

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**ESTRÉS CALÓRICO EN LA HEMBRA BOVINA: CAMBIOS FISIOLÓGICOS *IN VIVO* Y  
MODELO DE ESTUDIO *IN VITRO* DE OVOCITOS**

por

Mariana GUTIÉRREZ ABAD

TESIS DE GRADO presentada como uno  
de los requisitos para obtener  
el título de Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Higiene, Inspección-Control y  
Tecnología de los Alimentos de Origen  
Animal

MODALIDAD Revisión Monográfica

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2018**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de mesa:

---

Dra. Carolina Viñoles

Segundo miembro (Tutor):

---

Dr. Francisco Báez

Tercer miembro:

---

Dr. Jean Fedrigo

Fecha:

---

23 de noviembre 2018

Autora: Mariana Gutiérrez Abad

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por su cariño y apoyo incondicional, sin los cuales no hubiese sido posible el logro de esta meta.

A mis abuelos por su cariño y por siempre estar pendientes a la distancia.

A mi pareja por su apoyo y cariño, y por acompañarme siempre, en esta última etapa de mi carrera.

A mis amigos de la vida y amigas y compañeras de esta casa de estudios por siempre estar ahí.

A mis tutores, por toda su ayuda y conocimientos brindados para la realización de este trabajo.

A los funcionarios de biblioteca por la información y talleres brindados.

Y especialmente a la Facultad de Veterinaria UdelaR, por permitirme realizar esta hermosa carrera.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	6
SUMMARY.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
OBJETIVOS.....	11
I. <u>General</u>	
II. <u>Específicos</u>	
<b>DESARROLLO DEL TRABAJO</b>	
I. <u>Influencia del medioambiente en el animal</u> .....	12
II. <u>Mecanismos de termorregulación</u> .....	14
III. <u>Efectos del estrés calórico y choque térmico en la reproducción de la hembra bovina</u> .....	16
III.a. Efectos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y desarrollo folicular.....	17
III.b. Efectos sobre la maduración, calidad y competencia ovocitaria.....	21
III.c. Efectos sobre el desarrollo embrionario.....	25
IV. <u>Agentes reguladores de termorresistencia en ovocitos bovinos <i>in vitro</i></u> .....	26
IV.a. Agentes reguladores frente al mecanismo apoptótico inducido por el choque térmico.....	27
IV.b. Agentes reguladores frente al mecanismo oxidativo inducido por el choque térmico.....	29
IV.c. Otros posibles agentes reguladores frente al choque térmico.....	29
V.    Perspectivas futuras para el estudio de estrés calórico en bovinos en el Uruguay.....	32
V.a. Modelo <i>in vitro</i> para estudiar el choque térmico en ovocitos bovinos.....	34
<b>CONCLUSIONES</b> .....	38
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	39

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

**Tabla I:** Alteraciones inducidas por la elevada temperatura sobre ovocitos bovinos en estadios de vesícula germinal y madurados *in vitro*.....23

**Tabla II:** Efectos del choque térmico y agentes reguladores de termorresistencia en ovocitos bovinos durante la maduración *in vitro*.....27

### FIGURAS

**Figura 1:** Relación entre el índice metabólico en reposo y la temperatura ambiental en mamíferos y aves .....14

**Figura 2:** Balance térmico en ganado bovino para carne.....15

**Figura 3:** Interacciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....17

**Figura 4:** Efectos a largo plazo del estrés calórico sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y su participación en la reducción de la fertilidad en la vaca.....20

**Figura 5:** Efectos directos e indirectos del choque térmico en el grupo de folículos ováricos y el cuerpo lúteo en asociación con alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario .....21

**Figura 6:** Efectos directos e indirectos del choque térmico sobre la capacidad de desarrollo en ovocitos .....23

**Figura 7:** Departamentos del Uruguay donde se han realizado estudios sobre estrés calórico en bovinos durante el verano.....33

**Figura 8:** Diseño experimental para el estudio *in vitro* de la termorresistencia de ovocitos bovinos utilizando agentes termoprotectores.....36

## RESUMEN

En bovinos, el estrés calórico materno compromete la fertilidad resultando en pérdidas económicas para la industria animal. En Uruguay la mayoría del ganado es criado en sistemas pastoriles pudiendo verse afectado por el estrés calórico en momentos puntuales durante los meses de verano, sobre todo en los departamentos al norte del país. A pesar de su importancia en la producción cárnica nacional, hasta ahora no existen estudios que valoren el impacto del estrés calórico en la fertilidad del rodeo de cría. La hipertermia provoca una disminución en la función celular de varios tejidos del tracto reproductivo de la hembra bovina, teniendo repercusiones negativas sobre la secreción hormonal, desarrollo embrionario e incluso generando daños al propio ovocito, que son las estructuras más sensibles. No se conocen exactamente los mecanismos mediante los cuales se generan dichos daños, pero se cree que son debidos al aumento de la actividad apoptótica y producción de especies oxígeno reactivas (ROS) en los compartimentos citoplasmáticos y nucleares a nivel celular. En este sentido, diversos autores han estudiado los efectos del choque térmico, haciendo uso de métodos *in vitro*, sobre los complejos cumulus ovocito (COCs) bovinos y cómo dichos efectos pueden ser mitigados utilizando agentes moduladores de termorresistencia durante la maduración *in vitro* (MIV). Entre los agentes estudiados se encuentran el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), esfingosina-1-fosfato (S1P), retinol, astaxantina y curcaciolina A y B. En este trabajo se recopilaron los conocimientos sobre estrés calórico, con énfasis en la hembra bovina, evaluando la información existente al respecto en el país. Por este motivo se plantea el estudio del estrés calórico a través de determinación de ITH y variables de respuesta en el propio animal a nivel de campo. Estos parámetros pueden ser implementados posteriormente en un modelo *in vitro* con el objetivo de evaluar directamente la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos expuestos a choque térmico, junto con el efecto termoprotector de varios compuestos como vitamina E (vit E), selenio (Se), L-carnitina (LC) y cisteamina, como una alternativa para modular los efectos de la temperatura elevada en la función reproductiva en las hembras bovinas.

Palabras clave: biotecnología, alta temperatura, atenuación, cría bovina

## SUMMARY

In cattle, maternal heat stress compromises fertility, resulting in economic losses for animal industry. In Uruguay, cattle are mainly raised in pastoral systems and may be affected by heat stress at specific times during summer months, especially in the northern regions of the country. To date, there are no studies that assess the impact of heat stress on the cattle breeding fertility, despite their relevance in the national meat production. Hyperthermia impairs cellular functions from several tissues in the bovine female's reproductive tract, such as hormonal secretion, embryo development and it even damages the oocyte itself, which are the most sensitive structures. Mechanisms by which these damages are elicited are not completely known, however, it is believed that they involve the increase of apoptotic activity and the production of reactive oxygen species (ROS) in cytoplasmic and nuclear compartments at the cellular level. *In vitro* induced-heat shock effects on bovine cumulus-oocyte complex (COCs) can be mitigated using thermoresistant modulating agents during *in vitro* oocyte maturation. Among these modulating agents are insulin-like growth factor type I (IGF-I), sphingosine-1-phosphate (S1P), retinol, astaxanthin, curcacycline A and B. The aim of this work was to gather knowledge about heat stress with emphasis on the bovine female, evaluating the existing information in this regard in the country. For this reason we propose to study heat stress through determination of ITH and response variables on the animal itself under field conditions. These parameters can then be implemented in an *in vitro* model to directly assess the development capacity of bovine oocytes exposed to thermal shock and in turn evaluate the thermoprotective effect of several compounds such as vitamin E (vit E), selenium (Se), L- carnitine (LC) and cysteamine, as an alternative to modulate the effects of elevated temperature on reproductive function in bovine females.

Keywords: biotechnology, high temperature, attenuation, bovine breeding

## INTRODUCCIÓN

La ganadería representa la principal actividad económica del Uruguay. Nuestro país ocupa la lista de los mayores productores cárnicos a nivel mundial, contando con 11,7 millones de vacunos y encontrándose entre los diez principales exportadores de carne bovina (MGAP, DIEA, 2018). El área dedicada a la ganadería es de 15 millones de ha (entre establecimientos ganaderos y agrícolas ganaderos), de las cuales el 12,3% corresponde a pasturas mejoradas (praderas o verdes) (MGAP, DIEA, 2018). Saadoun y Cabrera (2013) mencionan que los sistemas de producción de carne utilizados, ya sea con destino de exportación o mercado interno, pueden ser de base estrictamente pastoril, con incorporación de suplementos o terminados en encierro y concentrado (tipo *feedlot*). En estos sistemas, los animales pueden verse expuestos a factores climáticos que inciden en la regulación de la producción de calor, lo cual se asocia con las funciones de mantenimiento y producción (Hahn y col., 2003).

El estrés calórico es una condición que resulta de la incapacidad del animal para disipar el calor corporal de manera efectiva y mantener la temperatura corporal normal (Rolf, 2015). En el ganado bovino representa un problema con consecuencias económicas (Wolfenson y col., 2000; Hansen, 2011). En los primeros reportes, el estrés calórico se consideró un problema para el ganado principalmente en climas cálidos (Erb y col., 1940; Seath y Staple, 1941; citado por Stott y Williams, 1962). Sin embargo, se ha descrito que la reducción de la función reproductiva durante el verano no sólo ocurre en regiones tropicales y subtropicales, sino que también se ha manifestado en regiones templadas alrededor del mundo (Hansen, 2007). En nuestro país, las temperaturas ambientales medias y máximas registradas en los meses más cálidos corresponden a 24°C y 29,6°C, respectivamente (Castaño y col., 2011).

El calentamiento global y el cambio climático han tenido un impacto en todo el mundo, el aumento de la temperatura ambiental, especialmente en verano, es una cuestión crítica en el desempeño del ganado ya que tiene repercusiones a nivel productivo y reproductivo (Sakatani, 2017). Según Bartaburu (2007) en Uruguay, son pocos los estudios sobre el efecto del estrés calórico en bovinos y se focalizan más en ganado lechero. Por ejemplo, se han registrado mermas en la producción láctea a causa de estrés calórico en los meses de verano al Norte del Río Negro (Cruz y Saravia, 2008), Sur (Abraham y Collazo, 2015) y Suroeste del Uruguay (Capó y Senosiáin, 2015), existiendo algunos trabajos en ganado de carne en región Este (Rovira, 2012) y Norte (Beretta y col., 2013; Baraibar y Piazza, 2014; Santa Cruz y col., 2018). Sin embargo, en nuestro país, se desconoce el impacto del estrés calórico sobre la función reproductiva de las hembras bovinas de ganado de cría específicamente (Bartaburu, 2007), hecho que motiva a realizar estudios que generen información al respecto.

Diversos autores indican que la temperatura y la humedad corresponden a los principales factores ambientales que afectan los índices productivos del ganado (Hahn y col., 2003). Por este motivo, se ha desarrollado el Índice de Temperatura y Humedad (ITH) para estimar el riesgo de estrés calórico al que están sometidos los animales (Thom, 1959). La temperatura rectal es otro indicador del balance térmico que puede ser usado para evaluar la adversidad del medioambiente calórico



(Johnson, 1987). El estrés calórico en bovinos causa un aumento de la temperatura rectal, lo que se asocia con reducciones en el consumo de materia seca, la producción de leche y la fertilidad (Ealy y col., 1993; West, 2003). Gwazdauskas y col. (1973) indican que las temperaturas rectales son paralelas a las que ocurren en el útero y pueden alcanzar o superar los 41 °C (Ealy y col., 1993). En este sentido, Ulberg y Burfening (1967) han reportado una disminución de un 25% en la tasa de preñez por cada aumento de 1 °C en la temperatura rectal.

Hansen y col. (2001) explican que la reducción de la fertilidad asociada con el estrés calórico es un problema multifactorial, ya que la hipertermia puede afectar la función celular de varios tejidos del tracto reproductivo de la hembra. Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* revelan efectos deletéreos sobre el crecimiento, estructura y función de los ovocitos y el posterior desarrollo embrionario. En los estudios *in vivo* se refiere a la elevada temperatura como "estrés calórico", mientras que en los estudios *in vitro* se utiliza el término "choque térmico" que refiere a los efectos de la elevada temperatura en la función celular (Hansen, 2009).

Putney y col. (1989) describen un aumento en la proporción de embriones anormales y retardados en vaquillonas expuestas a estrés calórico entre el inicio del estro y la inseminación. La propuesta de estudiar el efecto del estrés calórico basándose en lo que experimentan los animales *in vivo* resulta una tarea difícil. Por este motivo es interesante contar con el desarrollo de modelos *in vitro*, donde los ovocitos son madurados por 24 horas hasta alcanzar la metafase II, permitiendo evaluar los efectos directos del choque térmico sobre los mismos (Maya-Soriano, 2012). Las temperaturas aplicadas para la MIV pueden ser ajustadas a las temperaturas reales a las cuales se someten las vacas en condiciones de estrés calórico a campo, a fin de obtener resultados más precisos (Nabenishi y col., 2011a). A su vez, Gendelman y Roth (2012b) reafirmaron la confiabilidad con la que es posible simular las condiciones de estrés calórico *in vivo* en los modelos *in vitro*.

Por ejemplo, Edwards y Hansen (1997), cultivaron ovocitos bovinos madurados a 41°C y notaron efectos directos del choque térmico, observando reducción en el desarrollo del blastocisto. De forma similar, se demostró que cultivar complejos cumulus ovocito (COCs) a temperatura elevada durante la maduración disminuye la tasa de división embrionaria y la proporción de ovocitos que llegan a blastocistos (Edwards y col., 1997). En este sentido el proceso de maduración de los ovocitos también es susceptible a la interrupción por el estrés por calor (Roth y Hansen, 2004a).

Estudios más recientes han encontrado otros efectos negativos sobre el ovocito. Entre ellos se incluyen alteraciones en la maduración citoplasmática y nuclear, en la expresión de proteínas, en la estructura de la membrana, ocurrencia de envejecimiento prematuro, alteraciones de la competencia ovocitaria (Maya-Soriano, 2012) e inducción de apoptosis (Rodríguez y col., 2016). Recientemente, Ahmed y col. (2017) describen un colapso de la organización del citoesqueleto del ovocito, lo que puede explicar el fallo de reinicio de la meiosis durante el choque térmico (Roth y Hansen, 2005). También se han constatado alteraciones en la estructura de la zona pelúcida al exponer ovocitos a 42°C por 30 minutos (Ju y col., 1999), lo que podría explicar la reducción de la tasa de división observada en ovocitos expuestos a choque térmico (Tseng y Ju, 2009). La exposición a elevadas temperaturas podría

alterar el mecanismo que evita la polispermia, e incluso aumentarla, así como reducir la capacidad de desarrollo embrionario (Sakatani, 2017).

Para contrarrestar los efectos deletéreos del estrés calórico de una forma sencilla y rápida a nivel de campo, se ha sugerido la modificación física del ambiente (uso de sombra, ventilación, etc.), así como el uso de esquemas apropiados de manejo nutricional, especialmente en áreas donde los períodos de estrés por calor se alternan con condiciones favorables para la producción (Beede y Collier, 1986). Sin embargo, ante los daños mencionados sobre el ovocito bovino frente al choque térmico y considerando su vital importancia en la función reproductiva, Paula-Lopes y col. (2012) han remarcado la necesidad de identificar, en condiciones de laboratorio, agentes termoprotectores que mitiguen los efectos de la alta temperatura en la función reproductiva y de esta forma permitir el empleo de estrategias capaces de adquirir la competencia para el desarrollo durante la época de verano.

Por lo mencionado anteriormente, en el presente trabajo se realiza una revisión de la bibliografía disponible vinculada al estrés calórico en bovinos y sus efectos sobre la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos. A su vez, se manifiesta la necesidad de generar información sobre el efecto de la hipertermia en el ganado bovino de carne, en la Región Norte del país donde los animales presentan más riesgo de exponerse a estrés calórico, hecho que puede afectar no solamente el bienestar de los animales sino también su productividad. Asimismo, se plantea un modelo para el estudio *in vitro* de la vulnerabilidad del ovocito bovino frente al choque térmico durante la etapa de maduración, evaluando sus posibles efectos sobre la progresión meiótica, la calidad ovocitaria y el desarrollo embrionario posterior, valorando el índice de apoptosis en blastocistos y analizando el efecto atenuante de agentes termoprotectores. Esto último con el objetivo final de recopilar información que sea útil para abordar y valorar el impacto del estrés calórico en el rodeo de cría, y generar estrategias para mitigarlo.

## OBJETIVOS

### I. General

- Realizar una revisión de la bibliografía disponible vinculada al estrés calórico en bovinos y sus efectos sobre la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos.

### II. Específicos

- Recopilar los conocimientos teóricos relacionados con el estrés calórico y su impacto sobre la reproducción bovina.
- Describir los procesos y estrategias celulares asociados a la regulación *in vitro* de la termorresistencia en ovocitos bovinos expuestos a choque térmico.
- Plantear un modelo *in vitro* para evaluar el efecto termoprotector de algunos compuestos sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos expuestos a choque térmico.

