

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



Efecto del índice de la temperatura y humedad en la producción de embriones *in vitro* en ganado Holstein Friesian

Por:

**VICTOR MANUEL SUÁREZ ZEPEDA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Torreón, Coahuila, México  
Septiembre, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Efecto del índice de la temperatura y humedad en la producción de embriones *in vitro* en ganado Holstein Friesian

Por:

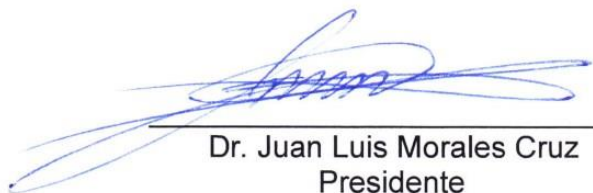
**VICTOR MANUEL SUÁREZ ZEPEDA**

TESIS

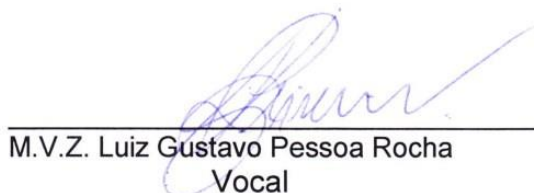
Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

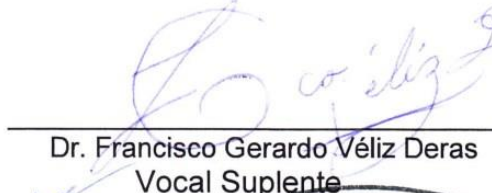
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Aprobada por:

  
Dr. Juan Luis Morales Cruz  
Presidente

  
Dr. Oscar Ángel García  
Vocal

  
M.V.Z. Luiz Gustavo Pessoa Rocha  
Vocal

  
Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras  
Vocal Suplente

  
MC. J. Guadalupe Rodríguez Martínez  
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México  
Septiembre, 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Efecto del índice de la temperatura y humedad en la producción de embriones *in vitro* en ganado Holstein Friesian

Por:

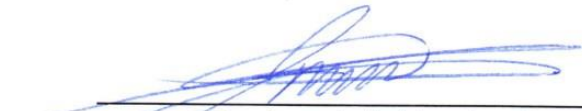
**VICTOR MANUEL SUÁREZ ZEPEDA**


TESIS

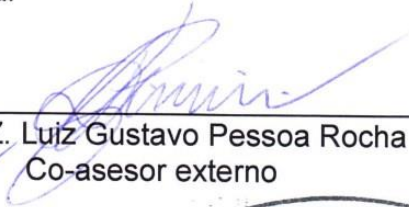
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

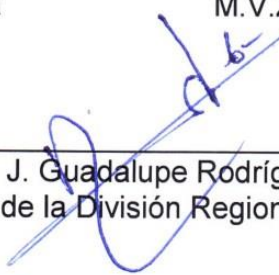
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
Dr. Juan Luis Morales Cruz  
Asesor Principal

  
Dr. Oscar Ángel García  
Co-asesor

  
M.V.Z. Luiz Gustavo Pessoa Rocha  
Co-asesor externo

  
MVZ. J. Guadalupe Rodríguez Martínez  
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México  
Septiembre, 2019



## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios**, por darme sus bendiciones y la fuerza para no rendirme en esta gran etapa de mi vida y salir adelante día con día.

**A mis padres**, Victor Manuel Suárez Mirafuentes y Margarita Zepeda Becerril por brindarme su Amor, su cariño, su apoyo incondicional cuando más lo necesite, por darme una educación, por guiarme, por enseñarme el buen camino y su apoyo en todas las etapas de estudio, en especial en esta de la universidad, que gracias a ellos y a Dios hoy me convierto en un profesionista.

**A mis hermanos**, Andrea Suárez Zepeda y Leonardo Darío Suárez Zepeda por su inmenso cariño, sus motivaciones, sus regaños y ante todo ese gran apoyo que me brindaron en esta etapa de mi vida.

**A mi alma mater**, por permitir ser parte de ella y formarme como profesionista en cada una de sus aulas.

**Al Dr. Juan Luis Morales Cruz**, por su amistad, por haber aceptado trabajar conmigo en este proyecto de investigación, por los conocimientos que me transmitió como docente, por tener el tiempo y esa dedicación para guiarme como asesor de tesis.

**A mis tíos**, Raúl Tovar Fuentes, Blanca Suárez Mirafuentes, Juan Zepeda Becerril, Sagrario Rayón Muciño y Margarita Suárez Mirafuentes por su gran apoyo incondicional, sus consejos, sus motivaciones para salir adelante sin rendirse.

**A mis abuelitos**, José Guadalupe Suárez García (†), Ana María Mirafuentes Gonzales (†), Juan Zepeda Duarte y Elvira Becerril Arzate, por haber construido ese legado tan grande en la familia, por brindarme unos grandes y admirables padres, por sus consejos, motivaciones para ser lo que ahora soy.

**A la empresa ABS México S.A de C.V.**, y sus integrantes en especial el M.V.Z. Luiz Gustavo Pessoa Rocha y el M.V.Z. Antonio Carlos Nogueira Vieira por brindarme su apoyo para realizar con éxito este proyecto.

## DEDICATORIAS

**A mis padres,** Víctor Manuel Suárez Mirafuentes y Margarita Zepeda Becerril por todo el apoyo incondicional, su confianza, sus motivaciones, sus consejos, sus regaños, sus esfuerzos, ese gran sacrificio que hicieron para que yo pudiera sobresalir y ser lo que ahora soy, un profesionista. Hoy comparto este logro con ustedes, porque son parte de él, sin ustedes ni Dios no lo hubiera logrado.

