferol 100  $\mu$ M;  $\alpha$ -200:  $\alpha$ -tocoferol 200  $\mu$ M. Las letras (a, b) diferentes sobre cada barra representan una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ).



**Figura 7.** Efecto de diferentes concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol durante la maduración *in vitro* en el ovocito bovino (**A**) número total de blastómeras, y (**B**) índice de apoptosis de blastocistos. Letras diferentes encima de cada barra indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 8.** Imágenes digitales representativas de la tinción de Hoechst y TUNEL de blastocistos del día 9 derivados de ovocitos bovinos recolectados durante el verano y madurados *in vitro* en ausencia (control y etanol al 0,05%) o presencia de  $\alpha$ -tocoferol a 50 ( $\alpha$ -50), 100 ( $\alpha$ -100), 200 ( $\alpha$ -200)  $\mu$ M y controles de ensayo TUNEL positivos y negativos. La barra blanca representa la marca de 50  $\mu$ m.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo confirman la hipótesis de que el etanol a 0,05%, utilizado como diluyente del  $\alpha$ -tocoferol, no promueve el aumento de la activación partenogenética en ovocitos bovinos. La adición de 100  $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol diluido en etanol a 0,05% durante la MIV mejora la competencia de los ovocitos bovinos, lo que representa un aumento en la proporción y calidad de los blastocistos.

En el primer experimento, se observa una baja tasa de división temprana y de producción de blastocistos en el grupo control y etanol al 0,05%, lo que indica que las condiciones de cultivo no promueven la activación partenogenética. La proporción de pronúcleos, la tasa de división temprana, blastocistos y número total de blastómeras

en ambos grupos, control y etanol 0,05%, fueron similares a la reportada por otros autores (Méo, Leal & Garcia (2004), Méo et al., (2007) y Zuo et al., (2020)). Tseng et al., (2004) sugiere que la activación espontánea de los grupos controles podrían indicar la baja calidad de los ovocitos o una maduración citoplasmática incompleta. Estudios previos en los que se utilizaron ovocitos obtenidos en verano, demostraron que tienen menor calidad que los ovocitos obtenidos en invierno (Al-Katanani et al., 2002; Báez et al., 2022; Rocha et al., 1998). La activación partenogenética puede verse influenciada también por periodos de cultivo prolongados (más de 26 horas para MIV y 44 horas para MIV-FIV combinados), en ovocitos que han sufrido maduración nuclear y luego envejecen en cultivo, siendo el tiempo un factor clave (Ayoub & Hunter, 1993; Minamihashi et al., 1993). Por otro lado, la exposición de los ovocitos MIV con etanol (3 y 7 % v/v) durante 7 minutos es efectiva para promover la activación partenogenética de los ovocitos bovinos.

Estudios recientes reportaron tasas de división y producción de blastocistos similares a los encontrados en este estudio después de la activación de los ovocitos con ionomicina a 5  $\mu$ M y 6-dimetilaminopurina a 2 mM (Santos et al., 2019; Zuo et al., 2020). Suvá et al., (2019) emplearon la combinación de 5  $\mu$ M de ionomicina, 7% de etanol (v/v) y 50  $\mu$ M de roscovitina, demostraron una mejora en la tasa de formación de pronúcleos en embriones partenogenéticos, pero los mayores rendimientos de blastocistos se observaron en el tratamiento con ionomicina y 6-dimetilaminopurina. El problema de estos protocolos es que son muy largos y difíciles de reproducir. Se debe considerar, que la activación artificial de los ovocitos bovinos es un paso crítico para el desarrollo de las biotecnologías reproductivas como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides o la transferencia nuclear de células somáticas (Suvá et al., 2019). Esta tecnología también es una técnica importante para establecer líneas de células de madre embrionarias y puede usarse en terapia génica, trasplante de órganos, reparación de tejidos, tratamiento de enfermedades y otros campos médicos (Han & Gao, 2013). Por tanto, la metodología propuesta en nuestro trabajo podría ser una alternativa exitosa en lo que se refiere a la activación de ovocitos bovinos y producción de blastocistos, y potencialmente podría aplicarse esta metodología en otras especies y como fuente de células embrionarias.