## DESARROLLO DEL TRABAJO

### I. Influencia del medioambiente en el animal

El medioambiente en el cual se encuentra el ganado bovino tiene una gran influencia en su fisiología, comportamiento y salud, pudiendo afectar significativamente el desempeño productivo del animal (revisado por Arias y col., 2008). Se ha descrito a la temperatura del ambiente, humedad relativa, radiación, precipitación, presión atmosférica, luz ultra violeta, velocidad de viento y polvo, como los principales factores físicos naturales del ambiente que afectan al ganado (Hahn y col., 1993). Estos elementos actúan permanentemente sobre el animal, interactuando directamente con su piel y cobertura, afectando los receptores nerviosos situados en la piel o retina ocular, los cuales transmiten la información recibida al hipotálamo para poner en acción los mecanismos compensatorios (Bianca, 1972; citado por Saravia, 2009).

Hahn y col. (2003) describen a la temperatura ambiental como la variable más investigada y utilizada como indicador de estrés calórico, con importancia significativa, ya que existe una marcada disminución de la fertilidad de los animales en meses calurosos (Jia y col., 2012). En este sentido, Aggarwal y Upadhyay, (2013) manifiestan que las altas temperaturas ambientales generan cambios drásticos en las funciones fisiológicas del animal, incluyendo disminución de la ingesta de alimentos y alteraciones en el metabolismo del agua, proteínas, balances energéticos y minerales, secreciones hormonales y metabolitos sanguíneos.

Como se mencionó previamente, la temperatura rectal es paralela a la temperatura del útero bovino (Gwazdauskas y col., 1973), y puede utilizarse como un indicador del balance térmico para evaluar la adversidad del medioambiente calórico sobre el animal (Johnson, 1987). Estudios más recientes reafirman este concepto, al demostrar una disminución del 21 al 15% en la tasa de concepción luego de la inseminación artificial, cuando la temperatura rectal es mayor a 39,1°C (Pereira y col., 2013). En este sentido, las medidas reproductivas como tasa de concepción, calidad del ovocito y pérdidas embrionarias pueden utilizarse como indicadores de bienestar para las vacas expuestas a estrés calórico, ya que todas se ven afectadas por las temperaturas elevadas; sin embargo, sólo indican que el animal estaba en estrés por calor en el momento de la reproducción (revisado por Polsky y von Keyserlingk, 2017).

El ITH es otro indicador que según Rovira (2012) resulta una herramienta fácil de utilizar para caracterizar el ambiente de producción y estimar el riesgo de estrés calórico al que se exponen los animales. Este indicador se divide en categorías que potencialmente indican el nivel de estrés por calor, aunque sus definiciones varían entre los investigadores y las condiciones (Polsky y von Keyserlingk, 2017). Mader y col. (2006), describen cuatro categorías: normal ( $ITH \leq 74$ ), alerta ( $74 < ITH < 79$ ), peligro ( $79 \leq ITH < 84$ ) y emergencia ( $ITH \geq 84$ ). Por su parte, De Rensis y col. (2015), indican que se observan leves signos de estrés por calor a valores de ITH entre 68 y 74, y aseguran que un  $ITH \geq 75$  causa disminuciones drásticas en el rendimiento de la producción.

En nuestro país se han realizado estudios donde se caracterizó el medioambiente utilizando este índice, registrándose valores de ITH por encima del valor crítico para bovinos ( $ITH > 72$ ), en los departamentos de Salto, Artigas, Paysandú, Tacuarembó, Rivera y Cerro Largo durante gran parte del verano (Cruz y Saravia, 2008). En otro estudio realizado en el departamento de Colonia en ganado lechero, se registraron valores de ITH superiores al crítico en los meses de verano con una probabilidad de 40% repercutiendo en la producción láctea (Abrahim y Collazo, 2015). Más recientemente, en el departamento de Tacuarembó, Santa Cruz y col. (2018) determinaron, mediante el ITH basado en el globo negro (contemplando la radiación solar directa), que durante el período de entore para ganado de cría, existen condiciones de estrés calórico, llegando a registrar valores de emergencia en un 25% del tiempo.

Así mismo, en nuestro país, también se han realizado estudios que describen la evolución, durante periodos de al menos 5 años, de las principales variables que se relacionan con el estrés calórico en animales durante los meses de verano. De esta forma Rovira (2012) en un estudio que reúne datos del periodo 1973-2010, reporta la existencia de condiciones ambientales puntuales para el desarrollo de estrés calórico medio ( $72 < ITH < 79$ ) y severo ( $ITH \geq 79$ ), desde fines de diciembre hasta principios de marzo.

A su vez Rovira (2012) describe para el este del país y durante el período 2007-2011, que los animales están expuestos, aproximadamente un 50% del tiempo, a condiciones ambientales de riesgo de estrés calórico durante los meses de verano, pudiendo recuperarse en horas de la madrugada en caso de haber sufrido estrés calórico durante el día. Sin embargo, se registraron períodos de 4-5 días con riesgo de estrés calórico severo ( $ITH \geq 79$ ) durante el día, denominados "olas de calor", donde incluso por la madrugada existen condiciones de riesgo de estrés calórico medio, lo que afecta la normal recuperación del animal durante esas horas.

Los efectos negativos del estrés calórico se agravan cuando hay un aumento tanto de la temperatura como de la humedad en el medioambiente (West, 2003). De esta forma ambos factores ejercen un efecto combinado, donde resultan más tolerables los valores elevados de temperatura cuando la humedad relativa es más baja (Cruz, 2009). En Uruguay, los animales no escapan a esta situación ya que, según Batista y col. (2013) el norte del país se caracteriza por la presencia de veranos con alta temperatura y humedad relativa atmosférica. Se ha demostrado que en estas condiciones se produce estrés a nivel fisiológico y comportamental, lo que repercute en la producción y el bienestar del animal (Arias y Mader, 2011). Además, el sistema de producción es principalmente pastoril, por lo que la gran mayoría del ganado está expuesto permanentemente al ambiente exterior, viéndose afectado su comportamiento y productividad (Capó y Senosiain, 2015).

El uso de sombra se plantea como una medida para mitigar los efectos del estrés calórico al que están sometidos los animales en sistemas pastoriles (Rovira, 2012). Beretta y col. (2013) en el departamento de Paysandú, determinaron que el pastoreo restringido junto con el uso de sombra mejoró la ganancia de peso vivo en novillos de recría y engorde. La sombra natural es la opción más barata, aunque tiene como desventaja que muchas veces no está ubicada en el lugar deseado y/o el sobrepastoreo y amontonamiento de los animales puede afectar a los árboles. Como

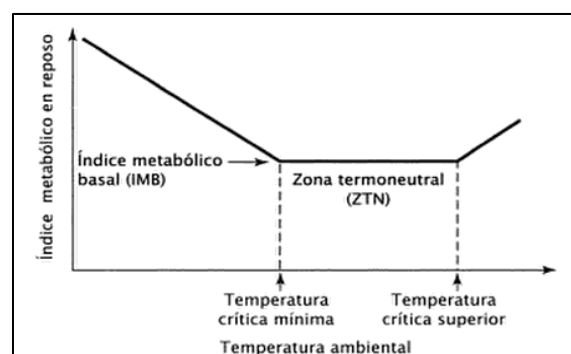
alternativa se sugiere la sombra artificial que puede ser construida a un bajo costo (Rovira, 2012). A su vez, debe tenerse en cuenta que el efecto del estrés calórico en los animales es variable y depende de factores intrínsecos del animal tales como su estado fisiológico, aclimatación térmica previa, genotipo, tipo de alimentación, presencia de enfermedades (Turner y col 1989; citado por Cruz, 2009), temperamento y nivel de producción, entre otros (revisado por Rovira, 2012).

## II. Mecanismos de termorregulación

Los bovinos son animales homeotermos, es decir, mantienen una temperatura corporal constante, alrededor de 38°C, independientemente de las variaciones en la temperatura ambiental (Hill y col., 2006; Klein, 2014). El control del equilibrio térmico es indispensable para lograr el mantenimiento de la salud, el bienestar, y los niveles de producción del animal (Cruz, 2009). Hansen (2009) describe esta regulación como un proceso de control homocinético mediante el cual el equilibrio en la temperatura corporal involucra procesos dinámicos que pueden generar perturbaciones en otros procesos fisiológicos. Para que se cumpla con el proceso de homotermia el animal debe perder tanto el calor producido como el ganado desde el ambiente (Kadzere y col., 2002).

En un rango específico de temperatura ambiental, llamado *zona termoneutral* (ZTN) (Figura 1; Hill y col., 2006) y en estado de reposo, los bovinos, así como otros mamíferos y aves, pueden mantener su propia temperatura dentro de los límites normales. Los valores extremos de la ZTN corresponden a la “temperatura crítica mínima” y la “temperatura crítica máxima” (Hill y col., 2006). En bovinos, la ZTN, o de confort térmico, se encuentra entre los 15 y 25°C para las razas taurinas (*Bos taurus*) y algo superior para las razas cebuinas (*Bos indicus*) (Bartaburu, 2007). En este rango se define el índice metabólico basal en reposo y ayuno (Hill y col., 2006), en el que el animal no usa energía adicional para mantener su temperatura corporal y por lo tanto, los costos fisiológicos son mínimos y la productividad es máxima (Aggarwal y Upadhyay, 2013).

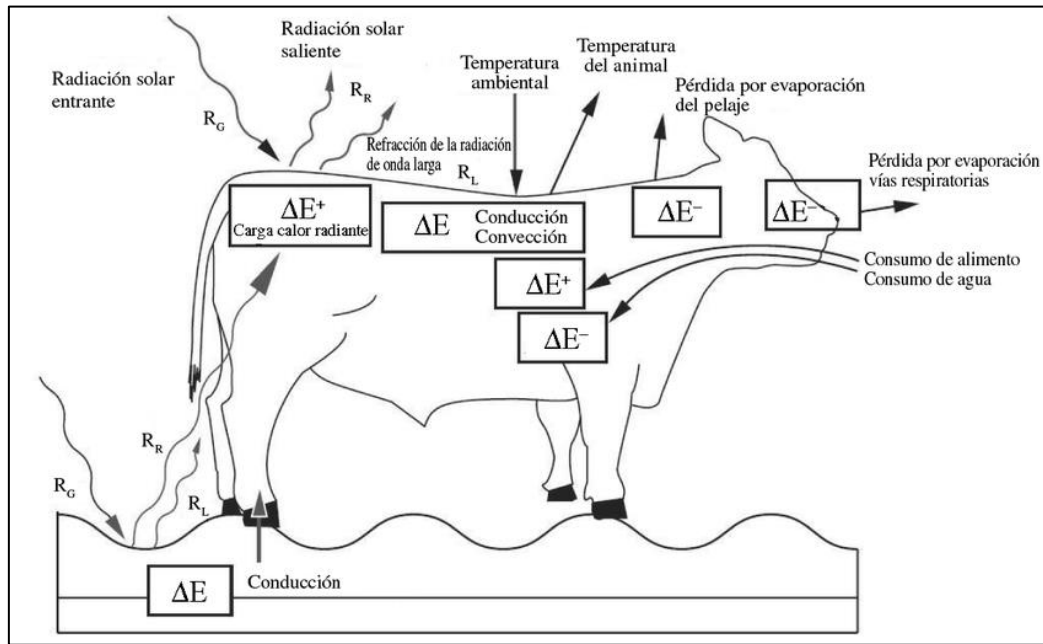
Fuera del rango de la ZTN, el índice metabólico basal se incrementa, a temperaturas ambientales mayores que la temperatura crítica superior, las pérdidas evaporativas aumentan y se hace mínimo el aislamiento térmico de los tejidos (Silanikove, 2000).



**Figura 1.** Relación entre el índice metabólico en reposo y la temperatura ambiental en mamíferos y aves (tomado de Hill y col., 2006).



En bovinos, la temperatura corporal está finamente regulada por la combinación de procesos de producción y pérdida de calor, tales como conducción, convección, radiación y evaporación (Figura 2; Arias y col., 2008). Los tres primeros mecanismos se conocen como pérdidas de calor sensible, sobre los cuales el animal tiene muy poco control; a diferencia de la evaporación, donde tiene un marcado control fisiológico (Klein, 2014).



**Figura 2.** Balance térmico en ganado bovino para carne.  $\Delta E$ : diferencia de energía (tomado de Arias y col., 2008).

Dentro de la ZTN la temperatura corporal es regulada por mecanismos vasomotores que aumentan o disminuyen el flujo sanguíneo dérmico, lo que hace variar la cantidad de calor que se pierde por convección y radiación. Estos mecanismos son normales y pasivos desde el punto de vista del gasto energético (Klein, 2014). Ante una situación de sobrecarga térmica, primero ocurre una vasodilatación que incrementa el flujo de sangre hacia la piel y extremidades. De esta forma, aumenta el gradiente térmico entre la piel y el ambiente, produciéndose una mayor pérdida de calor por convección y radiación (Klein, 2014). A medida que la temperatura ambiental se aproxima a la temperatura corporal (37,5 - 39,5 °C) los mecanismos de disipación de calor no evaporativos (radiación, conducción y convección) comienzan a perder efectividad (González, 2014).

Aggarwal y Upadhyay (2013) afirman que cuando la temperatura ambiental se encuentra por encima del valor crítico máximo de la ZTN se produce una situación de estrés calórico, donde la vasodilatación por sí misma no consigue mantener la temperatura normal. El animal debe entonces poner en marcha mecanismos de evaporación como, por ejemplo, aumento de la tasa respiratoria, que sí implican un gasto energético. En el ganado vacuno, las pérdidas por evaporación a través del aumento de la frecuencia respiratoria y del volumen de la sudoración, son los mecanismos más importantes para disipar el exceso de calor (Kadzere y col., 2002).

Según Bartaburu (2007) la frecuencia respiratoria normal de un bovino es de 20-40 respiraciones por minuto (r/m), pudiendo llegar hasta 120 en situaciones extremas, donde cualquier valor que supere los 40 r/m se considera polipnea térmica, utilizada con el fin de enfriar el organismo (Saravia, 2009).

Hill y col. (2006) aseguran que el enfriamiento por evaporación es la última línea de defensa contra la acumulación de calor, ya que puede generar inconvenientes con el equilibrio hídrico y ácido-básico, además de ser menos eficiente frente a un incremento de la humedad relativa (Saravia, 2009). Por este motivo, en primer término, se ponen en marcha defensas de tipo conductual, como buscar sombra, meterse al agua o revolcarse en el barro (Klein, 2014). La respuesta efectuada por el animal frente al estrés calórico es variable dependiendo de si se trata de estrés calórico agudo o crónico. A corto plazo, los cambios adaptativos se ven reflejados en las respuestas conductuales, cambios fisiológicos, y funciones inmunológicas, mientras que a largo plazo se altera el consumo de alimento y la pérdida de calor, lo que influye sobre el rendimiento productivo y reproductivo del animal (Nienaber y Hahn, 2007).

Se han descrito diferentes estrategias a nivel de campo para mitigar los efectos del estrés calórico en ganado. En cuanto a las medidas de manejo, el uso de sombra se considera la modificación básica y más importante de las condiciones ambientales, ya que reduce el esfuerzo del animal para mantener su homeostasis térmica y generar un menor gasto de energía (Castaño y col., 2014). A su vez, pueden implementarse cambios en la alimentación, mejorando la digestibilidad de las dietas y aumentando la densidad de los nutrientes y la energía metabolizable (Beede y Collier, 1986).

Por otra parte, en bovinos es posible realizar una selección genética de animales termorresistentes, es decir, con la capacidad de regular la temperatura corporal frente al estrés calórico y, a la vez, tener un buen desempeño productivo y reproductivo, ya que existe variabilidad genética intra e inter racial para esta característica (revisado por Hansen, 2015). Se han estimado heredabilidades bajas, moderadas y altas, de acuerdo al fenotipo medido, por ejemplo: 0,11 a 0,68 y 0,76 a 0,84, para mediciones de tasa respiratoria y temperatura corporal, respectivamente (revisado por Rolf, 2015). Sin embargo, la medición de estos fenotipos es costosa y difícil de implementar en los sistemas productivos. Por lo tanto, la identificación de variantes genéticas que tengan efecto sobre la regulación de la temperatura corporal y su uso con fines de selección y manejo puede ser muy útil (Howard y col., 2014). En este sentido, se han identificado algunos genes con efecto mayor, así como varias regiones genómicas que afectan la regulación de la temperatura corporal en bovinos (revisado por Rolf, 2015).