**A mis hermanos,** Andrea Suárez Zepeda y Leonardo Darío Suárez Zepeda por brindarme su apoyo, sus motivaciones y sus consejos para mejorar día a día como persona y sobresalir en mi etapa como estudiante en la universidad.

**A mis tíos,** Raúl Tovar Fuentes, Blanca Suárez Mirafuentes, Juan Zepeda Becerril, Sagrario Rayón Muciño y Margarita Suárez Mirafuentes por respaldarme, por brindarme su apoyo, sus motivaciones, sus consejos para salir adelante.

## RESUMEN

El estrés calórico (EC) es un fenómeno que afecta mucho la producción y en especial la reproducción en los hatos lecheros de la comarca lagunera, ya que hay una disminución en la calidad y cantidad, de ovocitos y embriones producidos por programas de fertilización *in vitro*. Se usó el índice de temperatura y humedad (ITH) para estimar el EC en el ganado. Cuando hay un ITH alto >72 en el que la vaca no está en su confort térmico, es ahí donde empieza el EC. En este estudio se evaluaron todos los meses del año 2017 el cual tuvimos como resultado que en los meses de mayo a agosto hubo un ITH alto promedio de 80.8 a 83.5 el cual se empiezan a desencadenar procesos fisiológicos, el cual los establos lecheros tienen como consecuencia bajas tasas de fertilidad por la mala calidad y cantidad de los ovocitos y embriones.

Se concluye que el nivel de ITH alto afecta deletéreo la producción de ovocitos viables y de embriones obtenidos por OPU y producidos *in vitro* respectivamente.

Se deben hacer estudios encaminados a evaluar los posibles daños a nivel celular y molecular.

**Palabras clave:** Estrés calórico, Índice de temperatura y humedad (ITH), Ovocitos, Embriones, Vacas Holstein.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIAS</b> .....	<b>ii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 HIPÓTESIS</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 OBJETIVO</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>3</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 Índice de temperatura y humedad</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 Efectos del estrés calórico sobre la dinámica folicular</b> .....	<b>4</b>
<b>2.3 Índice de temperatura y humedad, en su efecto en la calidad ovocitaria y embrionaria</b> .....	<b>5</b>
<b>2.4 Factores que afectan los embriones <i>in vitro</i></b> .....	<b>6</b>
<b>2.5 Métodos para la obtención ovocitos</b> .....	<b>6</b>
<b>2.5.1 Obtención de ovocitos <i>in vivo</i></b> .....	<b>6</b>
<b>2.5.1.1 Aspiración folicular (OPU)</b> .....	<b>7</b>
<b>2.5.1.2 Recolección de ovocitos por medio de laparoscopia</b> .....	<b>7</b>
<b>2.5.2 Obtención de ovocitos post mortem</b> .....	<b>8</b>
<b>2.5.2.1 Seccionamiento de ovario</b> .....	<b>8</b>
<b>2.6 Importancia de la calidad ovocitaria en la producción de embriones</b> .....	<b>8</b>
<b>2.7 Evaluación de la calidad del ovocito.</b> .....	<b>9</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1 Descripción del área de estudio</b> .....	<b>11</b>
<b>3.2 El índice de temperatura y humedad (ITH)</b> .....	<b>11</b>
<b>3.3 Animales experimentales</b> .....	<b>12</b>
<b>3.4 Sistema de manejo</b> .....	<b>13</b>
<b>3.5 Alimentación</b> .....	<b>14</b>
<b>3.6 Materiales a utilizar</b> .....	<b>15</b>
<b>3.6.1 Equipo de aspiración folicular</b> .....	<b>16</b>

3.6.2	Proceso de aspiración folicular .....	16
3.6.3	Proceso de producción <i>in vitro</i> .....	17
3.6.3.1	Separación espermática .....	18
3.6.3.2	Procedimiento de preparación del Percoll .....	18
3.6.3.3	Conteo espermático .....	18
3.6.3.4	Fertilización de ovocitos .....	19
3.7	Variables a analizar .....	19
4.	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	19
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	20
6.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	22
7.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	26
8.	<b>REFERENCIAS BILIOGRAFICAS</b> .....	27



## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro 1 Clasificación morfológica de los ovocitos</b>	<b>10</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1. Localización del área de estudio, Torreón, Coahuila, México .....</b>	<b>11</b>
<b>FIGURA 2. ITH para estimar el EC en vacas lecheras.....</b>	<b>12</b>
<b>FIGURA 3. Vacas donadoras ovocitos.....</b>	<b>14</b>
<b>FIGURA 4. Ración totalmente mezclada (RMT) de establo lechero en condiciones intensivas .....</b>	<b>15</b>
<b>FIGURA 5. Corral de aspiración folicular .....</b>	<b>16</b>
<b>FIGURA 6. Equipo utilizado en aspiración folicular <i>in vivo</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>FIGURA 7. Producción de ovocitos viables (OV) comparados con el ITH.....</b>	<b>20</b>
<b>FIGURA 8. Producción de embriones totales (ET) comparados con el ITH ....</b>	<b>21</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Estudios revelan la importancia que tienen las condiciones ambientales, como temperatura y humedad, que se relacionan al confort de las vacas lecheras, especialmente, en los cambios en la producción y reproducción cuando esas condiciones no son favorables. Existe una alternativa para determinar si se presentan condiciones adversas es el Índice de Temperatura Humedad (ITH) asociado directamente al estrés calórico (EC) de las vacas. Hay un rango general que cuando el índice se halla entre 72 y 78 se puede considerar “alerta”, si está entre 78 y 83 “peligro” y si supera 83 “emergencia” (López *et al.*, 2016; Armbrstrong, 1994; NOAA, 1976).