En el segundo experimento, la adición de  $\alpha$ -tocoferol diluido en etanol a 0,05% durante la MIV mejora la competencia de los ovocitos bovinos, lo que representa un aumento en la proporción de blastocistos y disminución del índice de apoptosis. En este estudio la tasa de ovocitos madurados, y normalmente fecundados no se vieron afectados por la adición de  $\alpha$ -tocoferol durante la MIV. Varios estudios muestran que la adición de esta vitamina durante la maduración no influye directamente en la progresión meiótica y la tasa de FIV en bovinos (Dalvit et al., 2005; Thiyagarajan & Valivittan, 2009), ovinos (Adeldust, Zeinoaldini, Kohram, Roubar & Joupari, 2015; Natarajan et al., 2010), suinos (Tao et al., 2004; Tareq, Akter, Yahia Khandoker, Tsujii, 2012) y conejos (Arias-Álvarez et al., 2018). El  $\alpha$ -tocoferol puede regular la función celular durante la maduración de los ovocitos y proteger contra los efectos nocivos de las ROS producidas durante la MIV (Arias-Álvarez et al., 2018).

En cuanto al desarrollo embrionario, el número de células de los blastocistos no se vio afectada por la adición de  $\alpha$ -tocoferol durante la MIV. Nuestros resultados coinciden con un estudio previo donde no encontraron mayor número total de blastómeras en los embriones ovinos después de la suplementación con  $\alpha$ -tocoferol durante el cultivo *in vitro* (Natarajan et al., 2010). En nuestro trabajo, el  $\alpha$ -tocoferol

mejoró la competencia intrínseca del ovocito, que puede evaluarse mediante la proporción total de blastocistos, número de blastómeras y el índice de apoptosis. En este estudio, se determinó la detección de apoptosis, que es un proceso implicado en la alteración de la competencia de los embriones (Hansen, 2009; Roth & Hansen, 2004) y tiene un papel crítico en los efectos causados por el estrés térmico sobre la maduración de los ovocitos bovinos y su desarrollo embrionario posterior (Hansen, 2009). En el trabajo de Natarajan et al. (2010) encontraron resultados similares al nuestro, con una reducción del grado de fragmentación del ADN en embriones ovinos cultivados en presencia de 200  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -tocoferol, protegiendo al embrión del daño oxidativo. Sin embargo, en nuestro estudio encontramos mejores resultados a concentraciones de 100  $\mu\text{M}$ , mostrando mayor proporción de blastocistos y menor índice de apoptosis. Las concentraciones pueden variar según el ovocito/embrión de cada especie estudiada. En ovocitos de coneja se vieron mejores resultados con concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  (Arias-Álvarez et al., 2018), en embriones ovinos en presencia de 200  $\mu\text{M}$  (Natarajan et al., 2010). En bovinos, una concentración de 300  $\mu\text{M}$  resultó mejor para la recuperación ovocitos vitrificados/calentados (Yashiro et al., 2015); mientras que, en el cultivo de embriones, las tasas de desarrollo fueron más altas y los blastocistos de mayor tamaño en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -tocoferol (Olson & Seidel, 2000a).

## CONCLUSIONES

El etanol al 0,05% (v/v) no induce la activación partenogenética de los ovocitos bovinos, por lo que, a esta concentración, el etanol puede utilizarse como un vehículo seguro para moléculas hidrofóbicas en sistemas de producción de embriones. Por el contrario, un único tratamiento con etanol >3% (v/v) durante 7 minutos es un procedimiento eficaz para la activación partenogenética.