### III. Efectos del estrés calórico y choque térmico en la reproducción de la hembra bovina

La reproducción es una de las funciones fisiológicas de los mamíferos más susceptible de ser alterada por los efectos de la hipertermia (Hansen, 2009). En la hembra bovina, son varios los efectos adversos que experimenta la función reproductiva, observándose una reducción en la función ovárica, en la expresión de

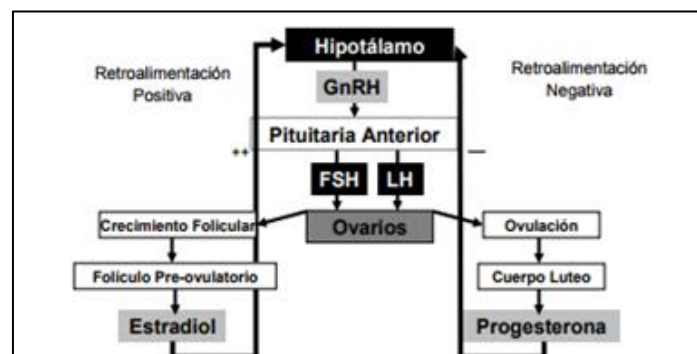


celo y en la tasa de fecundación, así como un aumento de la mortalidad embrionaria (Hansen, 2007; Aggarwal y Upadhyay, 2013).

En la producción ganadera, cuando se habla de estrés calórico generalmente se piensa en el animal a nivel general, sin embargo, no debe dejar de considerarse el impacto de la hipertermia a nivel celular. Si bien aún no se ha dilucidado la base molecular de los efectos de la hipertermia, muchos de los efectos del estrés calórico tienen que ver con el choque térmico que experimentan las células (revisado por Rolf, 2015). Paula-Lopes y col. (2012) indican que esto es debido a que la alta temperatura en el microambiente del tracto reproductivo compromete la dinámica folicular, la secreción hormonal, el ovocito y la función embrionaria.

### III. a. Efectos sobre el Eje hipotálamo-hipófisis-ovario y desarrollo folicular

El ciclo estral de la hembra bovina está sometido a un control neuroendocrino que incluye la integración de diversas señales regulatorias. Este control permite la adecuada liberación de las gonadotropinas; la Hormona Folículo Estimulante (FSH, del inglés *Follicle Stimulating Hormone*), encargada del proceso de esteroideogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular, y la Hormona Luteinizante (LH, del inglés *Luteinizing Hormone*), que interviene en el proceso de ovulación, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo (Rippe, 2009). En la Figura 3 se esquematizan las interacciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.



**Figura 3.** Interacciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (tomado de Rippe, 2009).

Diversos estímulos sensoriales pueden activar o inhibir la secreción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH, del inglés *Gonadotropin-Releasing Hormone*) (Hopper, 2015). En condiciones de bienestar térmico, dichos estímulos resultan activadores, mientras que en condiciones opuestas, resultan inhibitorios (Gordon, 2004), produciéndose cambios en los patrones de secreción de las hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Jia y col., 2012). Según Aggarwal y Upadhyay (2013), dichos cambios pueden deberse a mecanismos que modifiquen la síntesis o la secreción de GnRH, la capacidad de respuesta de los gonadótropos a las acciones de GnRH o las acciones de retroalimentación de las hormonas gonadales. El cortisol, producido por la corteza adrenal, ha sido reportado como el principal glucocorticoesteroide secretado como respuesta del animal a condiciones de estrés (Arias y col., 2008). Hansen (2009) manifiesta que el incremento en la secreción de

corticoesteroides se ha sugerido como causa de inhibición de la secreción de GnRH, sin embargo, esta inhibición se ha visto en menor grado en vacas con altas concentraciones de estradiol, lo que podría indicar una neutralización del efecto del estrés calórico.

El desarrollo folicular en la hembra bovina se manifiesta en forma de ondas de crecimiento (de 1 a 4 por ciclo estral), donde el folículo preovulatorio se origina a partir de la última. Normalmente, cada onda inicia reclutando una cohorte de folículos antrales, donde sólo uno se seleccionará y seguirá creciendo hasta llegar a ser un folículo dominante (Rippe, 2016). Li y col. (2017) afirman que el desarrollo folicular es uno de los períodos más críticos del ciclo reproductivo que se ve afectado por el estrés calórico.

La hipertermia provoca una reducción en el tamaño de los folículos dominantes de la primera y segunda onda (Badinga y col., 1993) y una atenuación de la dominancia folicular, viéndose reflejado en un aumento del número de folículos de gran tamaño (Wolfenson y col., 1995). Roth y col. (2000) observaron una reducción en la concentración plasmática de inhibina, acompañada de un aumento de la concentración de FSH en el plasma de vacas expuestas a estrés calórico. Esto compromete la selección folicular, debido a un aumento de la duración de las ondas foliculares (Gharibzadeh y col., 2014), y a una reducción del crecimiento y tamaño del folículo dominante (Wolfenson y col., 2000).

De esta forma, en vacas sometidas a estrés calórico, que fueron expuestas a ambientes sin sombra, se observaron folículos dominantes de menor tamaño respecto a las vacas con acceso a sombra. Asimismo, en otro experimento con condiciones controladas de temperatura y humedad, las vacas en condiciones termoneutrales presentaron folículos dominantes de mayor tamaño que los de las vacas sometidas a estrés calórico (revisado por Schüller y col., 2017). Al-Katanani y col. (2002) aseguran que la dominancia incompleta aumenta el crecimiento de folículos subordinados, lo que podría resultar en la ovulación de un folículo envejecido, que contiene ovocitos con competencia reducida. A su vez, se ha informado que ocurre la selección temprana del folículo preovulatorio y extensión de su período de dominancia en vacas expuestas a estrés calórico (Wolfenson y col., 1995), hecho que según Mihm y col. (1994) es de suma importancia, ya que la duración de la dominancia del folículo preovulatorio se asocia negativamente con la tasa de concepción.

La última etapa del desarrollo folicular se caracteriza por la formación de la cavidad antral, en la cual las células de la granulosa se diferencian para formar las capas de granulosa mural y antral, así como las células del cumulus que rodean a los ovocitos y donde las hormonas FSH y LH cumplen un rol fundamental. Se ha indicado que los folículos antrales tempranos son sensibles al estrés por calor, lo que se evidenció por una reducción en la producción de esteroides en folículos preovulatorios y de tamaño mediano (revisado por Roth, 2016). Sin embargo, aún no se han definido con precisión las etapas foliculares susceptibles al estrés calórico (Roth, 2015).

Las alteraciones en el desarrollo folicular se encuentran estrechamente asociadas con cambios en el ambiente endocrino (Roth, 2015). Wolfenson y col. (2000) manifiestan que la reducida dominancia folicular se ve reflejada por una disminución

en la concentración plasmática de estradiol, el cual es sintetizado por las células de la granulosa a partir de precursores de andrógenos producidos por células de la teca (Young y McNeilly, 2010). El estrés calórico provoca una reducción en la capacidad esteroideogénica de los folículos, encontrándose una menor actividad aromatasa de células de la granulosa (Badinga y col., 1993) y una disminución de la concentración de estradiol en el líquido folicular del folículo dominante (Wolfenson y col., 1997).

El descenso del estradiol está asociado a una reducción en el comportamiento estral (Westwood y col., 2002), tanto en su duración como en su intensidad, aumentando la incidencia de anestro y ovulaciones silenciosas, junto con la reducción del número de montas (Gwazdauskas y col., 1981; Wolfenson y col., 1988). En un estudio reciente, donde los animales fueron expuestos a índices elevados de ITH, se observaron signos externos de estro (mucosa vaginal rosada, descarga de mucus transparente y rastros de monta) reducidos, coincidiendo con un folículo dominante de menor tamaño (Schüller y col., 2017).

A su vez la reducción en la concentración plasmática de estradiol puede conducir a una baja oleada preovulatoria de LH en vacas expuestas a estrés calórico (revisado por Roth y Wolfenson, 2016). Se ha observado una supresión de la liberación pulsátil de LH y el pico preovulatorio de LH (Wise y col., 1988; Gilad y col., 1993) lo que según Roth (2015), podría perjudicar los eventos asociados con la maduración y ovulación del ovocito.

Los bajos niveles de estradiol también se asocian a alteraciones en el funcionamiento del cuerpo lúteo (CL) (Wolfenson y col., 2000). La progesterona es otra de las hormonas implicadas en el éxito reproductivo de la vaca, ya que es crítica para los eventos que ocurren desde el desarrollo folicular hasta el mantenimiento de la preñez (Wiltbank y col., 2011). El estudio de los efectos del estrés calórico sobre la función del CL da como resultado variaciones en las concentraciones plasmáticas de progesterona (revisado por Roth, 2015).

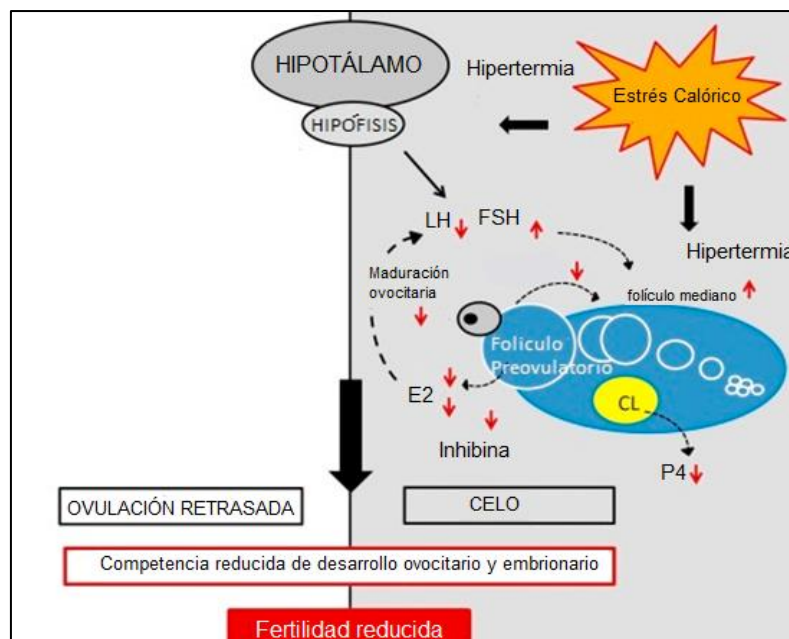
Por ejemplo, estudios *in vitro* de esteroideogénesis folicular en condiciones de hipertermia demostraron un aumento en la secreción de progesterona (Bridges y col., 2005). Asimismo, Paes y col. (2016) registraron un aumento en la secreción de progesterona en COCs madurados *in vitro* en condiciones de choque térmico. Recientemente, en condiciones de campo Schüller y col. (2017) registraron un aumento en la concentración plasmática de progesterona en vacas expuestas a índices altos de ITH. Estos resultados podrían indicar que las altas temperaturas causan una luteinización prematura de los folículos, que se asociaría con la ocurrencia de folículos dominantes persistentes en el ganado (Bridges y col., 2005). A su vez, este hecho se ha asociado con fallas en la luteólisis, debido a una fase luteal extendida con múltiples ondas foliculares dentro del mismo ciclo estral, viéndose comprometida la calidad y competencia de los ovocitos ovulados (Paes y col., 2016).

Por otra parte, estudios que comparan el efecto de la estación en la secreción de progesterona, reportan que la misma es más baja durante el verano, en comparación con la primavera o el invierno (revisado por Roth y Wolfenson, 2016). La exposición estacional crónica al estrés calórico tendría un efecto secundario perjudicial sobre la función folicular, lo que conduce a la formación de un CL

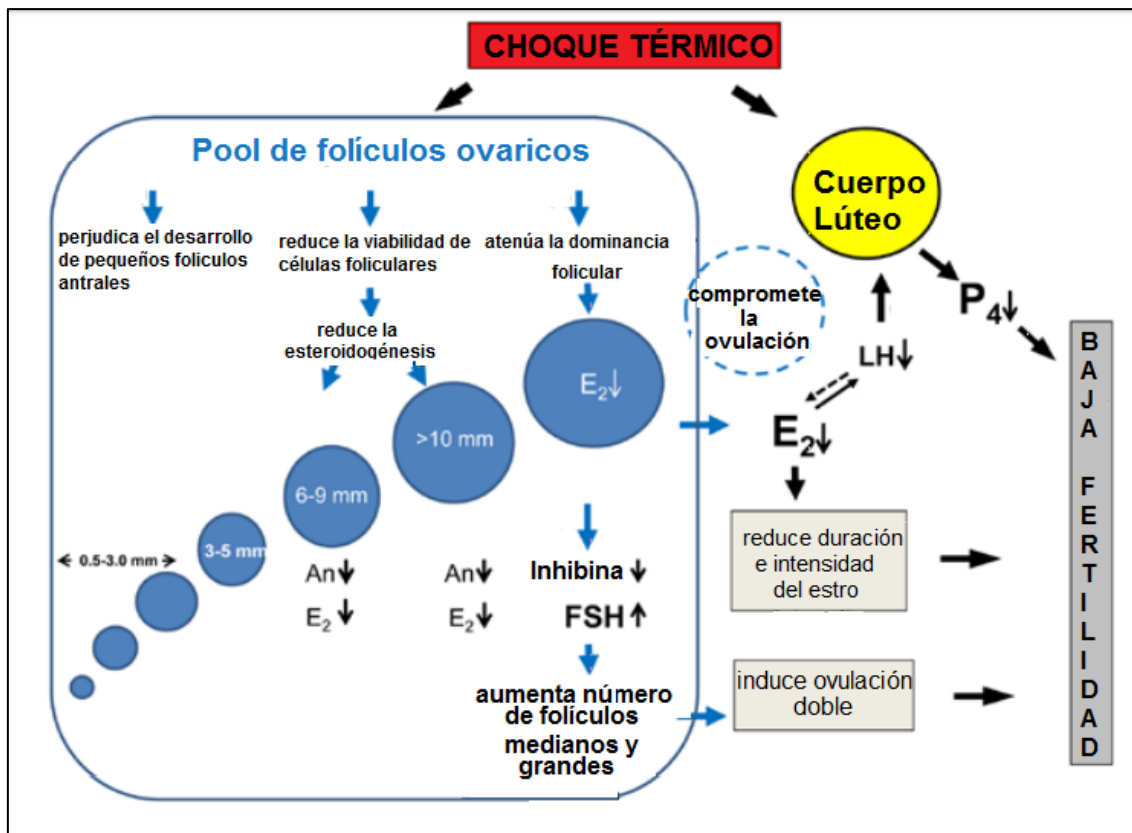
deficiente y una baja concentración de progesterona en plasma después de la ovulación (Wolfenson y col., 2000). Asimismo, menores niveles de progesterona circulante durante el estado de estrés calórico se han asociado con el fracaso de la implantación y la muerte embrionaria temprana en vacas lecheras (Khodaei-Motlagh y col., 2011). En un estudio realizado por Wolfenson y col. (1993) empleando técnicas *in vitro*, fue reportado que células luteales obtenidas de folículos dominantes en el verano producen menos progesterona y expresan menos viabilidad que las obtenidas en invierno.

La concentración plasmática de progesterona no solo depende de su velocidad de producción sino también de la velocidad de su secreción a la circulación, por esta razón se ha hipotetizado que estas variaciones en los resultados de los diferentes experimentos se asocian a diferentes variables fisiológicas y ambientales. Sin embargo, la evidencia indica que la concentración reducida de progesterona se asocia principalmente con el estrés calórico crónico típico del entorno natural del verano (revisado por Roth, 2015).

En las Figuras 4 y 5 se esquematizan los efectos del estrés calórico sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y los cambios en los patrones de las hormonas mencionadas anteriormente, así como los efectos en el desarrollo folicular.



**Figura 4.** Efectos a largo plazo del estrés calórico sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y su participación en la reducción de la fertilidad en la vaca. E2: estradiol; P4: progesterona; CL: cuerpo lúteo (adaptado de Wolfenson y col., 2000).



**Figura 5.** Efectos directos e indirectos del choque térmico en el grupo de folículos ováricos y el cuerpo lúteo en asociación con alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (adaptado de Roth, 2015).

### III. b. Efectos sobre la maduración, calidad y competencia ovocitaria

El microambiente en el cual el ovocito crece y se desarrolla tiene gran influencia en su posterior viabilidad, siendo el choque térmico un factor determinante de dicho ambiente (De Castro e Paula y Hansen, 2008). Debido a que los ovocitos de mamíferos adquieren su potencial de desarrollo de manera gradual durante el desarrollo folicular (Roth, 2015), las alteraciones que genera el estrés calórico sobre el mismo se ven directamente reflejadas en la calidad y capacidad de desarrollo del ovocito (revisado por Abdelatty y col., 2018). En este sentido el estrés calórico no solo reduce la fertilidad de la hembra bovina al afectar la secreción hormonal (Wolfenson y col., 2000), sino que también lo hace al provocar daños al propio ovocito (Barakat y col., 2016).

En casi todos los mamíferos el ovocito, dentro del folículo preovulatorio, se encuentra rodeado por capas estrechamente unidas de células del cumulus, formando así el COCs (Yokoo y Sato, 2004). Estas células son esenciales en la adquisición de la capacidad de desarrollo de los ovocitos, estimulando la síntesis de glutatión, principal antioxidante celular, protegiendo contra el daño oxidativo durante la MIV (Balboula y col., 2013). A su vez cumplen un rol vital al nutrir al ovocito en su maduración desde la etapa de vesícula germinal (VG), en la cual se encuentra detenido en la profase de la primera división meiótica, hasta la etapa de metafase II, facilitando el intercambio de señales nutritivas y químicas (Tanghe y col., 2002).