Estando en el rango de 83 se debe tratar este problema, afecta directamente a la reproducción, especialmente a los embriones de dos células que son más susceptibles en comparación de embriones en la etapa de mórula. A pesar de la etapa del desarrollo en que los embriones son susceptibles al EC, el resultado final siempre será un aumento de la muerte embrionaria (Putney *et al.*, 1988). Los embriones en los primeros días de vida son más susceptibles al EC y disminuye conforme los embriones avanzan en su desarrollo (Polsky, 2017; Edwards y Hansen, 1997).

El desarrollo embrionario en condiciones *in vivo*, se ve afectado por el EC durante los días 1 al 7 después del estro. En condiciones *in vitro*, se sometieron embriones a temperaturas de 41 °C que equivalen a temperaturas rectal de las vacas por EC, con esto hay una baja proporción de embriones que llegan a la etapa de blastocisto (Hansen *et al.*, 2001).

Por otro lado, el EC puede afectar el reconocimiento materno de la gestación. Las altas temperaturas afectan la habilidad de los embriones para producción de cantidades suficientes de interferón-t (IFN-t) u otras secreciones celulares, que son necesarios para el reconocimiento materno de la gestación (Molina 2017; Putney *et al.*, 1988).

Es de suma importancia que los productores lecheros tengan conocimiento sobre EC ya que es causante de pérdidas económicas a nivel mundial, además de ser un factor importante en el confort de las vacas lecheras lactantes ya que contribuye a la baja fertilidad (Polsky, 2017; De Rensis y Scaramuzzi, 2003;

Cavestany *et al.*, 1985), la calidad de los ovocitos (Roth *et al.*, 2001) y el aborto (Silanikove, 2000), afectando alrededor del 60% de la población de ganado (Cavestany *et al.*, 1985).

Las altas temperaturas y la humedad relativa del medio ambiente, son comunes en la época de verano en la mayor parte de las cuencas lecheras de México, con frecuencia se rompe la homeostasis de los animales para la disipación de calor, provocando condiciones de EC que afectan su fisiología, que se ven reflejados en la disminución del consumo voluntario de alimentos, la baja producción láctea (Ramos, 2008; West *et al.*, 2003; Brash *et al.*, 2001;), y de la baja eficiencia reproductiva (Ramos, 2008; Hansen *et al.*, 2000; Wolfenson *et al.*, 2000).

En todo el territorio nacional hay regiones en donde es más prolongado el efecto negativo del EC en la fertilidad, como es el caso de las cuencas lecheras de la Comarca Lagunera, Aguascalientes, Chihuahua y Mexicali, en las cuales se ha visto una reducción del porcentaje de concepción en los meses cálidos (mayo a septiembre) cuando el ITH es alto (Aréchiga, 2000).

Sin embargo, existen pocos estudios sobre la producción de embriones *in vitro* donde el sistema de manejo indique que el ITH afecta en la producción ovocitaria y embrionaria. En otras regiones del país más céntricas como Querétaro, San Luis Potosí o Guanajuato, todavía no se observa una clara reducción de la fertilidad debida al EC (Aréchiga, 2000).

Por consiguiente, el presente estudio pretende evaluar el efecto del ITH en la producción de ovocitos y embriones *in vitro* en ganado Holstein Friesian.

### **1.1 HIPÓTESIS**

El aumento del ITH disminuirá la calidad ovocitaria y la eficiencia en la producción de embriones *in vitro*.

### **1.2 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la calidad ovocitaria y la eficiencia de la producción de embriones *in vitro* en vacas Holstein Friesian.

### **1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Determinar la cantidad y calidad de ovocitos producidos en vacas Holstein en diferentes ITH.
- 2- Determinar la cantidad y calidad de embriones producidos *in vitro* en vacas Holstein en diferentes ITH.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Índice de temperatura y humedad

Algunos de los factores climáticos que conforman el medio ambiente, como la temperatura y la humedad relativa son unos de los que posiblemente pueden limitar o condicionar una serie de procesos biológicos, el animal se ve obligado a recurrir a determinados mecanismos fisiológicos de regulación térmica, esto se verá repercutido en su nivel productivo y reproductivo (Dikmen y Hansen, 2009; Valle, 1984).

Hay una alternativa para determinar si existe EC en vacas, es el ITH, estos están asociados directamente (López *et al.*, 2016; NOAA, 1976). El ITH se divide en categorías que indican el nivel de EC, varían entre los investigadores y las condiciones. Para López *et al.*, 2016 y NOAA, 1976, indican que los valores críticos mínimo, promedio y máximo para el ganado bovino Holstein son de 64, 72 y 76, respectivamente.

Armstrong (1994) considera que el ITH <71 como zona de confort (asumiendo que el ITH no cae por debajo de las condiciones termoneutrales de las vacas lecheras, lo que induce estrés por frío), 72 a 79 como estrés por calor leve, 80 a 90 como estrés por calor moderado, y > 90 como severo estrés por calor. Comparado con De Rensis *et al.*, (2015) definieron que el ITH < 68 están fuera de la zona de peligro del estrés para las vacas. Se observan signos leves de estrés por calor en el ITH de 68 a 74, y un ITH  $\geq 75$  causará disminuciones drásticas en el rendimiento de la producción y reproducción.