La adición de  $\alpha$ -tocoferol a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , diluido en etanol al 0,05 %, durante la maduración *in vitro*, mejora la competencia de los ovocitos, lo que condujo a un aumento en la producción de blastocistos, y menor índice de apoptosis, sin el riesgo de inducir la activación partenogenética.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabajo pretende aportar un avance a la reproducción de los bovinos en épocas más cálidas, las cuales cada vez son más frecuentes. Aunque la efectividad del  $\alpha$ -tocoferol como agente para el desarrollo de embriones durante el cultivo *in vitro* ha sido bien establecida, su papel en la fisiología reproductiva *in vivo* todavía necesita ser estudiado mejor. Se propone implementar a futuro la utilización de animales de experimentación para estudiar el efecto *in vivo* del  $\alpha$ -tocoferol para corroborar si el efecto positivo encontrado en este trabajo se puede replicar en los animales bajo condiciones a campo.

## 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. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.008>
- Abedelahi, A., Salehnia, M., Allameh, A. A., & Davoodi, D. (2010). Sodium selenite improves the *in vitro* follicular development by reducing the reactive oxygen

- species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. *Human Reproduction*, 25(4), 977-985.  
<https://doi.org/10.1093/humrep/deq002>
- Adeldust, H., Zeinoaldini, S., Kohram, H., Roudbar, M. A., & Joupari, M. D. (2015). In vitro maturation of ovine oocyte in a modified granulosa cells co-culture system and alpha-tocopherol supplementation: Effects on nuclear maturation and cleavage. *Journal of Animal Science and Technology*, 57(1), 1-6.  
<https://doi.org/10.1186/s40781-015-0061-5>
- Aguirre, E. (2018). Evolucion reciente de la productividad ganadera en Uruguay (2010-2017). En *Anuario OPYPA*.
- Al-Katanani, Y. M., Paula-Lopes, 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. (2011). Environmental factors affecting daily water intake on cattle finished in feedlots. *Journal of Animal Science*, 89(1), 245-251.  
<https://doi.org/10.2527/jas.2010-3014>
- 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://doi.org/10.4067/s0301-732x2008000100002>
- Arias-Álvarez, M., Garcíá-García, R. M., López-Tello, J., Rebollar, P. G., Gutiérrez-Adán, A., & Lorenzo, P. L. (2018).  $\alpha$ -Tocopherol modifies the expression of genes related to oxidative stress and apoptosis during in vitro maturation and enhances the developmental competence of rabbit oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(12), 1728-1738. <https://doi.org/10.1071/RD17525>
- Armendano, J. I. (2016). ¿Cuándo se generan condiciones de estrés por calor en bovinos para carne? *Sitio Argentino de Producción Animal*, 84(6), 11-13.
- Ayoub, M. A., & Hunter, A. G. (1993). Parthenogenetic Activation of In Vitro Matured Bovine Oocytes. *Journal of Dairy Science*, 76(2), 421-429.  
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77362-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77362-2)
- 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.06.002>
- 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(September 2021), 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103171>
- 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, 149661. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149661>
- Celmira, S., Laura, A., Elize, V. L., Oscar, B., Saravia, C., & Astigarraga, L. (2011). Impacto de las olas de calor en vacas lecheras en Salto (Uruguay). *Agrociencia Uruguay*, 15(1), 93-102. <http://www.cabdirect.org/abstracts/20113240421.html>
- Dalvit, G., Llanes, S. P., Descalzo, A., Insani, M., Beconi, M., & Cetica, P. (2005). Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro