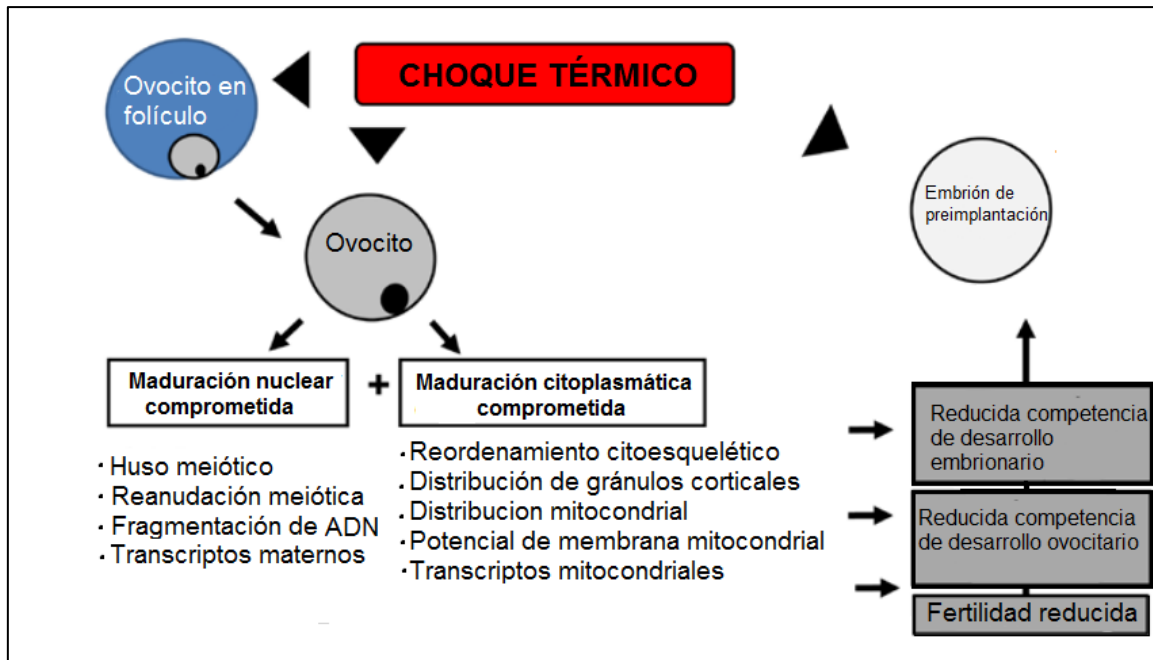


La maduración ovocitaria es un largo proceso que implica eventos a nivel nuclear y citoplasmático, donde el ovocito adquiere la capacidad de desarrollo hasta alcanzar la activación del genoma embrionario (entre el tercer y cuarto ciclo de división mitótica). La maduración nuclear consiste en la segregación cromosómica, mientras que la maduración citoplasmática implica la reorganización de los organelos y el almacenamiento de ARNm, proteínas y factores de transcripción que actúan en el proceso de maduración general, la fecundación y la embriogénesis temprana (Ferreira y col., 2009).

Según Hansen (2013), el ovocito bovino es sensible al choque térmico durante su periodo de maduración, específicamente cuando completa su maduración citoplasmática y nuclear (De Castro e Paula y Hansen, 2008). Aunque aun no se comprenden por completo los mecanismos por los cuales la hipertermia afecta la calidad y capacidad de desarrollo ovocitario, se ha observado que el choque térmico durante la maduración genera alteraciones a nivel de núcleo y citoplasma (Roth y Wolfenson, 2016), así como apoptosis de las células del cumulus, viéndose comprometida la supervivencia del ovocito (Ahmed y col., 2017).

Se ha demostrado que la exposición al choque térmico a 41°C *in vitro* de COCs bovinos durante la etapa de VG (Lima y col., 2016) reduce la tasa de maduración (Maya-Soriano y col., 2012), así como la tasa de desarrollo embrionario (Lawrence y col., 2004; Roth y Hansen, 2004a), viéndose afectadas las tasas de división y proporción de ovocitos que llegan a etapa de blastocistos (Edwards y col., 1997). Recientemente, Ahmed y col. (2017), evaluaron la maduración de COCs frente a choque térmico a 41°C tomando como referencia la medida de expansión del cumulus, observando una reducción significativa de este parámetro. Báez y col. (2018a) reportaron que, a nivel estructural, se observan un mayor número de poros en la zona pelúcida en ovocitos expuestos a 41°C por 22 h. A su vez, Báez y col. (2018b), observaron que la exposición de ovocitos bovinos por 12 h a 41°C durante el MIV no bloquea el desarrollo pero sí reduce la tasa de desarrollo de blastocistos.

Según Roth (2015) estudios *in vitro* indican que el choque térmico (40 °C a 41.5 °C) induce alteraciones nucleares y citoplasmáticas (Figura 6 y Tabla I), eventos asociados con la maduración ovocitaria, los cuales probablemente subyacen a la menor proporción de ovocitos que tienen una fecundación exitosa y se convierten en blastocistos.



**Figura 6.** Efectos directos e indirectos del choque térmico sobre la capacidad de desarrollo en ovocitos (adaptado de Roth, 2015).

**Tabla I.** Alteraciones inducidas por la elevada temperatura sobre ovocitos bovinos en estadios de vesícula germinal y madurados *in vitro*\*

Compartimento celular	Estructura	Alteraciones	
		Estadio de VG	Madurados <i>in vitro</i>
Citoplasma	Filamentos de actina	----	Disminución de polimerización pericelular y transzonal
	Microtúbulos	----	Desorganización
	Gránulos corticales	Aumento de translocación al oolema	Aumento de translocación al oolema
	Mitocondria	Actividad reducida	Actividad reducida
Núcleo	Proteínas	Disminución de síntesis total	Disminución de síntesis total
	Huso meiótico	Reducción de maduración meiótica	Reducción de maduración meiótica
		----	Reducción del tamaño del huso
	ADN	Aumento de fragmentación	Aumento de fragmentación
	ARN	No se afecta la cantidad de ARN total	No se afecta la cantidad de ARN mensajero
Membrana	Lípidos	Aumento de ácidos grasos saturados	----
		----	Translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática

\* Adaptado de Paula-Lopes y col. (2012).

Estudios de Wang y col. (2009) indican que la maduración citoplasmática del ovocito es más susceptible al choque térmico que la maduración nuclear, siendo los componentes del citoplasma los que determinan la capacidad de desarrollo del ovocito antes de la implantación. La maduración citoplasmática se caracteriza por

una redistribución de los organelos (gránulos corticales, mitocondrias y retículo endoplásmico), que ocurre a través de la acción coordinada de los microfilamentos y microtúbulos del citoesqueleto (Ferreira y col., 2009).

A nivel ultraestructural, se ha observado que el choque térmico genera alteraciones en estos elementos, lo que conduce a cambios en el huso meiótico y a una disminución en el número de ovocitos que progresan a metafase II (Roth y Hansen, 2005). Roth y Hansen (2005) observaron que la mayoría de los ovocitos expuestos a choque térmico (40 – 41,5 °C) durante la MIV no lograron madurar, deteniéndose en la transición de metafase I a metafase II. Del mismo modo la exposición de ovocitos en etapa de VG a 41 °C redujo la proporción de ovocitos que progresaron a MII y comprometió el desarrollo del blastocisto (Payton y col., 2004). A su vez, el choque térmico afecta la translocación los gránulos corticales; se ha observado que los ovocitos estresados presentan distribución de gránulos corticales de tipo III lo que indica una aceleración de la maduración citoplásmica (Edwards y col., 2005).

Las alteraciones de los elementos del citoesqueleto también afectan a otros organelos (en su transporte intracelular) como las mitocondrias, que son esenciales para la capacidad de desarrollo de los ovocitos por estar involucradas en el metabolismo celular, homeostasis y apoptosis (revisado por Abdelatty y col., 2018). Se han observado tanto alteraciones estructurales como funcionales en las mitocondrias de ovocitos frente al choque térmico. Por ejemplo, Gendelman y Roth (2012a) reportaron diferencias en la forma y distribución de las mitocondrias en ovocitos obtenidos en verano, respecto a los de invierno. Por otra parte, Nabenishi y col. (2012), observaron una disminución en la permeabilidad de la membrana mitocondrial de ovocitos expuestos a choque térmico; mientras que Soto y Smith (2009) reportan un aumento de la proporción de ovocitos con bajo potencial de membrana y cromatina positiva al método TUNEL (del inglés *Terminal dUTP Nick End Labeling* o marcado del extremo libre por dUTP terminal), que revela daño del ADN.

Es sabido que las mitocondrias maternas dentro del ovocito son la principal fuente de energía para el crecimiento embrionario, por lo tanto, la alteración en la cadena de transporte de electrones podría conducir a bajos niveles de ATP y fallas en el desarrollo embrionario. A su vez, la capacidad mitocondrial de producción de ATP requiere la actividad de 5 complejos enzimáticos localizados en la membrana mitocondrial interna y determinados por la interacción entre genes nucleares y mitocondriales (revisado por Roth, 2015).

Las alteraciones en la función mitocondrial inducidas por choque térmico también se asocian con la activación de la vía mitocondrial (vía intrínseca) de la apoptosis en el ovocito, a través del aumento de la actividad de las caspasas del Grupo II (caspasas 2, 3 y 7), lo que conduce a fragmentación nuclear, observándose un aumento en el porcentaje de ovocitos TUNEL-positivos (Roth y Hansen, 2004a). Sin embargo, no está claro si las alteraciones en el citoesqueleto causadas por el choque térmico son desencadenantes de la apoptosis o bien, la disrupción de la estructura citoesquelética podría ser resultado de la activación de caspasas asociada con la apoptosis (Roth y Hansen, 2005).



Además de la activación de las caspasas, también se han observado modificaciones en la expresión de genes pro y antiapoptóticos por hipertermia. Ferreira y col. (2016) documentaron una activación de los genes apoptóticos *BAX* e *ITM2B* durante el verano en vacas repetidoras. Por su parte, Donovan y Cotter (2004) reportan alteraciones en la expresión de los genes antiapoptóticos *Bcl2* y *Bcl-xL*, que protegen la integridad de la membrana mitocondrial externa. En este sentido, la activación de la apoptosis constituye uno de los mecanismos asociados a la función mitocondrial por el cual el estrés calórico podría afectar al ovocito (revisado por Roth, 2016), ya que la integridad de la membrana de estos organelos es un factor que determina la progresión hacia la apoptosis (Soto y Smith, 2009).

Por otra parte, se ha demostrado que el choque térmico produce un aumento significativo de las proteínas del choque térmico (HSP, del inglés *Heat Stress Proteins*), tanto en las células somáticas como en las células foliculares (revisado por Li y col., 2017). La principal HSP corresponde a la proteína de 70 kDa (HSP70), mientras que la HSP90 es otra de las HSP que tiene un papel vital en el ciclo celular, la meiosis y la citocinesis cuando las células están expuestas a estrés ambiental (Alemu y col., 2018).

De acuerdo con Roth (2015), las alteraciones inducidas por el calor antes mencionadas en el funcionamiento mitocondrial también están asociadas con el estrés oxidativo. El estrés oxidativo está mediado por especies oxígeno reactivas (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) y produce un desequilibrio del potencial redox intracelular. Las ROS están involucradas en una amplia gama de funciones fisiológicas reproductivas, incluidas la maduración ovocitaria, la esteroidogénesis y la función del cuerpo lúteo, sin embargo, se ha probado que pueden causar daños en el ADN e inducir la apoptosis en el ovocito y el embrión en etapas tempranas del desarrollo (revisado por Deleuze y Goudet, 2010).

Aunque los efectos del estrés oxidativo se han estudiado ampliamente en el embrión bovino (Hansen, 2013), existe menos información sobre sus efectos a nivel de los ovocitos (Roth, 2015). Se ha reportado un aumento de las ROS tanto en ovocitos de vacas con temperatura corporal elevada, como en las células del cumulus de COCs bovinos expuestos *in vitro* a temperaturas superiores a 40,5 °C, viéndose comprometida la reanudación de la meiosis (Nabenishi y col., 2012). Por su parte, Van Blerkom y col. (1997) detectaron un aumento de defectos citoplasmáticos y segregación cromosómica anormal relacionados con niveles altos de ROS alrededor del folículo.

### *III.c. Efectos sobre el desarrollo embrionario*

Como se mencionó anteriormente, los eventos asociados con el crecimiento y maduración de los ovocitos son susceptibles a la alteración por el estrés calórico. De este modo, la hipertermia no solo compromete la capacidad del ovocito para atravesar un proceso adecuado de fecundación, sino también su capacidad para un adecuado desarrollo embrionario previo a la implantación (Roth y col., 2001; Roth y Hansen, 2004a). En este sentido, el estrés calórico se ve asociado a bajas tasas de preñez y altas pérdidas embrionarias tanto en el caso de embriones producidos *in vivo* (Ealy y col., 1993) como *in vitro* (Al-Katanani y col., 2002).

Se ha sugerido que el embrión bovino se vuelve más resistente al estrés calórico materno a medida que avanza la gestación. Por ejemplo, Ealy y col. (1993) reportan que la exposición a estrés calórico de vacas superovuladas a partir del día 1 luego del estro redujo el desarrollo y la viabilidad de los embriones al día 8, no ocurriendo lo mismo cuando el estrés calórico se impuso a partir del día 3, 5 o 7.

En vacas receptoras expuestas a estrés por calor, se ha observado una reducción en la proporción de embriones implantados en las primeras etapas de desarrollo que avanzan a la etapa de blastocisto al día 8, sin embargo, esto no se observó cuando se implantaron embriones en etapas más avanzadas (revisado por Abdelatty y col., 2018). Por otra parte, estudios *in vitro* también han reportado que el choque térmico reduce la supervivencia del embrión en las primeras etapas de su desarrollo (Al-Katanani y col., 2002), observándose que el estadio de mórula es más resistente a altas temperaturas en cultivo que el embrión de dos células (Edwards y Hansen, 1997).

Silva y col. (2013) manifiestan que el estrés calórico también activa la vía apoptótica en el embrión en sus primeras etapas, alterando la expresión de genes asociados a la supervivencia embrionaria, como el gen *CDX2*, importante para la implantación y desarrollo placentario. Asimismo, de acuerdo Sakatani y col. (2004) el estrés calórico también afecta el desarrollo de embriones pre-implantacionales con mayor producción de ROS, lo que podría estar relacionado con la imposibilidad del embrión de sintetizar glutatión (revisado por Abdelatty y col., 2018). Por otra parte, en blastocistos originados a partir de ovocitos térmicamente estresados, se ha registrado una menor abundancia de transcriptos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular (revisado por Rodrigues y Paula-Lopes, 2018).

Existen diferencias en cuanto a la respuesta al estrés por calor entre las razas bovinas. Se ha sugerido que las razas europeas (*Bos taurus*) son particularmente más sensibles que las razas cebuinas (*Bos indicus*), ya que estudios *in vitro* muestran que los embriones de *Bos indicus* expuestos a choque térmico fueron más capaces de sobrevivir, al evaluar tasa de blastocisto, en comparación con los embriones de *Bos taurus* (Al-Katanani y col., 2002).

Por su parte, Paula-Lopes y col. (2003a) compararon la respuesta de embriones de vacas Holstein, Angus y Brahman expuestos a 41 °C por 6 h, reportando que el porcentaje de blastocistos registrado en Brahman fue significativamente mayor. Asimismo, Satrapa y col. (2011), manifiestan que los ovocitos de vacas de la raza Nelore tuvieron mayores rendimientos de blastocistos que otras razas taurinas luego de ser expuestos a 41 °C por 12 h. Los embriones de la raza Romosinuano (*Bos indicus*) resultan también ser más resistentes al estrés calórico que las razas taurinas (Hernández y col., 2004). Silva y col. (2013) postulan que esta mayor resistencia podría deberse a una expresión incrementada de genes protectores al choque térmico, que resulta en una disminución de la apoptosis y un aumento en las tasas de supervivencia embrionaria.

#### IV. Agentes reguladores de termorresistencia en ovocitos bovinos *in vitro*

Para poder desarrollar estrategias de mitigación de los efectos deletéreos del estrés calórico en los ovocitos bovinos, es necesario conocer los daños que ocurren frente

al aumento de temperatura, así como los mecanismos y factores de termoprotección celular que se activan (Rodrigues y Paula-Lopes, 2018). La identificación de moléculas termoprotectoras puede ser una alternativa para modular los efectos de la temperatura elevada en la función reproductiva (Paula-Lopes y col., 2012). En la Tabla II se resumen los efectos conocidos actualmente del choque térmico en ovocitos bovinos, así como los agentes reguladores de termorresistencia identificados *in vitro*.