Dentro de las razas de ganado bovino lechero, una de las más susceptibles al EC es la Holstein (Espinoza *et al.*, 2009). El ganado Bos *índicus* adquirió genes que le confirieron termo-tolerancia en algún momento durante la separación evolutiva del Bos *taurus*, haciéndolo más adaptable a los climas calientes (Hansen, 2004).

### 2.2 Efectos del estrés calórico sobre la dinámica folicular

El EC es posible que actúe directamente sobre el ovocito y la función folicular, comprometiendo la calidad del mismo y promoviendo alteraciones de la dinámica folicular, afectando directamente la fertilidad en vacas lactantes; en estudios se ha demostrado que la fertilidad puede variar según la estación del año que se

encuentre, por ejemplo en invierno disminuye cerca del 50%; en verano 20% y en el otoño es más baja que en el invierno. Sin embargo, se ha podido observar que en la época de verano el 80% de los estros pueden ser indetectables (Castaño *et al.*, 2014; Ambrose *et al.*, 1999; Gilad *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1992).

Se ha indicado que cuando las temperaturas rectales de los animales aumentan de 38.5 a 40°C en 72 horas después del servicio o la inseminación, las tasas de preñez pueden disminuir hasta en el 50% (Pereira *et al.*, 2013).

El EC afecta el eje hipotálamo-hipófisis, en la pulsatilidad de las gonadotropinas, lo cual a su vez incide de manera negativa sobre la expresión de signos que hagan evidente el celo al ocasionar alteraciones sobre el crecimiento folicular y conduciendo a la inhibición del desarrollo embrionario (Chebel *et al.*, 2004).

El anterior autor también menciona que en vacas de la raza Holstein expuestas al EC, con temperaturas superiores a los 29°C durante 20-50 días antes de la inseminación artificial, se observaron tasas de gestación menores que en vacas que no fueron expuestas a esa condición ambiental.

### **2.3 Índice de temperatura y humedad, en su efecto en la calidad ovocitaria y embrionaria**

El ITH y las vacas tienen una asociación directamente con EC, por consiguiente hay un efecto negativo sobre la reproducción, actúa principalmente sobre los embriones de dos células ya que estos son más susceptibles que los embriones en la etapa de mórula. La etapa temprana del desarrollo del embrión es más susceptible al EC, el resultado final siempre será el aumento de la muerte embrionaria (Putney *et al.*, 1988). La vulnerabilidad de los embriones al EC disminuye conforme avanzan en su desarrollo (Edwards y Hansen, 1997).

La supervivencia del ovocito y del espermatozoide se ve afectada directamente por el aumento del ITH. Cuando hay un aumento en la temperatura corporal de las hembras, el embrión es posible que pueda perder su viabilidad y reabsorberse. Este es el motivo por el cual las tasas de concepción caen en los meses de verano hasta en un 20 y 30 % (De Rensis y Scaramuzzi, 2003).

El ganado con predominancia fenotípica *B. indicus* presenta mejores tasas de maduración y fecundación *in vitro* en comparación del ganado

predominantemente *B. taurus*, esto es debido a que sus ovocitos son más competentes con genes termotolerantes, capaces de resistir las condiciones ambientales del trópico (Báez, 2010).

Sartori (2002), menciona que aún no se sabe el problema de la fisiología por el cual el EC puede afectar los folículos y los ovocitos, pero se ha descrito que puede producir un daño en la comunicación entre las células de la granulosa y del cúmulo lo cual afecta la competencia del ovocito para ser fertilizado y altera el contenido proteínico, la viabilidad de las células de la granulosa y de la teca interna, produciendo cambios en la esteroidogénesis.

#### **2.4 Factores que afectan los embriones *in vitro***

En estudios han descrito que en el ganado bovino el desarrollo embrionario temprano es altamente sensible a altas temperaturas, entre los primeros tres a once días después del servicio o inseminación artificial; adquieren más tolerancia a altas temperaturas a medida que el periodo de gestación avanza. Sin embargo, se sabe que los embriones obtenidos mediante fecundación *in vitro* (FIV), son más susceptibles al EC que los obtenidos en condiciones naturales. La mayor pérdida de embriones de bovinos obtenidos de FIV, ocurren antes de los 42 días, cuando las hembras están sometidos a EC (Ambrose *et al.*, 1999; Ealy *et al.*, 1994).

Sartori *et al.*, (2002), menciona que en estudios *in vivo* e *in vitro* se ha observado que el EC compromete la competencia del ovocito para ser fertilizado y el desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocito.

Por lo cual se ha descrito que la susceptibilidad del embrión al EC se da en los primeros tres días de edad y que los embriones desarrollados *in vitro* son más resistentes a este efecto cuando presentan un desarrollo de 4 a 8 células (Hansen, 2007).

#### **2.5 Métodos para la obtención ovocitos**

Existen diferentes métodos mediante los cuales se puede obtener ovocitos tanto de animales vivos como de ovarios de vacas sacrificadas para el proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos (Lorenzo, 1992).

##### **2.5.1 Obtención de ovocitos *in vivo***

Los ovocitos se obtienen de animales vivos, ya sean hembras jóvenes, vacas en producción o de desecho. Una de las ventajas de este proceso es que permite



acortar el intervalo generacional de animales genéticamente superiores, produciendo un número elevado al año de embriones viables y terneros por cada donadora, incrementando además la eficiencia productiva de los hatos lecheros (Galli, 2001).