- maturation. *Reproduction in Domestic Animals*, 40(2), 93-97.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00522.x>
- De Rensis, F., Saleri, R., Garcia-Ispuerto, I., Scaramuzzi, R., & López-Gatiús, F. (2021). Effects of heat stress on follicular physiology in dairy cows. *Animals*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/ani11123406>
- del Campo, M., Rovira, P., do Carmo, M., Velazco, J., & Esquivel, J. (2012). *USO DE LA SOMBRA EN LA RECRÍA DE NOVILLOS EN SISTEMAS PASTORILES DE LA REGIÓN ESTE DEL URUGUAY* (P. Rovira, Ed.; Serie Técnica INIA, Vol. 202). <http://www.inia.org.uy>
- du Preez, J. H., Giesecke, W. H., & Hattingh, P. J. (1990). *Heat stress in dairy cattle and other livestock under southern african conditions. I. Temperature-Humidity Index mean values during the four main seasons.*
- Fedrigo, J., Báez, F., Cruz, R. S., & Viñoles, C. (2021). Heat tolerance in cows of British breeds and their crosses with bonsmara under grazing conditions. *Journal of Thermal Biology*, 102(October), 2019-2022.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103118>
- Ferreira, R. M., Ayres, H., Chiaratti, M. R., Ferraz, M. L., Araújo, A. B., Rodrigues, C. A., Watanabe, Y. F., Vireque, A. A., Joaquim, D. C., Smith, L. C., Meirelles, F. v., & 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>
- García, G. A., Miralles, D. J., Serrago, R. A., Alzueta, I., Huth, N., & Dreccer, M. F. (2018). Warm nights in the Argentine Pampas: Modelling its impact on wheat and barley shows yield reductions. *Agricultural Systems*, 162(April 2017), 259-268. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2017.12.009>
- Gendelman, M., Aroyo, A., Yavin, S., & Roth, Z. (2010). Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*, 140(1), 73-82.  
<https://doi.org/10.1530/REP-10-0055>
- Gendelman, M., & Roth, Z. (2012). 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>
- Gomez, A. (2019). Uruguay: país productor de alimentos para un sistema alimentario disfuncional. *Agrociencia Uruguay*, 23(1). <https://doi.org/10.31285/agro.23.1.8>
- Gonzalez-Rivas, P. A., Chauhan, S. S., Ha, M., Fegan, N., Dunshea, F. R., & Warner, R. D. (2020). Effects of heat stress on animal physiology, metabolism, and meat quality: A review. *Meat Science*, 162, 108025.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108025>
- Guo, J., Liu, F., Guo, Z., Li, Y., An, Z., Li, X., Li, Y., & Zhang, Y. (2010). In vitro development of goat parthenogenetic and somatic cell nuclear transfer embryos derived from different activation protocols. *Zygote*, 18(1), 51-59.  
<https://doi.org/10.1017/S0967199409005504>
- Han, B. S., & Gao, J. L. (2013). Effects of chemical combinations on the parthenogenetic activation of mouse oocytes. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 5(5), 1281-1288. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1018>
- Hansen, P. J. (2007). Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in

- dairy cattle during heat stress. *Theriogenology*, 68(SUPPL. 1), 242-249.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.008>
- Hansen, P. J. (2009). Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1534), 3341-3350. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0131>
- Hansen, P. J. (2011). Heat Stress and Climate Change. En *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Second Edi, Vol. 4). Elsevier B.V.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00291-9>
- Harvey, A. J. (2007). The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Animal Reproduction Science*, 98(1-2), 113-128.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.008>
- Holm, P., Booth, P. J., Schmidt, M. H., Greve, T., & Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst in a static in vitro production system SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, 1, 684-700.
- Huertas, S. M., Bobadilla, P., Bueno, H., Vila, F., César, D., Callero, J. L., Piaggio, J. M., & Gil, A. (2020). EVALUACIÓN DE LA SUSTENTABILIDAD DE LOS SISTEMAS PRODUCTIVOS SILVOPASTORILES Y SISTEMAS FORESTALES EXISTENTES EN EL PAÍS Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE BOVINOS DE CARNE. En *Serie FPTA-INIA* (Vol. 87).
- INAC. (2021). *Anuario estadístico 2021*.
- Kitagawa, Y., Suzuki, K., Yoneda, A., & Watanabe, T. (2004). Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, 62(7), 1186-1197.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.011>
- Llamas Luceño, N., de Souza Ramos Angrimani, D., de Cássia Bicudo, L., Szymańska, K. J., van Poucke, M., Demeyere, K., Meyer, E., Peelman, L., Mullaart, E., Broekhuijse, M. L. W. J., & van Soom, A. (2020). Exposing dairy bulls to high temperature-humidity index during spermatogenesis compromises subsequent embryo development in vitro. *Theriogenology*, 141, 16-25.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.08.034>
- Llaneza, N., & Perez, F. (2008). *Relevamiento de la raza brangus en el Uruguay*.
- Magata, F., Urakawa, M., Matsuda, F., & Oono, Y. (2021). Developmental kinetics and viability of bovine embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *Theriogenology*, 161, 243-251.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.001>
- Martins, C. F., Fonseca-Neto, A. M., Bessler, H. C., Dode, M. A. N., Leme, L. O., Franco, M. M., McManus, C. M., Malaquias, J. V., & Ferreira, I. C. (2020). Natural shade from integrated crop–livestock–forestry mitigates environmental heat and increases the quantity and quality of oocytes and embryos produced in vitro by Gyr dairy cows. *Livestock Science*, 244.  
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104341>
- 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>
- McGlone, J. (2010). Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching. En *Animal Science* (Número January).