**Tabla II.** Efectos del choque térmico y agentes reguladores de termorresistencia en ovocitos bovinos durante la maduración *in vitro*

Mecanismo	Efecto	Medida de mitigación	Referencia
VIA APOPTOTICA	Aumento de Caspasa 3 y Catepsina B Degradación mitocondrial	Inhibidor E-64	Bettegowda y col., 2008 Balboula y col., 2013
	Arresto en M1 Modificación de actina cortical Activación de caspasas grupo 2 Fragmentación de ADN	IGF-I Inhibidor Z-DEVD fmk	Rodrigues y col., 2016 Ispada y col., 2011 Roth Hansen y, 2004a
	Pro apoptosis por ceramida Alteración mitocondrial Aumento de genes apoptóticos	S1P BH4 y BIP1 Curcaciclina A y B (ovinos)	Roth y Hansen, 2004b Soto y Smith, 2009 Barakat y col., 2016
VIA OXIDATIVA	Aumento de radicales libres Peroxidación de lípidos	Retinol Astaxantina	Livingston y col., 2004 Lawrence y col., 2004 Ispada y col., 2018
	Aumento de especies reactivas del oxígeno	Curcaciclina A y B (ovinos) Astaxantina	Barakat y col., 2016 Ispada y col., 2018

#### IV.a. Agentes reguladores frente al mecanismo apoptótico inducido por el choque térmico

De acuerdo a lo expuesto previamente, la vía apoptótica es uno de los mecanismos que media el daño a los ovocitos por el estrés calórico; por lo tanto, la inhibición de la apoptosis a través de factores antiapoptóticos es, probablemente, una herramienta útil para disminuir el deterioro de la competencia ovocitaria debido al choque térmico (Jousan y Hansen, 2004).

Estudios de Paula-Lopes y Hansen (2002) y de Roth y Hansen (2004a) han demostrado que la respuesta apoptótica dependiente de caspasas del Grupo II activada en ovocitos bovinos frente al choque térmico puede evitarse si se agrega el inhibidor de caspasas z-DEVD-fmk al medio de maduración. Estos autores observaron que la adición de 200 nM de z-DEVD-fmk al medio MIV de COCs bovinos e incubados a 41°C bloqueó los efectos del choque térmico en términos de tasa de división y porcentaje de ovocitos y embriones que alcanzan la etapa de blastocisto.

El choque térmico también puede inducir apoptosis activando la vía de la esfingomielina. Dicha vía implica la hidrólisis de la esfingomielina de la membrana generando ceramida como segundo mensajero. Posteriormente, la ceramida es metabolizada a esfingosina-1-fosfato (S1P). Mientras que la ceramida está asociada con la detención del crecimiento y la apoptosis, la S1P se asocia con la proliferación y la supervivencia celular (Mathias y col., 1998; Ruvolo, 2001). Roth y Hansen (2004b) demostraron que la adición de S1P al medio de maduración de ovocitos bovinos bloquea los efectos pro-apoptóticos de la ceramida.

Como ya ha sido indicado, las mitocondrias también tienen un papel importante en la integración y transmisión de señales de muerte celular mediadas por las proteínas de la familia Bcl-2. Se ha demostrado que los péptidos antiapoptóticos BH4, derivado de Bcl-xL, y el péptido inhibidor de Bax (BIP), suprimen la lesión y los cambios mitocondriales por choque térmico en los ovocitos (Soto y Smith, 2009), constituyendo otras de las moléculas mediante las cuales se obtienen una reducción de los eventos de tipo apoptótico (Barakat y col., 2016).

Por otro lado, Balboula y col. (2013) registraron altas actividades y expresiones de catepsina B y caspasa 3 junto a un aumento significativo en el número de células TUNEL-positivas luego de la MIV de COCs bovinos frente a choque térmico. Se cree que esto es debido a que la catepsina B, una proteasa lisosómica, provoca la degradación de la membrana mitocondrial y la posterior translocación de componentes inductores de apoptosis de la mitocondria al citosol, con la consecuente activación de caspasa 3, la cual conduce a la finalización de la apoptosis (revisado por Balboula y col., 2013). Bettegowda y col. (2008) demostraron que los COCs bovinos mejoran su capacidad de desarrollo al ser madurados *in vitro* en un medio suplementado con E-64, un inhibidor de la catepsina B, posiblemente mediante la regulación de la vía apoptótica. Balboula y col. (2013) demostraron que la adición de E-64 al medio de MIV de COCs bovinos a altas temperaturas mejoró significativamente el posterior desarrollo y la calidad de los embriones producidos.

El IGF-I también se ha sugerido como un potencial modulador de termorresistencia en ovocitos bovinos, ya que tanto las células del cumulus como los ovocitos expresan ARNm del receptor de IGF-I (Satrapa y col., 2013). Este factor ejerce acciones autocrinas, paracrinas y endocrinas en el metabolismo, proliferación, crecimiento y diferenciación celular (revisado por Paula-Lopes y col., 2012). Se ha demostrado que la adición de IGF-I (100 ng/mL) al medio de maduración de ovocitos bovinos expuestos a choque térmico previno la apoptosis y revirtió los efectos perjudiciales sobre la actividad mitocondrial de los ovocitos (Ispada y col., 2011; Rodrigues y col., 2016). Asimismo, concentraciones menores de IGF-I (25 ng/ml) también han demostrado tener un efecto termoprotector sobre los ovocitos en estado de VG impactados por el choque térmico (Lima y col., 2016), así como sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos en la etapa del blastocisto (Rodrigues y col., 2016).

Son conocidas otras moléculas antiapoptóticas, como los péptidos curcuciclina A y B. La primera tiene actividad inhibitoria sobre la proliferación de células T humanas y el sistema de complemento de vía clásica, mientras que la segunda potencia la actividad aromatasa de la ciclofilina (revisado por Barakat y col., 2016). Se ha

observado que la adición de estos péptidos al medio de maduración de ovocitos ovinos expuestos a choque térmico tuvo como resultado una menor expresión de genes apoptóticos (Bax, Bcl-2, Caspase 3, P53 y C-myc) y una menor generación de ROS (Barakat y col., 2016).

#### *IV.b. Agentes reguladores frente al mecanismo oxidativo inducido por choque térmico*

El estrés oxidativo inducido por la hipertermia es uno de los procesos por los cuales el choque térmico interrumpe el desarrollo embrionario. El trabajo de Sakatani y col. (2007) bajo condiciones *in vitro* y a altas temperaturas (41,5 °C), demostró que la adición de antioxidantes naturales, como las antocianinas, mejora el desarrollo y el estado redox intracelular de embriones bovinos preimplantados, al reducir el estrés oxidativo derivado del choque térmico. Los estudios de De Castro e Paula y Hansen (2008) demostraron que los efectos deletéreos provocados por el choque térmico en los embriones bovinos pueden ser prevenidos mediante el uso *in vitro* del antioxidante dithiothreitol (DTT). Los efectos protectores del DTT como antioxidante fueron más pronunciados en etapas posteriores del desarrollo.

Los efectos del estrés oxidativo sobre el ovocito han sido menos estudiados. Nabenishi y col. (2012) manifiestan que la alta temperatura corporal en el animal incrementa las ROS a nivel intracelular. Lawrence y col. (2004) evidenciaron que la adición de retinol al medio de maduración mejoró la capacidad de desarrollo de ovocitos estresados hasta la etapa de blastocito. Se cree que los retinoides pueden actuar como antioxidantes al eliminar radicales libres y prevenir la peroxidación de lípidos (Lawrence y col., 2004). A su vez, podrían modular la expresión de factores de crecimiento y otros genes del desarrollo (Livingston y col., 2004). Estos factores actuarían mediante receptores nucleares y proteínas de unión al retinol localizados predominantemente en el interior de las células del cumulus que rodean al ovocito (Lawrence y col., 2004).

Otro antioxidante estudiado es la astaxantina, una molécula soluble en lípidos que se encuentra en ciertos animales marinos (Miki y col., 1982; citado por Ispada y col., 2018). Se ha demostrado que la misma evita la peroxidación lipídica en varios sistemas celulares (Namekawa y col., 2010), actuando como un potente interceptor de radicales peroxilo y alcoxilo (Panassenko y col., 2000). Do y col. (2015), demostraron un efecto protector de la astaxantina sobre ovocitos porcinos sometidos a choque térmico. Recientemente, Ispada y col. (2018) demostraron que la astaxantina ejerce un efecto termoprotector sobre los ovocitos bovinos estresados por calor, al rescatar la competencia de desarrollo mediante la disminución de los niveles de ROS y un aumento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa.

#### *IV.c. Otros posibles agentes moduladores frente al choque térmico:*

Según la literatura han sido implementadas otras moléculas en los modelos de estudio tanto *in vivo* como *in vitro*, durante la maduración y fecundación de ovocitos y el desarrollo embrionario en bovinos y otras especies, sin embargo, aún no ha sido estudiada específicamente el efecto de dichas moléculas como agentes termoprotectores frente a choque térmico en ovocitos bovinos.



Por ejemplo, se ha reportado que la adición de reguladores del metabolismo lipídico a los medios de cultivo de embriones bovinos, influye en la expresión de genes que regulan dicho metabolismo, mejorando la capacidad de desarrollo y la calidad de los embriones (Sprícigo y col., 2017). La L-carnitina (LC) es uno de estos reguladores, estando involucrada en la función mitocondrial y el metabolismo lipídico a través de su participación en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y el transporte de los mismos a las mitocondrias. También se ha asociado con la regulación de funciones celulares vitales como la apoptosis (Knitlova y col., 2017).

Estudios de Yamada y col. (2006) indican que el tratamiento con acetil-L-carnitina durante la MIV de ovocitos bovinos mejora su desarrollo posterior a la etapa de blastocito y aumenta la frecuencia de ovocitos que exhiben una reubicación extensa de mitocondrias activas al interior del citoplasma ovocitario. Más recientemente, Knitlova y col. (2017) estudiaron el impacto de la suplementación con LC durante la MIV en ovocitos bovinos con diferentes competencias meióticas y de desarrollo, registrando que los ovocitos con baja competencia mejoraron su desarrollo embrionario, y que los más competentes tuvieron una mayor rapidez en la formación de blastocistos.

Takahashi y col. (2013) estudiaron los efectos de la LC sobre el desarrollo *in vitro* y la supervivencia de congelación de embriones bovinos, así como los efectos sobre la actividad metabólica, las ROS y la apoptosis. La suplementación de 1,5 mM o 3 mM de LC en la MIV resultó en un aumento de la tasa de supervivencia de los blastocistos después de la congelación lenta, así como aumento de los niveles de ATP y reducción de los niveles de ROS en embriones de dos células. Asimismo, también se evidenció la expresión de los genes *ATP6* y *COX1*, relacionados con el metabolismo de los blastocistos; sin embargo, no se registraron efectos sobre las células apoptóticas.

Por otra parte, es sabido que bajo condiciones *in vitro* las concentraciones de oxígeno resultan más elevadas que los entornos *in vivo*, llevando a un aumento del nivel de ROS (Luvoni y col., 1996) lo que se considera la principal causa de deterioro celular y pérdida de funciones celulares (Chwa y col., 2006). En este sentido, Khatti y col. (2017) afirman que la vitamina E (vit E) y el Selenio (Se) son potentes antioxidantes y eliminadores de radicales libres. Se ha demostrado que el aumento de la energía de la dieta combinada con la suplementación de vit E y Se mitiga el estrés oxidativo en vacas mestizas (Khatti y col., 2017).

Es sabido que en cultivo celular el Se, en forma de selenito sódico, protege a las células del daño oxidativo al reducir la producción de radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica (revisado por Córdova y col., 2010). El Se, en forma de nanopartícula, también puede actuar como un excelente antioxidante y corregir los niveles reducidos de glutatión, catalasa y superóxido dismutasa (Peng y col., 2007). En este sentido, Abdel-Halim y Helmy (2017) demostraron que la adición de Se (en forma de nanopartícula) durante la MIV, aumentó significativamente la velocidad de maduración, disminuyó el daño del ADN de las células del cumulus y aumentó el contenido de glutatión intracelular.

Más recientemente, Yao y col. (2018) investigaron los efectos del Se sobre la proliferación y la esteroidogénesis en células luteinizadas de la granulosa de cabra,

comprobando que una cantidad adecuada de Se podría influir indirectamente en la foliculogénesis o el desarrollo de folículos ováricos mediante la regulación de la proliferación de las células luteinizantes de la granulosa y la esteroidogénesis. Por su parte, Xiong y col. (2018) demostraron que la suplementación con Se influye en las concentraciones intracelulares de glutatión peroxidasa (GSH-Px) y la expresión génica durante la MIV de ovocitos de yak (*Bos grunniens*) beneficiando el desarrollo y la calidad de los blastocitos. El Se puede afectar la proliferación *in vitro* y la apoptosis de las células de Leydig a través de la regulación del estrés oxidativo y los genes relacionados con la apoptosis (Shi y col., 2017). La suplementación de la MIV con selenito sódico también mejora la competencia de desarrollo ovocitario al aumentar el número de copias de ADN mitocondrial de los ovocitos y disminuir el estrés oxidativo (Ghorbanmehr y col., 2018).

En un estudio de Segerson y col. (1977) en ganado de carne, se evaluó el efecto de la suplementación combinada con Se y vit E sobre la fecundación de los ovocitos, mantenido una nutrición adecuada o inadecuada. Los resultados mostraron tasas de fecundación de hasta un 100% de COCs de vacas provenientes de un nivel adecuado de nutrición y que recibieron Se y vit E. Asimismo, se ha informado que la administración de vit E o la combinación de vit E y Se (Aréchiga y col., 1994; Abedelahi y col., 2010) reduce la incidencia de trastornos reproductivos posparto, tales como membranas fetales retenidas, metritis y ovarios quísticos (Aréchiga y col., 1994).

Por su parte, Khalil y col. (2013) manifiestan que la suplementación de vit E (100  $\mu\text{M}$ ) y GSH-Px (1  $\mu\text{M}$ ), individuales o combinados, contrarresta los efectos inhibitorios del ácido linoleico sobre la maduración de los ovocitos y su posterior desarrollo. A su vez, Córdova y col. (2010), demostraron que la adición de Se en combinación con otras moléculas (insulina, transferrina y ácido ascórbico) durante las primeras 12 h de MIV mejora la maduración del citoplasma y la capacidad de desarrollo de los embriones producidos a partir de ovocitos de terneras prepúberes.

Estudios en porcinos han indicado que la calidad de los blastocistos de embriones de fecundación *in vitro* y de embriones obtenidos a partir de transferencia nuclear de células somáticas mejoró cuando los medios de cultivo de embriones se suplementaron con vit E (Jeong y col., 2006). Natarajan y col. (2010) demostraron que la suplementación de 200  $\mu\text{M}$  de vit E al medio de cultivo embrionario, seguido del cultivo bajo concentraciones de oxígeno del 20%, podría mejorar el desarrollo *in vitro* de los embriones ovinos hasta la etapa de blastocisto. Los estudios en bovinos sugieren que el cultivo de embriones con vit E resulta en un mayor número de embriones en etapa de blastocisto temprano y expandido, en comparación con los que se cultivaron sin suplementación (Olson y Seidel, 2000).

Otra molécula estudiada es la cisteamina, un compuesto de tior de bajo peso molecular, que puede promover un aumento en el contenido de glutatión, el cual representa un importante sistema antioxidante que protege las células contra los efectos nocivos del estrés oxidativo captando las ROS (revisado por Deleuze y Goudet, 2010).

La suplementación del medio de MIV con cisteamina mejora la formación del pronúcleo luego de la fecundación, así como las velocidades de división y el

desarrollo embrionario posterior, lo que sugiere un efecto beneficioso de dicho compuesto sobre la maduración citoplásmica y la competencia del ovocito (revisado por Deleuze y Goudet, 2010). Es sabido que durante la producción *in vitro* de embriones, los ovocitos y embriones están expuestos a un ambiente carente de los sistemas de protección y tienden a experimentar mayor estrés oxidativo cuando la producción de radicales libres excede a la capacidad antioxidante (revisado por García-Díaz y col., 2013). En este sentido, Merton y col. (2013) reportaron que la suplementación con cisteamina durante la MIV mejora significativamente la eficacia y efectividad de un programa *ovum pick up* (OPU) y producción *in vitro* (PIV).