#### **2.5.1.1 Aspiración folicular (OPU)**

Este es un método que consiste en la aspiración de los folículos que se encuentran en la superficie del ovario y que tienen un diámetro mayor a 2 mm (Gardón, 1999), Sin embargo se ha indicado que se deben aspirar los folículos que se encuentran entre 3 y 6 mm de diámetro (Herradón *et al.*, 2007).

El método de aspiración se realiza con una aguja con un calibre entre 18 y 21 G que se encuentre conectada a una jeringa de 10 ml. Es importante tener en cuenta el calibre de la aguja empleada, esto tiene mucha importancia para preservar la integridad de los ovocitos (Bols *et al.*, 1996).

Para este proceso se debe de cargar 1-2 ml de buffer fosfato salino (conocido también por sus siglas en inglés, PBS, de phosphate buffered saline) en la jeringa conectada a la aguja, en seguida se procede a succionar los folículos de la superficie ovárica que se encuentren entre los diámetros recomendados (Peláez, 2011).

En la realización de esta técnica se debe ingresar por el estroma del ovario adyacente al folículo, este no se punciona directamente para que se evite comprometer la integridad del mismo. Cuando es obtenido el líquido folicular, se coloca en un tubo de precipitación dejándolo decantar por 10 a 20 minutos, para posteriormente eliminar el sobrenadante y aspirar, coloca el pellet en una caja petri con PBS, con el fin de hacer la búsqueda y selección de los ovocitos aptos para continuar con la fase de maduración, bajo una lupa estereoscópica (Peláez, 2011; Gardón, 1999).

#### **2.5.1.2 Recolección de ovocitos por medio de laparoscopia**

Con esta técnica ha habido avances en el diagnóstico y manejo de la fertilidad para incrementar la producción animal. Se ha utilizado para agilizar el desarrollo de la transferencia en aquellas especies o grupos de edades en donde es bastante complicado realizar la recuperación de ovocitos y/o transferencia de embriones. Algunas de las ventajas que proporciona la laparoscopia es que se encuentra el

bajo costo del equipo, tiene la facilidad de dar una imagen clara y un mejor control de problemas de recuperación pos quirúrgico del ovario (Tervit, 1996).

Sin embargo, esta técnica también tiene desventajas, el cual no tiene visualización del cohorte de folículos que están en crecimiento debajo de la superficie ovárica, la falta de conocimiento de los efectos a largo plazo de recolecciones repetidas que pueden llegar a formar cicatrices y adherencias en el sitio de operaciones, tiende a ser una técnica altamente invasiva, por lo cual no es aceptada desde el punto de vista del individuo para un bienestar animal (Tervit, 1996).

### **2.5.2 Obtención de ovocitos post mortem**

Esta técnica es la forma más sencilla y económica para la obtención de ovocitos es a través de ovarios de vacas sacrificadas en rastros o mataderos, se seleccionan los ovarios y de los cuales se aspiran los folículos con un diámetro que oscile entre 3 y 6 mm.

Sin embargo va a depender del momento del ciclo ovárico en que se encontraban, aproximadamente de cada vaca es posible que se lleguen a recolectar entre 8 y 15 ovocitos, del total de recolectados entre un 50 y 60% pueden tener la calidad suficiente para madurar, ser fecundados, clivar y avanzar al estadio de blastocito (Peláez, 2011).

#### **2.5.2.1 Seccionamiento de ovario**

A esta técnica también es muy reconocida con el nombre en inglés “slicing”, que básicamente consiste en hacer varios cortes longitudinales y transversales en la superficie ovárica, con el fin de seccionar los folículos localizados en la corteza ovárica y obtener los complejos cúmulos ovocitos (COCs) que son recogidos en un vaso precipitado luego lavar el ovario (Sierra, 2015).

### **2.6 Importancia de la calidad ovocitaria en la producción de embriones**

La etapa para tener el mayor éxito en la fertilización *in vitro* es la selección cuidadosa de los ovocitos de buena calidad para poder garantizar un óptimo desarrollo, los aspectos que generalmente se evalúan son: estado nuclear, características citoplasmáticas, aspectos de la corona radiada y la expansión o distribución de las células del cumulus, es posible que la calidad ovocitaria puede

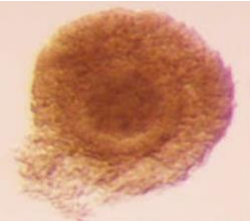
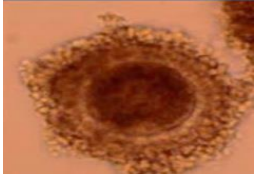
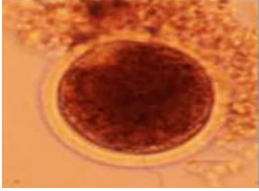
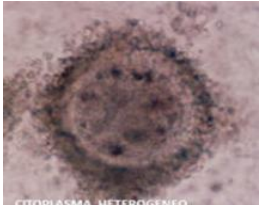
verse afectada por el EC, siendo menor la obtención de embriones *in vitro* (Chen, 2001; De Loos *et al.*, 1989).

Es importante el diámetro de los ovocitos, ya que este condiciona su capacidad para madurar, de tal forma, que los ovocitos bovinos con un diámetro menor a 110  $\mu\text{m}$  se encuentran todavía en fase de crecimiento, por lo cual todavía no han adquirido aun la capacidad para completar la meiosis I (Hyttel *et al.*, 1997).