- Méo, S. C., Leal, C. L. V., & Garcia, J. M. (2004). Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. *Animal Reproduction Science*, 80(1-2), 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.09.004>
- Méo, S. C., Yamazaki, W., Ferreira, C. R., Perecin, F., Saraiva, N. Z., Leal, C. L. V., & Garcia, J. M. (2007). Parthenogenetic activation of bovine oocytes using single and combined strontium, ionomycin and 6-dimethylaminopurine treatments. *Zygote*, 15(4), 295-306. <https://doi.org/10.1017/S0967199407004285>
- MGAP. (2021). *Anuario Estadístico Agropecuario [Annual Agricultural Statistics]*. <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2021/LIBRO ANUARIO 2021 Web.pdf>
- MGAP. (2022). *ANUARIO ESTADÍSTICO AGROPECUARIO 2022*.
- MGAP-OPYPA. (2018). Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Oficina de Programación y Política Agropecuaria. En *Anuario 2018*.
- MGAP-OPYPA. (2021). Analisis Sectorial de Programacion y Politica Agropecuaria. En *OPYPA*.
- Minamihashi, A., Watson, A., & Watson, P. (1993). *Bovine parthenogenetic blastocysts following in vitro maturation and oocyte activation with ethanol*. 403, 63-76.
- Morado, S. A., Cetica, P. D., Beconi, M. T., & Dalvit, G. C. (2009). Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(4), 608-614. <https://doi.org/10.1071/RD08198>
- Morrell, J. M. (2020). Heat stress and bull fertility. *Theriogenology*, 153, 62-67. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.014>
- Moura, M. T., & Paula-Lopes, F. F. (2020). Thermoprotective molecules to improve oocyte competence under elevated temperature. *Theriogenology*, 156, 262-271. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.017>
- Mutwedu, V. B., Nyongesa, A. W., Oduma, J. A., Kitaa, J. M., & Mbaria, J. M. (2020). Thermal stress causes oxidative stress and physiological changes in female rabbits. *Journal of Thermal Biology*, 102780. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102780>
- Naranjo-Gómez, J. S., Uribe-García, H. F., Herrera-Sánchez, M. P., Lozano-Villegas, K. J., Rodríguez-Hernández, R., & Rondón-Barragán, I. S. (2021). Heat stress on cattle embryo: gene regulation and adaptation. *Heliyon*, 7(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06570>
- Natarajan, R., Shankar, M. B., & Munuswamy, D. (2010). Effect of  $\alpha$ -tocopherol supplementation on in vitro maturation of sheep oocytes and in vitro development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(8), 483-490. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9430-7>
- Olson, S. E., & Seidel, G. E. (2000a). *Culture of In Vitro-Produced Bovine Embryos with Vitamin E Improves Development In Vitro and After Transfer to Recipients* 1. 252, 248-252.
- Olson, S. E., & Seidel, G. E. (2000b). Reduced oxygen tension and EDTA improve bovine zygote development in a chemically defined medium. *Journal of Animal Science*, 78(1), 152-157. <https://doi.org/10.2527/2000.781152x>
- 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)