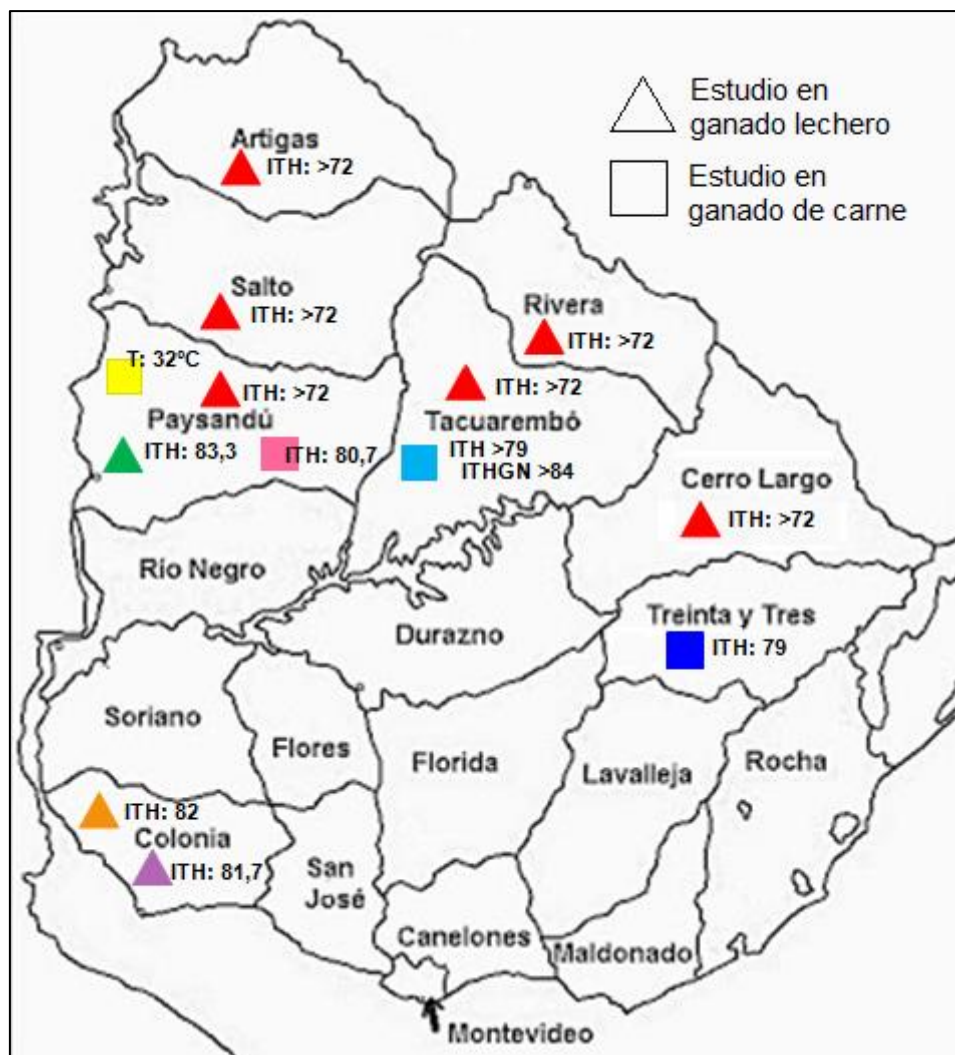
#### V. Perspectivas futuras para el estudio de estrés calórico en bovinos en el Uruguay.

El calentamiento global y el crecimiento acelerado de las poblaciones marcan la pauta de generar estrategias para gestionar la productividad y la reproducibilidad del ganado (Abdelatty y col., 2018). Considerando el efecto negativo de las altas temperaturas sobre la fertilidad del rodeo de cría, se hace necesario estudiar las condiciones climáticas predominantes durante el periodo de entore del Uruguay.

Si bien existen estudios sobre estrés calórico en bovinos en diferentes departamentos (Figura 7), el efecto negativo de este en la fertilidad es un problema aún poco explorado en nuestro país. El estudio de Rovira (2012) indica que existen condiciones ambientales para que se manifieste el estrés calórico puntual y de corta duración en animales en pastoreo en las región este del país. Del mismo modo, el estudio de Cruz y Saravia (2008) en la región norte, indica que el ambiente atmosférico puede ser una limitante productiva para los rodeos.

En el norte del Uruguay los veranos presentan una alta temperatura y humedad relativa atmosférica (Batista y col., 2013) hecho que probablemente haga que en el riesgo de estrés calórico sea aún mayor. Situación distinta a la encontrada en las zonas costeras, donde la cercanía del mar y su influencia en el clima, ayudan a disminuir el riesgo de estrés calórico (Rovira, 2012). Este último autor manifiesta que es posible extrapolar los datos obtenidos de las regiones del este del país, aunque sería interesante contar con datos reales de la región norte como los arrojados recientemente por el estudio de Santa Cruz y col. (2018).





**Figura 7.** Departamentos del Uruguay donde se han realizado estudios sobre estrés calórico en bovinos durante el verano. Cruz y Saravia, 2008 (rojo); Saravia, 2009 (verde); Rovira, 2012 (azul); Beretta y col., 2013 (rosa); Baraibar y Piazza, 2014 (amarillo); Abraham y Collazo, 2015 (naranja); Capó y Senosiain, 2015 (violeta); Santa Cruz y col., 2018 (celeste). Valores máximos de ITH encontrados. \*ITHGN: índice de temperatura y humedad basada en el globo negro.

En nuestro país, los servicios en la hembra bovina para carne, ya sea por entore o inseminación artificial, son programados en los meses de verano. Por este motivo se deben implementar estrategias para generar información respecto a los efectos de la variabilidad del clima en esta época del año y sus posibles medidas de mitigación. La recopilación de dicha información debe estar encabezada por la determinación del ITH junto con la de radiación solar y la velocidad del viento, para así poder obtener una visión más ajustada del riesgo del estrés calórico (Mader y col., 2006); acompañado de la observación directa y medición de variables de respuesta en el propio animal.

La principal utilidad de los indicadores ambientales, además de su fácil interpretación, radica en que se pueden prever con antelación a través de los pronósticos del tiempo lo que brinda una ventana de acción para tomar medidas preventivas ante la inminencia de pronósticos de olas de calor o situaciones de riesgo de estrés calórico (Rovira, 2012). Además de la validación local del ITH,

conocer los efectos sobre la capacidad reproductiva de nuestros rodeos permitiría establecer recomendaciones de manejo e implementar sistemas de advertencia a fin de disminuir los efectos adversos del calor (Cruz y Saravia, 2008).

Con respecto a la medición de variables en el propio animal, el ritmo circadiano de la temperatura vaginal y la tasa de concepción en la hembra son parámetros útiles que pueden evaluarse y relacionarse con el ITH como en el estudio de Nabenishi y col. (2011b). A su vez, las temperaturas vaginales que presenta la vaca expuesta a valores altos de ITH pueden ser utilizadas y aplicadas en los modelos *in vitro*, a fin de evaluar de una manera fácil y efectiva el impacto del choque térmico directamente en los ovocitos (Nabenishi y col., 2011a).

Hasta ahora, una de las estrategias para tratar de mitigar el efecto del estrés calórico sobre la fertilidad de la hembra bovina ha sido el uso de antioxidantes, pero su impacto en el desarrollo embrionario y la preñez son controvertidos (Aréchiga y col., 1998; Hansen y Aréchiga, 1999; Paula-Lopes y col., 2003b). Abdelatty y col. (2018) manifiestan que la mayoría de la literatura que discute el efecto del estrés calórico sobre el embrión bovino está basada en modelos de maduración ovocitaria y PIV; sin embargo, los efectos no se conocen bien. Así en la mayoría de las publicaciones los experimentos evalúan el impacto del uso de agentes termoprotectores sobre los embriones, pero no sobre los ovocitos, que son estructuras más sensibles a los cambios de temperatura, por lo que es un área que debe ser fuertemente considerada para futuras investigaciones.

#### *V.a. Modelo in vitro para estudiar el choque térmico en ovocitos bovinos*

Durante la última década, se ha publicado una cantidad considerable de información sobre el deterioro de la función reproductiva en vacas estresadas por el calor. A pesar de los múltiples efectos perjudiciales del estrés por calor en la fertilidad, existe una evidencia creciente de que los ovocitos son objetivos importantes del estrés calórico materno (Rodrigues y col., 2016). Las vacas sometidas a estrés calórico durante las últimas etapas de la maduración de los ovocitos (entre la aparición del estro y la inseminación) produjeron un número menor de embriones viables y una mayor incidencia de retraso en el desarrollo embrionario (Putney y col., 1989) que sus contrapartes no estresadas.

En el bovino, los ovocitos en estadio de VG residen en los folículos antrales durante un tiempo de hasta 42 días (Lussier y col., 1897) y, por lo tanto, pueden estar expuestos a fluctuaciones de elevadas temperaturas corporales de 41 °C (Putney y col., 1989; Ealy y col., 1993; Wolferson y col., 1993) bajo condiciones de estrés por calor ambiental (Payton y col., 2004). Sin embargo, el estudio del efecto directo de la temperatura en los ovocitos de VG es un reto porque la eliminación de los ovocitos del entorno folicular conduce a una reanudación meiótica espontánea. Por esta razón, se ha indicado el uso de inhibidores de la reanudación meiótica como butirolactona-I (BL-I), R-yS roscovitina, 3-isobutil-1 metilxantina (IBMX) (Payton y col., 2004; Gendelman y Roth 2012b, Lima y col., 2016).

La intensidad del estrés se puede considerar como una función de la temperatura y el tiempo de exposición (Paula-Lopes y col., 2012). Algunos trabajos sugieren que los ovocitos son más susceptibles a elevada temperatura durante las primeras 12 h de maduración, debido a que la exposición de los ovocitos al estrés por calor compromete la maduración citoplásmica y nuclear (revisado por Sakatani 2017).

La técnica de PIV permite cultivar ovocitos y embriones a distintas temperaturas, y evaluar en detalle los cambios y daños inducidos por el choque térmico a estas estructuras (Sakatani, 2017). Estudios *in vitro* e *in vivo* confirman los efectos nocivos del aumento de altas temperaturas en la reserva ovárica de ovocitos, y la confiabilidad del modelo *in vitro* con la que es posible simular el efecto del estrés calórico ambiental (Gendelman y Roth, 2012b; Sakatani, 2017).

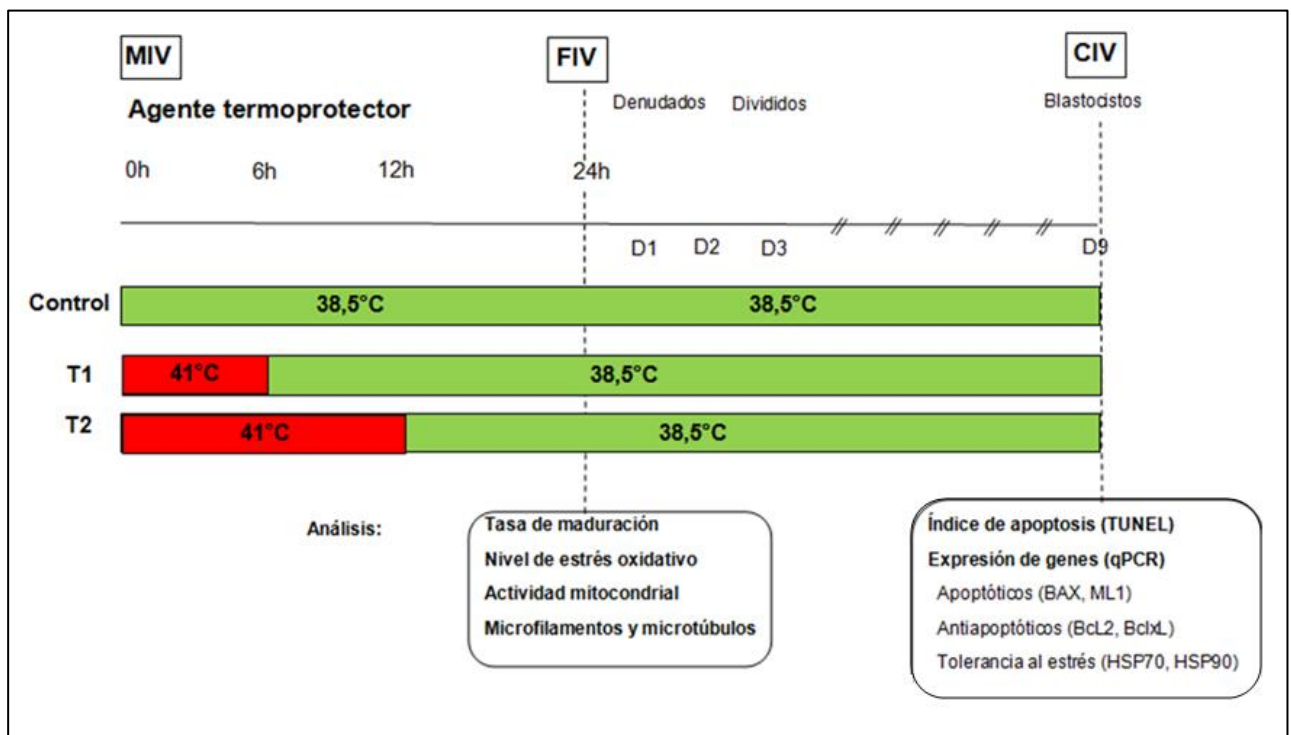
Por otra parte, se ha demostrado que la suplementación de agentes, como los antioxidantes, durante la MIV a elevadas temperaturas mejora la maduración ovocitaria y la capacidad de desarrollo embrionario (Sakatani, 2017). En este sentido, se propone hacer uso de la biotecnología reproductiva, específicamente la PIV de embriones, para encontrar medidas alternativas de mitigación del estrés calórico en las hembras bovinas. Para cumplir con este objetivo es importante contar con un modelo experimental *in vitro* para evaluar la vulnerabilidad del ovocito bovino frente a cambios de temperatura durante la MIV y el efecto que ejercen diferentes concentraciones de agentes termoprotectores.

Existen moléculas candidatas, entre ellas, LC, vit E, Se y cisteamina, las cuales han sido implementadas en diversos estudios para evaluar sus efectos beneficiosos sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos; sin embargo, aún no se ha determinado si tienen un efecto termoprotector sobre los ovocitos frente al choque térmico. Dichas moléculas pueden ser seleccionadas basándose en sus características fisicoquímicas como posibles agentes termoprotectores en forma individual o conjunta en presencia de COCs bovinos durante la MIV.

Diversos investigadores han utilizado las temperaturas que van desde 40 a 42°C en los modelos *in vitro*, con períodos completos (de 24 horas) o con varios intervalos de tiempo que van desde las 6, 12, 18 y 24 horas (Edwards y Hansen 1997; Roth y Hansen, 2004a, b; Edwards y col., 2005; Soto y Smith, 2009). Aún así, se piensa que las temperaturas de cultivo que han sido utilizadas son más altas que las temperaturas corporales que normalmente experimentan las vacas con estrés calórico. En este sentido, Nabenishi y col. (2011) sugieren utilizar temperaturas y tiempos de exposición a choque térmico durante la MIV que imiten el ritmo circadiano de temperatura vaginal de las vacas durante los meses de verano. De esta forma es posible obtener una visión más precisa sobre el impacto del choque térmico en la maduración ovocitaria y desarrollo embrionario posterior.

En la Figura 8 se describe el modelo *in vitro* propuesto en este trabajo, que permite evaluar el efecto de la adición del agente termoprotector (en forma individual) sobre el desarrollo de ovocitos sometidos a choque térmico (41°C) durante las primeras 6 y 12 horas de MIV. Se propone un modelo de análisis factorial, donde se valorará dos temperaturas (38,5 y 41 °C) y la concentración del agente termoprotector sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos. Los ovocitos serán cultivados a 38,5 °C por 24 h (grupo control) o expuestos a 41°C por 6 y 12 h seguido de 18 y 12 h a 38,5

°C, respectivamente (grupo choque térmico). Después de la maduración, un grupo de ovocitos serán seleccionados al azar para determinar el nivel de estrés oxidativo (medido a través de producción de ROS) y el porcentaje de MII, el resto serán sometidos a fecundación *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV). A los blastocistos de día 9 de cultivo se les determinará número de blastómeras e índice de apoptosis (TUNEL) y expresión de genes apoptóticos (*BAX*, *ML1*), antiapoptóticos (*Bcl2* y *BclxL*) y de tolerancia al estrés (*HSP70*, *HSP90*), mediante PCR cuantitativo (qPCR), estos últimos como indicadores de la calidad embrionaria.



**Figura 8.** Diseño experimental para el estudio *in vitro* de la termoresistencia de ovocitos bovinos utilizando agentes termoprotectores. MIV: maduración *in vitro*; FIV: fecundación *in vitro*; CIV: cultivo *in vitro* (adaptado de Báez y col., 2018a).

La obtención de COCs bovinos a partir de los ovarios provenientes del frigorífico debe realizarse en el período de los meses que van de abril a noviembre, evitando la época de verano. De esta forma los COCs no tendrán una exposición a choque térmico adicional proveniente de la hipertermia materna previa. Los valores de temperatura y exposición a choque térmico propuestos se ajustan al estrés calórico de tipo agudo (puntual y de corta duración, Rovira, 2012), al cual están expuestas las vacas en nuestro país en los meses de verano. Sin embargo estos valores quedarán sujetos a los resultados que arroje un estudio previo a nivel de campo, donde se evalúe ITH y ritmo circadiano de temperatura vaginal de vacas (Nabenishi y col., 2011b), realizado en la región norte del país.