### **2.7 Evaluación de la calidad del ovocito.**

Clasificación morfológica de acuerdo a Zarate (2006), menciona que en la etapa de selección y clasificación de ovocitos de buena calidad, puede ser la diferencia entre el éxito o el fracaso de la producción de embriones *in vitro*; sin embargo, Sierra (2015), recomienda que para la selección de ovocitos deben ser del tipo 1 y 2 que serían los adecuados para someterse a la maduración. Estos mismos autores clasifican los ovocitos conforme a las características de las células de cúmulo y del citoplasma.

**Cuadro 1.** Clasificación morfológica de los ovocitos.

TIPO/ CATEGORIA	CARACTERISTICAS	IMAGEN
1	Dentro de este grupo se encuentran los ovocitos con varias capas de células del cúmulo en un número mayor a 4 capas y compacta, citoplasma transparente y homogéneo.	
2	Ovocitos con 1-3 capas de células del cúmulo, citoplasma homogéneo con algunas zonas oscuras.	
3	Ovocitos total o parcialmente desnudos con un citoplasma irregular con zonas oscuras.	
4	Los ovocitos poseen un cúmulo con las células expandidas y citoplasma irregular con zonas oscuras.	

De acuerdo a González (2013) los ovocitos de clasificación 1 y 2 que llegan a ser fertilizados mediante FIV y consiguen dividirse en un alto porcentaje (80% los 1 y 77 % los 2), siendo los únicos ovocitos que llegan a blastocitos (40% de los 1 y 20% de los 2). En cuanto a los tipos 3 y 4 consiguen dividirse en un porcentaje menor (40% los 3 y 34% los 4), no pudiendo alcanzar su desarrollo hasta blastocito.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Descripción del área de estudio

El estudio de campo se realizó en establos lecheros comerciales localizados en la Comarca Lagunera, a una Latitud 24° 22' Norte y 102° 22' Oeste de longitud, con 1,120 metros sobre nivel del mar. Con condiciones climáticas: región semiárida, seca precipitación pluvial anual 250 mm. La Temperatura media anual de 25 °C, con máximas de 45 y mínimas de -5 °C, humedad relativa del 20-25 %.

El estudio se llevó a cabo en todo un año, que corresponde de enero a diciembre del año 2017.



Figura 1. Localización del área de estudio, La Comarca Lagunera, México.

#### 3.2 El índice de temperatura y humedad (ITH)

El ITH de cada uno de los meses de producción de los embriones se analizó mediante la siguiente fórmula (Mader *et al.*, 2006)

$$THI = 0.8 \times \text{temperatura} + RH/100 \times (\text{temperatura} - 14.4) + 46.4$$

Donde RH= Humedad Relativa (%)