- Payton, R., & Rispoli, L. (2018). *Mitochondrial-related consequences of heat stress exposure during bovine oocyte maturation persist in early embryo development*.
- Pereira, M. M., MacHado, M. A., Costa, F. Q., Serapiao, R. v., Viana, J. H. M., & Camargo, L. S. A. (2010). Effect of oxygen tension and serum during IVM on developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(7), 1074-1082. <https://doi.org/10.1071/RD10007>
- Rakha, S. I., Elmetwally, M. A., El-Sheikh Ali, H., Balboula, A., Mahmoud, A. M., & Zaabel, S. M. (2022). Importance of Antioxidant Supplementation during In Vitro Maturation of Mammalian Oocytes. *Veterinary Sciences*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/vetsci9080439>
- Ribas, B. N., Missio, D., Junior Roman, I., Neto, N. A., Claro, I., dos Santos Brum, D., & Leivas, F. G. (2018). Superstimulation with eCG prior to ovum pick-up improves follicular development and fertilization rate of cattle oocytes. *Animal Reproduction Science*, 195, 284-290. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.006>
- Rocha, A., Randel, R. D., Broussard, J. R., Lim, J. M., Blair, R. M., Roussel, J. D., Godke, R. A., & Hansel, W. (1998). High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, 49(3), 657-665. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00016-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00016-8)
- Roelen, B. A. J. (2019). Bovine oocyte maturation: Acquisition of developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(2), 98-103. <https://doi.org/10.1071/RD19255>
- 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. (2020). Reproductive physiology and endocrinology responses of cows exposed to environmental heat stress - Experiences from the past and lessons for the present. *Theriogenology*, 155, 150-156. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.040>
- 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., Arav, A., Bor, A., Zeron, Y., Braw-Tal, R., & Wolfenson, D. (2001). Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction*, 122(5), 737-744. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220737>
- Roth, Z., & Hansen, P. J. (2004). Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biology of Reproduction*, 71(6), 1898-1906. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031690>
- Rovira, P. (2012). Efecto de la sombra en la cría de novillos en sistemas pastoriles de la región este del Uruguay. *Serie técnica INIA*, 202, 1-84.
- Saadoun, A., & Cabrera, M. C. (2013). Calidad nutricional de la carne bovina producida en Uruguay Nutritional quality of the beef produced in Uruguay. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 21, 119-130. [www.alpa.org.ve/ojs/index.php](http://www.alpa.org.ve/ojs/index.php)
- Santos, M. V. de O., Nascimento, L. E., Praxedes, É. A., Borges, A. A., Silva, A. R., Bertini, L. M., & Pereira, A. F. (2019). *Syzygium aromaticum* essential oil