No debe dejarse de lado que el pool ovárico de ovocitos dentro de los folículos son altamente susceptibles a la elevada temperatura ambiental (Payton y col., 2004; Gendelman y Roth, 2012b; Lima y col., 2016). Para evaluar el efecto del estrés

calórico *in vivo* sobre los ovocitos en estadio de VG puede realizarse aspiración de COCs de ovarios de frigorífico recolectados de vacas en invierno y verano y someterlos a un proceso de MIV, FIV y CIV. El estudio *in vitro* también es posible con un pre-cultivo de los COCs aspirados en presencia de un inhibidor de la reanudación meiótica como los anteriormente mencionados, para luego someterlos a MIV (a temperatura termoneutral y de choque térmico), FIV y CIV y posteriormente evaluar la competencia de desarrollo ovocitario (Gendelman y Roth, 2012b). Resultados similares fueron encontrados utilizando ambos modelos (*in vivo* e *in vitro*) por Gendelman y Roth, (2012b).

Considerando la velocidad de generación de información en modelos de PIV de embriones, esta propuesta representa una excelente alternativa para establecer los beneficios potenciales del uso de agentes termoprotectores. Es probable que a través de la información obtenida a partir de esta propuesta, permita el desarrollo de estrategias basadas en el uso de agentes termorreguladores, tanto *in vitro* como en condiciones de campo, tendientes a mitigar los efectos negativos de la hipertermia a nivel reproductivo, a través del aumento de la resistencia de los ovocitos y embriones al estrés calórico.

La adición de agentes termoprotectores o su combinación en el medio de MIV pueden mitigar los efectos del aumento de temperatura sobre la capacidad de desarrollo de los COCs puestos en cultivo, sin embargo su efectividad a nivel de campo ha sido poco estudiada. A su vez la combinación de agentes antioxidantes (junto con otros compuestos) debe utilizarse cuidadosamente a fin de no inactivar su acción, por lo que se requieren experimentos muy cuidadosos para determinar las dosis efectivas.

Por lo tanto, luego de varias réplicas del experimento, la determinación de concentraciones adecuadas para las condiciones *in vitro* (tasas adecuadas de maduración, fecundación y producción de blastocistos), pueden ser aplicadas a futuro para el desarrollo, en conjunto con la industria farmacéutica, de dosis (inyectable) que pueden ser aplicadas a las vacas antes del período de entore.

El aporte del mismo se refleja en una contribución directa tanto del conocimiento básico como del aplicado, en lo referente a la producción animal y las biotecnologías de la reproducción aplicadas al sector agropecuario.



## CONCLUSIONES

Los efectos negativos del estrés calórico en la reproducción bovina han sido estudiados ampliamente por diversos autores. Sin embargo, en nuestro país son escasos los estudios sobre estrés calórico en bovinos de carne, específicamente al norte del país donde el riesgo de estrés calórico es mayor. Tampoco ha sido evaluado el impacto sobre la función reproductiva en las hembras bovinas, por lo que resulta necesaria la implementación de estrategias que generen información al respecto.

La reducción de la fertilidad, asociada al estrés calórico, es un problema multifactorial que afecta a diferentes tejidos del tracto reproductivo de la hembra bovina, comprometiendo la dinámica folicular y la secreción hormonal, con repercusiones sobre el propio ovocito en su proceso de maduración y posterior desarrollo embrionario. Las bajas tasas de división y proporción de ovocitos convertidos en blastocistos luego de la FIV, se relacionan con los daños en sus componentes citoplasmáticos y nucleares generados por el choque térmico durante la MIV.

El aumento de la actividad apoptótica y la mayor producción de ROS, son considerados los principales mecanismos implicados en el deterioro de la calidad, tanto de ovocitos, como de los embriones bovinos expuestos a choque térmico. Teniendo en cuenta estos mecanismos es posible el uso *in vitro* de agentes de termorresistencia, como los inhibidores de apoptosis y antioxidantes, que mitiguen los efectos del choque térmico en la maduración ovocitaria y desarrollo embrionario posterior.

Si bien existen medidas de mitigación frente al estrés calórico, como modificaciones del ambiente (uso de sombra) o adaptaciones del manejo nutricional a nivel de campo, los agentes de termorresistencia que han sido estudiados *in vitro* pueden ser una medida alternativa para modular los efectos deletéreos de la temperatura elevada en la performance reproductiva.

Resulta interesante el desarrollo e implementación de un modelo *in vitro* que evalúe nuevos agentes de termorresistencia (o que continúe con los ya evaluados), con el objetivo de incrementar la calidad de los ovocitos, haciéndolos aptos para la producción *in vitro* de embriones, siendo, a su vez, un modelo que se pueda reproducir a futuro con animales bajo condiciones de campo, permitiendo diseñar fármacos en base a dichos agentes, que puedan utilizarse directamente en los animales, contribuyendo así a la optimización de la función reproductiva en las hembras bovinas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Halim B, Helmy NA (2017). Effect of nano-selenium and nano-zinc particles during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. Anim Prod Sci; doi: 10.1071/AN17057 (En Prensa).
2. Abdelatty AM, Iwaniukb ME, Potts SB, Gad A (2018). Influence of maternal nutrition and heat stress on bovine oocyte and embryo development. Int J Vet Sci Med; 6:S1-S5.
3. Abedelahi A, Salehnia M, Allameh AA, 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 peroxidase activity. Hum Reprod; 25(4):977-985.
4. Abraham JA, Collazo LA (2015). Efecto del estrés calórico sobre la producción y composición de la leche en vacas Holando. Tesis, Facultad de Agronomía, UdelaR, Uruguay. 61p.
5. Aggarwal A, Upadhyay RC (2013). Heat Stress and Animal Productivity. New Delhi, Springer, 188p.
6. Ahmed JA, Nashituddulah N, Dutta D, Biswas RK, Borah P (2017). Cumulus cell expansion and ultrastructural changes in *in vitro* matured bovine oocytes under heat stress. Ir J Vet Res; 18(3):203–207.
7. Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ (2002). Effect of Season and Exposure to Heat Stress on Oocyte Competence in Holstein Cows. J. Dairy Sci; 85(2):390–396.
8. Alemu TW, Pandey HO, Salilew Wondim D, Gebremedhn S, Neuhof C, Tholen E, Holker M, Schellander K, Tesfaye D (2018). Oxidative and endoplasmic reticulum stress defense mechanisms of bovine granulosa cells exposed to heat stress. Theriogenology; 110:130-141.
9. Aréchiga CF, Ealy AD, Hansen PJ (1994). Efficacy of vitamin E and glutathione for termoprotection of murine morulae. Theriogenology; 41:1545-1553.
10. Aréchiga CF, Vázquez-Flores S, Ortíz O, Hernández-Cerón J, Porras A, McDowell LR, Hansen PJ (1998). Effect of injection of beta-carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. Theriogenology; 50(1):65-76.
11. Arias RA, Mader TL, Escobar PC (2008). Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne y leche. Arch Med Vet; 40:7-22.
12. Arias RA, Mader TL (2011). Environmental factors affecting daily water intake on cattle finished in feedlots. J Anim Sci; 89(1):245–251.
13. Badinga L, Thatcher WW, Diaz T, Drost M, Wolfenson D (1993). Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. Theriogenology; 39:797–810.
14. Báez F, Camargo A, Deragón C, Reyes A, Márquez A, Viñoles C (2018a). Cambios en la estructura de la zona pelúcida y posterior desarrollo embrionario *in vitro* en ovocitos bovinos expuestos a estrés calórico. (Abstract). 6to Congreso AUPA – Asociación Uruguaya de Producción Animal. Tacuarembó, Uruguay. p. 128.
15. Báez F, Camargo A, Deragón C, Viñoles C (2018b). Effect of heat shock on developmental competence in bovine oocytes during *in vitro* maturation. Anim Reprod; 15(1):1106. (Abstract).

16. Balboula AZ, Yamanaka K, Sakatani M, Kawahara M, Hegab AO, Zaabel S M, Takahashi M (2013). Cathepsin B activity has a crucial role in the developmental competence of bovine cumulus–oocyte complexes exposed to heat shock during *in vitro* maturation. *Reproduction*; 146(4):407–417.
17. Baraibar D, Piazza V (2014). Estimación del consume de dos genotipos: Hereford Puro y Bonsmara-Hereford en condiciones de estrés calórico. Tesis, Facultad de Agronomía, UdelaR, Uruguay. 56p.
18. Barakat Ibrahim AH, Khalil Wagdy KB, AlHimaidi Ahmad R (2016). Curcacycline A and B modulate apoptosis induced by heat stress in sheep oocytes during *in vitro* maturation. *Small Rumin Res*; 136:187-196.
19. Bartaburu, D (2007). Stress Calórico: un tema de bienestar animal y productivo. *Revista Plan Agropecuario*; 121: 46-49.
20. Batista P, Saravia C, Ordeix S, Guillenea A, Van Eeden J, Espasandín A (2013). Bonsmara-Hereford: una craza que promete mayor adaptación al estrés térmico al norte del Uruguay. *Cangué*; 34:32-37.
21. Beede D, Collier R (1986). Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. *J Anim Sci*; 62(2):543-554.
22. Beretta V, Simeone A, Bentancur O (2013). Manejo de la sombra asociado a la restricción del pastoreo: efecto sobre el comportamiento y performance estival de vacunos. *Agrociencia*; 17(1): 131-140.
23. Bettgowda A, Patel OV, Lee KB, Park KE, Salem M, Yao J, Ireland JJ, Smith GW (2008). Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. *Biol Reprod*; 79(2):301–309.
24. Bridges PJ, Brusie MA, Fortune JE (2005). Elevated temperature (heat stress) *in vitro* reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. *Domest Anim Endocrinol*; 29(3):508–522.
25. Capó MJ, Senosiain V (2015). Efecto de diferentes medidas de mitigación de estrés calórico y desempeño productivo de vacas lecheras en Colonia, Uruguay. Tesis, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay. 61p.
26. Castaño FA, Rugeles CC, Betancur CA, Ramírez-López CJ (2014). Impacto del estrés calórico sobre la actividad reproductiva en bovinos y consideraciones para mitigar sus efectos sobre la reproducción. *Revista Biosalud*; 13(2): 84-94.
27. Castaño JP, Giménez A, Ceroni M, Furest J, Aunchayna R (2011). Caracterización agroclimática del Uruguay 1980-2009. INIA Serie Técnica N°193; 34p. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2538/1/18429021211104157.pdf>  
Fecha de consulta: 06/03/2018
28. Chwa M, Atilano SR, Reddy V, Jordan N, Kim DW, Kenney MC (2006). Increased stress-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in human keratoconus fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 47:1902–1910.
29. Córdova B, Morató R, Izquierdo D, Mogas T (2010). Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the *in vitro* maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. *Theriogenology*; 74(8):1341-8.
30. Cruz G (2009). Biometeorología del calor sobre la producción de leche de vacas Holstein en Uruguay. Tesis, Facultad de Agronomía, UdelaR, Uruguay. 83p.



31. Cruz G, Saravia C (2008). Un índice de temperatura y humedad del aire para regionalizar la producción lechera en Uruguay. *Agrociencia* (Montevideo). 12:56-60.
32. De Castro e Paula LA, Hansen PJ (2008). Modification of Actions of Heat Shock on Development and Apoptosis of Cultured Preimplantation Bovine Embryos by Oxygen Concentration and Dithiothreitol. *Mol Reprod Dev*; 75(8):1338–1350.
33. De Rensis F, Garcia-Ispuerto I, López-Gatius F (2015). Seasonal heat stress: Clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows. *Theriogenology*; 84(5):659–666.
34. Deleuze S y Goudet G (2010). Cysteamine Supplementation of *In vitro* Maturation Media: A review. *Reprod Dom Anim*; 45(6):476–482.
35. Do LT, Luu VV, Morita Y, Taniguchi M, Nii M, Peter AT, Otoi T (2015). Astaxanthin present in the maturation medium reduces negative effects of heat shock on the developmental competence of porcine oocytes. *Reprod Biol*; 15(2):86–93.
36. Donovan M, Cotter TG (2004). Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys*; 1644(2-3):133-147.
37. Ealy AD, Drost M, Hansen PJ (1993). Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J Dairy Sci*; 76(10):2899-2905.
38. Edwards JL, Ealy AD, Monterroso VH, Hansen PJ (1997). Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Mol Reprod Dev*; 48(1):25–33.
39. Edwards JL, Hansen PJ (1997). Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol Reprod Dev*; 46(2):138–145.
40. Edwards JL, Saxton AM, Lawrence JL, Payton RR, Dunlap JR (2005). Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens *in vitro* maturation in bovine oocytes. *J Dairy Sci*; 88:4326–4333.
41. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*; 71(5):836–48.
42. Ferreira RM, Chiaratti MR, Macabelli CH, Rodrigues CA, Ferraz ML, Watanabe YF (2016). The infertility of repeat-breeder cows during summer is associated with decreased mitochondrial DNA and increased expression of mitochondrial and apoptotic genes in oocytes. *Biol Reprod*; 94(3):66.
43. García-Díaz JR, Romero-Aguirregomezcortal J, Astiz Blanco S, Ruiz López S (2013). Adición de sustancias antioxidantes en los medios de cultivo empleados en la producción *in vitro* de embriones en mamíferos. *Rev Salud Anim*; 35(1):10-19.
44. Gendelman M, Roth Z (2012a). Incorporation of coenzyme Q10 into bovine oocytes improves mitochondrial features and alleviates the effects of summer thermal stress on developmental competence. *Biol Reprod*; 87(5):118.
45. Gendelman M, Roth Z (2012b). *In vivo* vs. *in vitro* models for studying the effects of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. *Anim Reprod Sci*; 134: 125–134.

46. Gharibzadeh Z, Riasi A, Ostadhosseini S, Hosseini SM, Hajian M, Nasr-Esfahani MH (2014). Effects of heat shock during the early stage of oocyte maturation on the meiotic progression, subsequent embryonic development and gene expression in ovine. *Zygote*; 23(4): 573-582.
47. Ghorbanmehr N, Salehnia M, Amooshahi M (2018). The Effects of Sodium Selenite on Mitochondrial DNA Copy Number and Reactive Oxygen Species Levels of *In Vitro* Matured Mouse Oocytes. *Cell J*; 20(3):396-402.
48. Gilad E, Meidan R, Berman A, Graber Y, Wolfenson D (1993). Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *J Reprod Fertil*; 99:315–321.
49. González JM (2014). El estrés calórico en los bovinos. Disponible en: [http://www.produccionanimal.com.ar/etologia\\_y\\_bienestar/bienestar\\_en\\_bovinos/14-stres.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/etologia_y_bienestar/bienestar_en_bovinos/14-stres.pdf) Fecha de consulta: 9/08/18.
50. Gordon I (2004). Tecnología de la reproducción de animales de granja. Zaragoza, Ed. Acribia SA, 441p.
51. Gwazdauskas FC, Thatcher WW, Wilcox CJ (1973). Physiological, environmental, and hormonal factors at insemination which may affect conception. *J Dairy Sci*; 56(7):873–877.
52. Gwazdauskas FC, Thatcher WW, Kiddy CA, Paape MJ, Wilcox CZ (1981). Hormonal patterns during heat stress following PGF $2\alpha$ -tam salt induced luteal regression in heifers. *Theriogenology*; 16:271–285.
53. Hahn G, Mader, T, Eigenberg RA (2003). Perspectives on development of thermal indices for animal studies and management. En: Lacetera N, Bernabucci U, Khalifa HH, Ronchi B, Nardone A. *Interactions Between Climate and Animal Production*. Wageningen, Ed. Wageningen Academic, pp.31-44.
54. Hansen PJ (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(1): 242–249.
55. Hansen PJ (2009). Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 364(1534):3341-3350.
56. Hansen PJ (2011). Heat Stress and Climate Change. Universidad de Florida, Gainesville, Estados Unidos. 477-485.
57. Hansen PJ (2013). Cellular and molecular basis of therapies to ameliorate effects of heat stress on embryonic development in cattle. *Anim Reprod*; 10(3):322–333.
58. Hansen PJ (2015). Genetic variation in resistance of the preimplantation bovine embryo to heat shock. *Reprod Fertil Dev*; 27(1):22-30.
59. Hansen PJ, Aréchiga CF (1999). Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. *J Anim Sci*; 77(2):36-50.
60. Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Al-Katanani YM, Kringer CE, Chase CC Jr (2001). Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*; 55(1):91–103.
61. Hopper RM (2015). *Bovine Reproduction*. Mississippi, Ed. Wiley-Blackwell, 816p.
62. Hernández Cerón J, Chase CC Jr, Hansen PJ (2004). Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. *J Dairy Sci*; 87(1): 53–58.