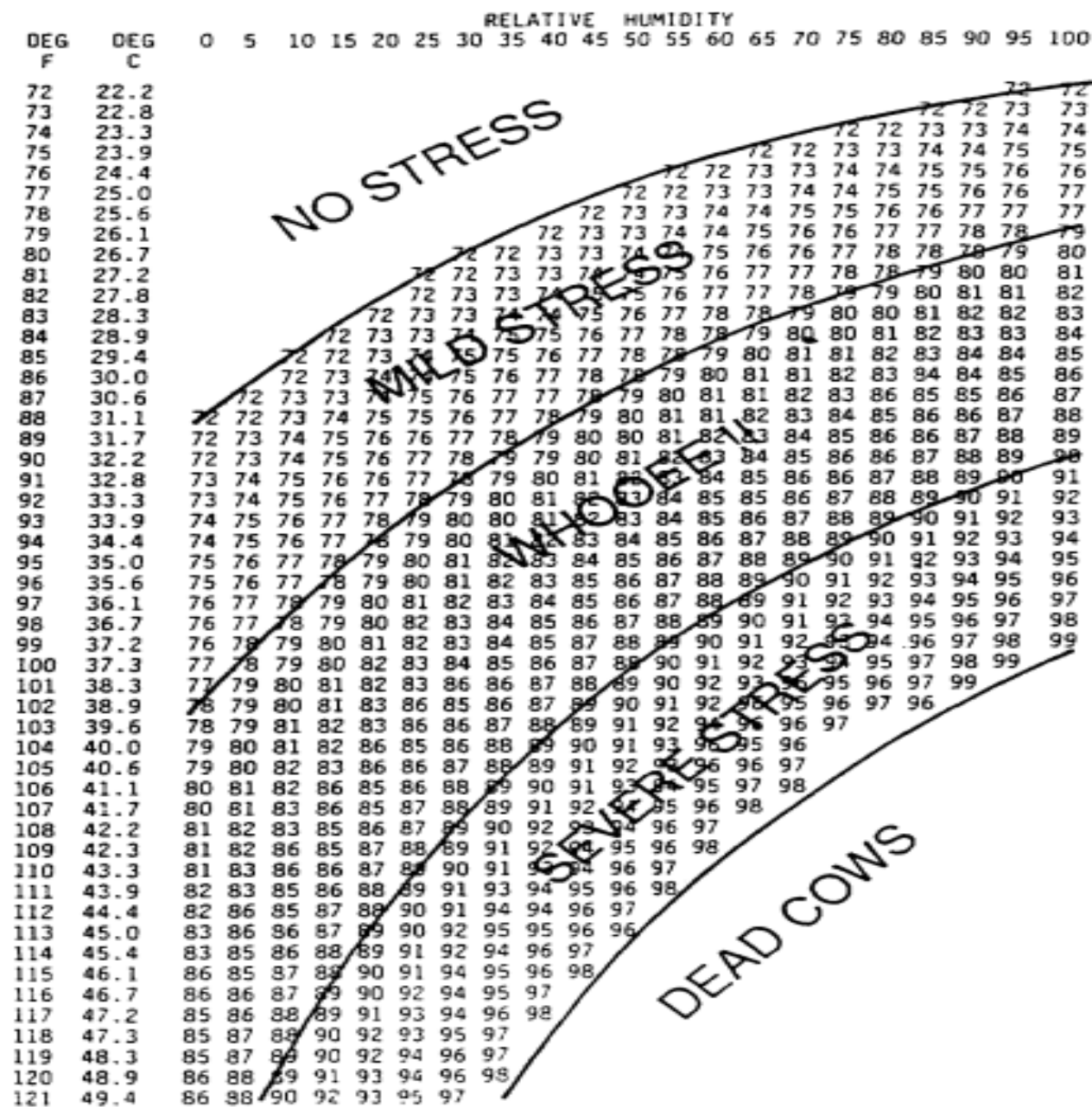


Figura 2. ITH para estimar el EC en vacas lecheras. Deg = Grados (Armstrong, 1994).

### 3.3 Animales experimentales

Todas las vacas donadoras de los ovocitos en el experimento se monitorearon desde el parto y solo fueron seleccionados los animales libres de enfermedades infectocontagiosas y que no tuvieron trastornos reproductivos de acuerdo al examen ginecológico, según registros de salud veterinaria, cumpliendo con las buenas prácticas de control de salud. Los registros o animales que

presentaron reporte de alguna enfermedad, trastorno reproductivo, metabólico, podal u otro proceso inflamatorio no se incluyeron en el estudio. Además, al momento del experimento las vacas tuvieron en la misma etapa de lactancia, el mismo nivel de producción.

Para evaluar su competencia en un programa de producción *in vitro* de embriones como parte de esta investigación. Los registros y animales incluidos en esta investigación tuvieron el mismo nivel de producción (10,000 Kg por lactancia de 305 días o 32 litros promedio por día fueron vacas altas productoras).

Se eligieron como donadoras de ovocitos 8626 vacas Holstein Friesian, en óptimas condiciones de salud y reproductivas para un programa de producción *in vitro* de embriones, se buscará la homogeneidad de todas estas con las mismas condiciones, parámetros reproductivos y alimentación ya mencionada. Los ovocitos se recolectaron por el método de aspiración folicular transvaginal “Ovum Pick UP” (OPU).

Durante el desarrollo del experimento se realizó 1 repetición de aspiración de ovocitos de los ovarios de las vacas.

Una vez colectados los ovocitos se trasladaron en un medio de transporte a base de solución salina al 0.5 % con antibiótico, al laboratorio particular de la empresa empresa ABS México S.A de C.V.

En cuanto al proceso de laboratorio, se realizó en el laboratorio ya antes mencionado para el programa de producción *in vitro* de embriones.

Los rebaños en su totalidad se manejaron de manera rutinariamente en dos ordeñas y reproductivamente a base de programas de sincronización de celos, detección de estos, inseminación artificial y diagnóstico de gestación temprana por ultrasonido hecho por un solo personal capacitado para las labores correspondientes.

Se llevan registros productivos y reproductivos almacenados en software especializados, el cual fue el Dairycom®.

### **3.4 Sistema de manejo**

Los animales estuvieron bajo el mismo sistema de manejo intensivo, no tuvieron diferencias en cuanto a manejo, clima, genética y alimentación. Las vacas estuvieron alojadas en corrales con sombras cubriendo un área de 10 m<sup>2</sup> por vaca

y los comederos con sombra al 100 % manteniendo siempre los echaderos secos y confortables. Al momento de la aspiración folicular las vacas fueron alojadas a un corral de 10 m. de largo por 5 m. de ancho con cama de cemento para facilitar su manejo.



**Figura 3.** Vacas donadoras ovocitos.

### **3.5 Alimentación**

Todas las vacas fueron alimentadas mediante forraje (50%) y concentrado (50%) con suplementos minerales y vitamínicos que están incluidos en la ración totalmente mezclada (RMT) de acuerdo a las especificaciones del National Research Council (NRC, por sus siglas en inglés) para vacas lecheras con el nivel de producción de acuerdo a su etapa de lactancia, el agua limpia a libre acceso. Los ingredientes de la dieta ofrecida a los animales en el periodo de lactancia fueron en base a forrajes como la alfalfa, silo de sorgo, silo de maíz y avena, así como de concentrados como maíz rolado, semilla de algodón y canola.





**Figura 4.** Ración totalmente mezclada (RMT) de establo lechero en condiciones intensivas.

### **3.6 Materiales a utilizar**

Ultrasonido con sonda guiada, microscópio, espermiocue, porta y cubre objetos, esteroscopio, micro pipeteador, centrifuga, campana de flujo, estufa con CO<sub>2</sub>, micropipetas, puntillas, bortex, platina térmica.



**Figura 1.** Corral de aspiración folicular.

### **3.6.1 Equipo de aspiración folicular**

El equipo de ultrasonografía utilizado para la aspiración folicular *in vivo* fue un ecógrafo CHISON, Digital Ultrasound System, Model: 8300 VET. 5.0 MHz sectorial conectado a un transductor vaginal de 7.5 MHz acoplado a una guía de aspiración folicular con cánula de 20 G x 2", la cual está unida mediante un sistema de aspiración folicular equipado con tubo cónico de 50 ml. para la recolección a una bomba de vacío (Pionner Pro Pump, Pioneer Pro Pump Single – 115v, Single Foot Pedal, PS 653, Canadá).