- supplementation during in vitro bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development. *Theriogenology*, 128, 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.031>
- Saravia, C., & Cruz, G. (2003). Influencia del ambiente atmosférico en la adaptación y producción animal. *Notas Técnicas v. 50. Facultad de Agronomía*, 36.
- 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>
- Speckhart, S. L., Wooldridge, L. K., & Ealy, A. D. (2023). An updated protocol for in vitro bovine embryo production. *STAR Protocols*, 4(1). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101924>
- Suvá, M., Canel, N. G., & Salamone, D. F. (2019). Effect of single and combined treatments with MPF or MAPK inhibitors on parthenogenetic haploid activation of bovine oocytes. *Reproductive Biology*, 19(4), 386-393. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.09.001>
- Tao, Y., Zhou, B., Xia, G., Wang, F., Wu, Z., & Fu, M. (2004). Exposure to L-Ascorbic Acid or  $\alpha$ -Tocopherol Facilitates the Development of Porcine Denuded Oocytes from Metaphase I  
tofile:///Users/belengomezmazei/Desktop/Tesis/Archivos/Henry2018.pdf  
file:///Users/belengomezmazei/Desktop/Tesis/Archivos/Sejian 2018.pdf. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(1), 52-57. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00478.x>
- Tareq, K., Akter, Q., Yahia Khandoker, M., & Tsujii, H. (2012). *Selenium and vitamin E improve the in vitro maturation, fertilization and culture to blastocyst of porcine oocytes*.
- Thiyagarajan, B., & Valivittan, K. (2009). Ameliorating effect of vitamin e on in vitro development of preimplantation buffalo embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(4), 217-225. <https://doi.org/10.1007/s10815-009-9302-1>
- Thom, E. C. (1959). The Discomfort Index. *Weatherwise*, 12(2), 57-61. <https://doi.org/10.1080/00431672.1959.9926960>
- Ticianelli, J. S., Emanuelli, I. P., Satrapa, R. A., Castilho, A. C. S., Loureiro, B., Sudano, M. J., Fontes, P. K., Pinto, R. F. P., Razza, E. M., Surjus, R. S., Sartori, R., Assumpção, M. E. O. A., Visintin, J. A., Barros, C. M., & Paula-Lopes, F. F. (2017). Gene expression profile in heat-shocked Holstein and Nelore oocytes and cumulus cells. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(9), 1787-1802. <https://doi.org/10.1071/RD16154>
- Tiscornia, G., Montossi, F., Manna, A. la, Paruelo, J., & Rovira, P. (2022). LAS RESTRICCIONES CLIMÁTICAS EN LOS SISTEMAS GANADEROS Y EL PAPEL DE LOS BOSQUES NATIVOS. En *Oportunidades y desafíos del uso de los bosques nativos integrados a la producción ganadera de Uruguay* (pp. 20-29).
- Torres-Júnior, J. R. de S., Pires, M. de F. A., de Sá, W. F., Ferreira, A. de M., Viana, J. H. M., Camargo, L. S. A., Ramos, A. A., Folhadella, I. M., Polisseni, J., de Freitas, C., Clemente, C. A. A., de Sá Filho, M. F., Paula-Lopes, F. F., & Baruselli, P. S. (2008). Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 69(2), 155-166. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.023>
- 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(3), 146-153. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00493.x>
- Uruguay XXI. (2020). Informe sectorial Agronegocios. En *Uruguay XXI*.
- Uruguay XXI. (2021). Informe anual, comercio exterior. *Uruguay XXI*.
- Uruguay XXI. (2022). *SECTOR GANADERO en Uruguay*. [www.uruguayxxi.gub.uy](http://www.uruguayxxi.gub.uy)
- Wang, J., Li, J., Wang, F., Xiao, J., Wang, Y., Yang, H., Li, S., & Cao, Z. (2020). Heat stress on calves and heifers: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00485-8>
- Wang, X., & Quinn, P. J. (2000). The location and function of vitamin E in membranes (Review). *Molecular Membrane Biology*, 17(3), 143-156. <https://doi.org/10.1080/09687680010000311>
- 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)
- Yaacobi-Artzi, S., Shimoni, C., Kalo, D., Hansen, P. J., & Roth, Z. (2020). Melatonin slightly alleviates the effect of heat shock on bovine oocytes and resulting blastocysts. *Theriogenology*, 158, 477-489. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.039>
- Yashiro, I., Tagiri, M., Ogawa, H., Tashima, K., Takashima, S., Hara, H., Hirabayashi, M., & Hochi, S. (2015). High revivability of vitrified-warmed bovine mature oocytes after recovery culture with  $\alpha$ -tocopherol. *Reproduction*, 149(4), 347-355. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0594>
- Yuan, Y., Hao, Z. D., Liu, J., Wu, Y., Yang, L., Liu, G. S., Tian, J. H., Zhu, S. E., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.03.005>
- Zuo, Z., Niu, Z., Liu, Z., Ma, J., Qu, P., Qiao, F., Su, J., Zhang, Y., & Wang, Y. (2020). The effects of glycine-glutamine dipeptide replaced L-glutamine on bovine parthenogenetic and IVF embryo development. *Theriogenology*, 141, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.005>