63. Howard JT, Kachman SD, Snelling WM, Pollak EJ, Ciobanu DC, Kuehn LA, Spangler ML (2014). Beef cattle body temperature during climatic stress: a genome-wide association study. *Int J Biometeorol*; 58:1665–1672.
64. Hill RW, Wyse GA, Anderson M (2006). *Fisiología Animal*. Madrid, Ed. Médica Panamericana, 1038p.
65. Ispada J, Lima RS, Risolia PHB, Assumpcao MEOA, Visintin JA, Paula-Lopes FF (2011). Insulinlike growth factor-I exerts a thermoprotective role on mitochondrial function of bovine oocytes exposed to heat shock. *Reprod Fertil Dev*; 24(1):209. (Abstract).
66. Ispada J, Rodrigues TA, Risolia PHB, Lima RS, Goncalvez DR, Rettori D, Nichi M, Feitosa WB, Paula-Lopes FF (2018). Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. *Reprod Fertil Dev*; doi: 10.1071/RD17271 (En Prensa).
67. Jeong YW, Park SW, Hossein MS, Kim S, Kim JH, Lee SH, Kang SK, Lee BC, Hwang WS (2006). Antiapoptotic and embryotrophic effects of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*; 66(9):2104-2112.
68. Jia T, Jia X, Zhong C (2012). Effects of Heat Stress on the Reproductive Performance of Mammals. *International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology*. Macao, China, pp. 1408-1411.
69. Johnson HD (1987). Bioclimate effects on growth, reproduction and milk production of livestock. En: Johnson HD. *Bioclimatology and Adaptation of Livestock*. Amsterdam, Ed. Elsevier, pp. 35-57.
70. Jousan FD, Hansen PJ (2004). Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biology of Reproduction*; 71(5):1665–1670.
71. Ju JC, Parks JE, Yang X (1999). Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. *Mol Reprod Dev*; 53(3):336–340.
72. Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E (2002). Heat stress in lactating dairy cows: A review. *Livest Prod Sci*; 77(1):59-91.
73. Khalil WA, Marei WF, Khalid M (2013). Protective effects of antioxidants on linoleic acid-treated bovine oocytes during maturation and subsequent embryo development; *Theriogenology*; 80(2):161-168.
74. Khatti A, Mehrotra S, Patel PK, Singh G, Maurya VP, Mahla AS, Chaudhari RK, Das GK, Singh M, Sarkar M, Kumar H, Krishnaswamy N (2017). Supplementation of vitamin E, selenium and increased energy allowance mitigates the transition stress and improves postpartum reproductive performance in the crossbred cow. *Theriogenology*; 104:142-148.
75. Khodaei-Motlagh M, Zare Shahneh A, Masoumi R, Derensis F (2011). Alterations in reproductive hormones during heat stress in dairy cattle. *African J Biotechnol*; 10(29):5552–5558.
76. Klein BG (2014). *Fisiología Veterinaria*. 5ª. ed. Barcelona, Ed. Elsevier, 607p.
77. Knitlova D, Hulinska P, Jeseta M, Hanzalova K, Kempisty B, Machatkova M (2017). Supplementation of L-carnitine during *in vitro* maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. *Theriogenology*; 102:16-22.

78. Lawrence JL, Payton RR, Godkin JD, Saxton AM, Schrick FN, Edwards JL (2004). Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. *J Dairy Sci*; 87(8):2449–2454.
79. Li H, Guo S, Cai L, Ma W, Shi Z (2017). Lipopolysaccharide and heat stress impair the estradiol biosynthesis in granulosa cells via increase of HSP70 and inhibition of smad3 phosphorylation and nuclear translocation. *Cell Signal*; 30:130-141.
80. Lima RS, Risolia PHB, Ispada J, Assumpção MEOA, Visintin JA, Orlandi C, Paula-Lopes FF (2016). Role of insulin-like growth factor 1 on cross-bred *Bos indicus* cattle germinal vesicle oocytes exposed to heat shock. *Reprod Fertil*; 29(7):1405-1414.
81. Livingston TE, Eberhardt DM, Edwards JL, Godkin JD (2004). Retinol improves bovine embryonic development *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol*; 2: 83.
82. Lussier JG, Matton P, Dufour JJ (1987). Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fert*; 81:301-307.
83. Luvoni GC, Keskintepe L, Brackett BG (1996). Improvement in bovine embryo production *in vivo* by glutathione-containing culture media. *Mol Reprod Dev*; 43:437–443.
84. Mader TL, Davis MD, Brown-Brandl T (2006). Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. *J Anim Sci*; 84(3):712-719.
85. Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN (1998). Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J*; 335:465-480.
86. Maya-Soriano, MJ (2012). Heat stress and antioxidant agents: effects on gamete development. Tesis, Universidad Autonoma de Barcelona. 272 p.
87. Merton JS, Knijn HM, Flapper H, Dotinga F, Roelen BAJ, Vos PLAM, Mullaart E (2013). Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. *Theriogenology*; 80(4):365–371.
88. MGAP: Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Anuario Estadístico Agropecuario 2018. Disponible en: <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2018/DIEA-Anuario2018.pdf>. Fecha de consulta: 05/03/2018.
89. Mihm M, Baguisi A, Boland MP, Roche JF (1994). Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J Reprod Fertil*; 102:123–130.
90. Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y (2011a). The effects of cysteine addition during *in vitro* maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. *Zygote*; 20(3):249-259.
91. Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y (2011b). Effect of the temperature-humidity index on body temperature and conception rate of lactating dairy cows in southwestern Japan. *J Reprod Dev*; 57(4): 450-456.
92. Nabenishi H, Takagi S, Kamata H, Nishimoto T, Morita T (2012). The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin. *Mol Reprod Dev*; 79(1):31–40.

93. Namekawa T, Ikeda S, Sugimoto M, Kume S. (2010). Effects of astaxanthin-containing oil on development and stress-related gene expression of bovine embryos exposed to heat stress. *Reprod Domest Anim*; 45(6):387–391.
94. Natarajan R, Shankar MB, 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. *J Assist Reprod Genet*; 27(8): 483–490.
95. Nienaber JA, Hahn GL (2007). Livestock production systems management responses to thermal challenges. *Int J Biometeorol*; 52(2):149-157.
96. Olson SE, Seidel G (2000). Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with Vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. *Biol Reprod*; 62(2):248-52.
97. Paes VM, Vieira LA, Correia HHV, Sa NAR, Moura AAA, Sales AD, Rodrigues APR, Magalhães-Padilha DM, Santos FW, Apgar GA, Campello CC, Camargo LSA, Figueiredo JR (2016). Effect of heat stress on the survival and development of *in vitro* cultured bovine preantral follicles and on *in vitro* maturation of cumulus–oocyte complex. *Theriogenology*; 86(4):994–1003.
98. Panasenko OM, Sharov VS, Briviba K, Sies H (2000). Interaction of peroxynitrite with carotenoids in human low density lipoproteins. *Arch. Biochem. Biophys*; 373(1):302–305.
99. Paula-Lopes FF, Hansen PJ (2002). Apoptosis is an adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochem Biophys Res Commun*; 295(1):37-42.
100. Paula-Lopes FF, Chase CC Jr, Al-Katanani YM, Krininger CE 3rd, Rivera RM, Tekin S, Majewski AC, Ocon OM, Olson TA, Hansen PJ (2003a). Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction*; 125(2):285-294.
101. Paula-Lopes FF, Al-Katanani YM, Majewski AC, McDowell LR, Hansen PJ (2003b). Manipulation of antioxidant status fails to improve fertility of lactating cows or survival of heat-shocked embryos. *J Dairy Sci.*; 86(7):2343-2351.
102. Paula-Lopes FF, Lima RS, Risolia PH, Ispada J, Assumpção MEOA, Visintin JA (2012). Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. *Anim Reprod*; 9(3):395-403.
103. Payton RR, Romar R, Coy P, Saxton AM, Lawrence JL, Edwards JL (2004). Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. *Biol Reprod*; 71(4):1303-1308.
104. Peng D, Zhang J, Liu Q, Taylor EW (2007). Size effect of elemental selenium nanoparticles (nano-Se) at supra nutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity. *J Inorg Biochem*; 101:1457–1463.
105. Pereira MHC, Rodrigues ADP, Martins T, Oliveira WVC, Silveira PSA, Wiltbank MC, Vasconcelos JML (2013). Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol. *J Dairy Sci*; 96(11):6904-6914.
106. Polsky L, von Keyserlingk MAG (2017). Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *J Dairy Sci*; 100(11):8645-8657.



107. Putney DJ, Drost M, Thatcher WW (1989). Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology*; 31(4):765–778.
108. Rippe CA (2009). El ciclo estral. Dairy Cattle Reproduction Conference. Mineapolis, Boise, pp. 111-116.
109. Rodrigues TA, Ispada J, Risolia PHB, Rodrigues MT, Lima RS, Assumpção MEOAC, Visintin JA, Paula-Lopes FF (2016). Thermoprotective effect of insulin-like growth factor 1 on *in vitro* matured bovine oocyte exposed to heat shock. *Theriogenology*; 86(8):2028-2039.
110. Rodrigues TA, Paula-Lopes FF (2018). Efeitos deletérios da temperatura elevada na função de oócitos bovinos: o papel do fluido folicular. 6to Congreso AUPA – Asociación Uruguaya de Producción Animal. VI. Tacuarembó, Uruguay. Pp. 115-125.
111. Rolf MM (2015). Genetic Basis for Heat Tolerance in Cattle. 11p. Disponible en: <https://www.cabpartners.com/articles/news/2909/HeatToleranceCattle.pdf>  
Fecha de consulta: 26 de junio 2018.
112. Roth Z (2015). PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Cellular and molecular mechanisms of heat stress related to bovine ovarian function. *J Anim Sci*; 93(5):2034-44.
113. Roth Z (2016). Effect of Heat Stress on Reproduction in Dairy Cows— Insights into the Cellular and Molecular Responses of the Oocyte: A review. *Annu Rev Anim Biosci*; 5:151-170.
114. Roth Z, Hansen PJ (2004a). Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol Reprod*; 71(6):1898–1906.
115. Roth Z, Hansen PJ (2004b). Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. *Biol Reprod*; 71(6):2072–2078.
116. Roth Z, Hansen PJ (2005). Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*; 129(2):235–244.
117. Roth Z, Meidan R, Braw-Tal R, Wolfenson D (2000). Immediate and delayed effect of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J Reprod Fertil*; 120(1):83–90  
23.
118. Roth Z, Meidan R, Shahan-Albalancy A, Braw-Tal R, Wolfenson D (2001). Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction*; 121(5):745–51.
119. Roth Z, Wolfenson D (2016). Comparing the effects of heat stress and mastitis on ovarian function in lactating cows: basic and applied aspects. *Domest Anim Endocrinol*; 56:218-227.
120. Rovira P (2012). Uso de la sombra en la recría de los novillos en sistemas pastoriles de la región este del Uruguay. INIA Serie técnica N° 202, 84p. Disponible en <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2549/1/18429301012120420.pdf>  
Fecha de consulta: 05/04/2018.
121. Ruvolo PP (2001). Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways. *Leukemia*; 15:1153-1160.
122. Saadoun A, Cabrera M (2013). Calidad nutricional de la carne bovina producida en Uruguay. *Arch Latinoameric Prod Anim*; 2:119-130.



123. Sakatani M (2017). Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced *in vitro*: A review. *J Reprod Dev*; 60(4): 347-352.
124. Sakatani M, Kobayashi S, Takahashi (2004). Effects of heat shock on *in vitro* development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*; 67(1): 77–82.
125. Sakatani M, Suda I, Oki T, Kobayashi S, Kobayashi S, Takahashi M (2007). Effects of purple sweet potato anthocyanins on development and intracellular redox status of bovine preimplantation embryos exposed to heat shock. *J Reprod Dev*; 53(3):605–614.
126. Santa Cruz R, Fedrigo J, Benítez V, Viñoles C (2018). Condiciones ambientales durante el entore en sistemas de cría pastoriles en Uruguay. 2do. Encuentro Regional de Investigadores de la Región Noreste. Rivera, Uruguay.
127. Saravia C (2009). Efecto del estrés calórico sobre las respuestas fisiológicas y productivas de vacas Holando y Jersey. Tesis, Facultad de Agronomía, UdelaR. 136p.
128. Satrapa RA, Nabhana T, Silvaa CF, Simõesa RAL, Razzaa EM, Puelkera RZ, Trincab LA, Barrosa CM (2011). Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*; 76(6):1162–1167.
129. Satrapa RA, Catilho A, Razza E, Pegorer M, Puelker R, Barros C (2013). Differential expression of members of the IGF system in OPU-derived oocytes from Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows. *Anim Reprod Sci*; 138(3-4):155-158.
130. Schüller LK, Michaelis I, Heuwieser W (2017). Impact of heat stress on estrus expression and follicle size in estrus under field conditions in dairy cows. *Theriogenology*; 102:48-53.
131. Segerson EC Jr, Murray FA, Moxon AL, Redman DR, Conrad HR (1977). Selenium/vitamin E: role in fertilization of bovine ova. *J Dairy Sci*; 60(6):1001-1005.
132. Shi L, Song R, Yao X, Ren Y (2017). Effects of selenium on the proliferation, apoptosis and testosterone production of sheep Leydig cells *in vitro*. *Theriogenology*; 93:24-32.
133. Silanikove N (2000). Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic. *Livest Sci*; 67(1-2): 1-18.
134. Silva CF, Sartorelli ES, Castilho ACS, Satrapa RA, Puelker RZ, Razza EM (2013). Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*; 79(2):351-357.
135. Soto P, Smith LC (2009). BH4 peptide derived from Bcl-xL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*; 76(7):637-46.
136. Sprícigo JF, Morato R, Arcarons N, Yeste M, Dode MA, Lopez-Bejar M (2017). Assessment of the effect of adding L-carnitine and/or resveratrol to maturation medium before vitrification on *in vitro*-matured calf oocytes. *Theriogenology*; 89:47-57.
137. Stott GH, Williams RJ (1962). Causes of Low Breeding Efficiency in Dairy Cattle Associated with Seasonal High Temperatures. *Journal of Dairy Science*; 45(11):1369–1375.

138. Takahashi T, Inaba Y, Somfai T, Kaneda M, Geshi M, Nagai T, Manabe N (2013). Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*; 25(4):589-599.
139. Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, DeKruif A (2002). Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev*; 61(3):414-424.
140. Thom, E (1959). The discomfort index. *Weatherwise*; 12(2):57-59.
141. Tseng K, Ju J (2009). Calcium release of heat-shocked porcine oocytes induced by thimerosal or inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3). *Anim Reprod Sci*; 111(1):41–53.
142. Ulberg LC, Burfening PJ (1967). Embryo death resulting from adverse environment on spermatozoa or ova. *J Anim Sci*; 26(3):571–577.
143. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R (1997). The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod*; 12(5):1047–1055.
144. Wang JZ, Sui HS, Miao DQ, Liu N, Zhou P, Ge L, Tan JH (2009). Effects of heat stress during *in vitro* maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. *Reproduction*; 137(2):181–189.
145. West JW (2003). Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J Dairy Sci*; 86(6):2131– 2144.
146. Westwood CT, Lean IJ, Garvin JK (2002). Factors influencing fertility of Holstein dairy cows: a multivariate description. *J Dairy Sci*; 85(12):3225-3237.
147. Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, Bender RW, Nascimento AB (2011). Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reprod Fertil Dev*; 24(1):238-243.
148. Wise ME, Armstrong DV, Huber JT, Hunter R, Wiersma F (1988). Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *J Dairy Sci*; 71:2480–2485.
149. Wolfenson D, Flamenbaum I, Berman A (1988). Hyperthermia and body energy store effects on estrous behavior, conception rate, and corpus luteum function in dairy cows. *J Dairy Sci*; 71:3497–3504.
150. Wolfenson D, Luft O, Berman A, Meidan R (1993). Effects of season, incubation temperature and cell age on progesterone and prostaglandin F2 $\alpha$  production in bovine luteal cells. *Anim Reprod Sci*; 32:27–40.
151. Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga L, Savio JD, Meidan R, Lew BJ, Braw-Tal R, Berman A (1995). Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol Reprod*; 52:1106–1113.
152. Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y, Meidan R (1997). Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim Reprod Sci*; 47:9–19.
153. Wolfenson D, Roth Z, Meidan R (2000). Impaired reproduction in heatstressed cattle: basic and applied aspects. *Anim Reprod Sci*; 60-61:535–547.
154. Xiong X, Lan D, Li J, Lin Y, Li M (2018). Selenium supplementation during *in vitro* maturation enhances meiosis and developmental capacity of yak oocytes. *Anim Sci J*; 89(2):298-306.

155. Yamada T, Imai H, Yamada M (2006). Beneficial effects of acetyl-L-carnitine treatment during IVM on post-fertilization development of bovine oocytes *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*; 18(2):280-281.
156. Yao X, Ei-Samahy MA, Fan L, Zheng L, Jin Y, Pang J, Zhang G, Liu Z, Wang F (2018). *In vitro* influence of selenium on the proliferation of and steroidogenesis in goat luteinized granulosa cells. *Theriogenology*; 114:70-80.
157. Yokoo M, Sato E (2004). Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. *Int Rev Cytol*; 235:251-291.
158. Young JM, McNeilly AS (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*; 140(4):489-504.