### **3.6.2 Proceso de aspiración folicular**

La aspiración folicular fue realizada *in vivo* empleando el método de aspiración folicular transvaginal (OPU). Para este propósito, las hembras fueron sedadas con Xilacina (Prosin, Pisa Agropecuaria, S.A. de C.V. México) al 2% (0.3 ml/vaca IM) y se les aplicó anestesia epidural baja con Lidocaína (Pisacaina, Pisa Agropecuaria, S.A. de C.V. México) al 2 % (3 ml/vaca), para prevenir contracciones rectales y facilitar la manipulación de los ovarios. El sitio de las inyecciones fue

desinfectado previamente con alcohol al 70% y sólo fue utilizada aguja y jeringa nueva y estéril por animal. El recto de los animales fue vaciado manualmente y se higienizó todo el tren posterior con un lavado con abundante agua y yodo, además en los genitales externos y la cola del animal se aplicó alcohol al 70% como medida de desinfección.

Se introdujo el transductor por vía vaginal, cubierto con un protector con gel para ultrasonografía. Los ovarios se manipularon rectalmente de forma tal que se colocaron estos contra el transductor y se visualizaron los folículos en la pantalla del ecógrafo. Con la aguja se atravesó la pared vaginal, puncionando de esta forma con presión de vacío de 50 a 65 mm Hg los folículos de entre 3 y 10 mm de diámetro que se tomó como criterio de inclusión para las vacas puncionadas dentro del experimento. Se recogió el aspirado folicular en tubos de recolección, que contenían medio de aspiración (PBS + heparina, en relación 50:1).



**Figura 6.** Equipo utilizado en aspiración folicular *in vivo*.

### **3.6.3 Proceso de producción *in vitro***

El proceso para la producción de embriones *in vitro* se realizó bajo los estándares de un laboratorio acreditado. Se siguieron los protocolos, se utilizó el equipo y material del mismo laboratorio.

Una vez localizados y clasificados los COC's se pusieron en placas de petri redonda 35 mm y se trasladaron al medio de maduración (50 COC's aproximadamente/ pozo con 500 microlitros de medio de maduración). Se cerró la placa de maduración y se equilibró en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y con 100% de humedad relativa, a una temperatura de 39°C por 24 h. Todo este proceso fue en una incubadora marca Thermo®

Las placas y medios de fertilización se prepararon antes de iniciar la capacitación del semen. Las placas se prepararon de la misma manera que las placas para maduración, se equilibraron durante 3 h, antes de transferir los ovocitos al medio de fertilización y se utilizaron pipetas de transferencia estéril.

#### **3.6.3.1 Separación espermática**

Una vez que los ovocitos fueron madurados durante 24 h, se procedió a realizar la capacitación del semen. Para ello se utilizó semen congelado de un mismo lote de un mismo toro de fertilidad comprobada, para eliminar las posibles variaciones que pudieran existir entre toros y lotes. La capacitación del semen se realizó por el método de Percoll.

#### **3.6.3.2 Procedimiento de preparación del Percoll**

Se equilibró el Percoll 90%, SP-TL sin BSA y SP-TL con BSA por 1 hora a temperatura ambiente antes de la fertilización, posteriormente, se preparó el gradiente de Percoll (para un gradiente máximo de 750 µl semen) que equivale al volumen de 3 pajuelas de 250 µl y se mezcló 1.5 ml. Percoll 90% con 1.5 ml SP-TL sin BSA (en partes iguales) en un tubo de 15 ml para hacer el Percoll de 45%.

Se puso 2 ml de Percoll 90% en un tubo de 15 ml luego se le añadió lentamente 2 ml. de Percoll de 45% (se forman dos capas visibles). Para fertilizar todos los COCs, se utilizaron 2 dosis de semen de 0.25 ml con una concentración total de 2.5 millones de espermatozoides por dosis.

#### **3.6.3.3 Conteo espermático**

Para determinar la concentración espermática de la muestra, se utilizó el hemocitómetro, realizándose el siguiente procedimiento: se preparó una dilución 1:100 del semen, para lo cual se mezcla 5 µL del semen preparado y 495 µL de

agua destilada en un tubo de microcentrífuga de 1 ml colocándose exactamente 10  $\mu$ L de esta mezcla en cada placa del hematocitometro para realizar el conteo.

Se agregó aproximadamente 1 millón de espermatozoides por ml. de medio a las placas de fertilización durante el primer minuto posterior a su capacitación (para prevenir los cambios en el pH del medio que fue de 7.4) y se llevaron a la incubadora a 39° C, la cual se equilibró con 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub>, en un 100% de humedad relativa, cultivándose durante un período de 20 h.

#### **3.6.3.4 Fertilización de ovocitos**

Después de la fertilización los ovocitos o presuntos cigotos fueron removidos de las gotas de fertilización y desnudados por el método de vortex. Para este momento los ovocitos tenían aproximadamente 18 a 20 h en las placas de fertilización. Para transferir los ovocitos fertilizados, se extrajeron de las placas de fertilización y se les hizo un lavado, se evaluaron y se cambiaron los ovocitos fertilizados a las placas de cultivo, se volvieron a colocar en la incubadora a 39°C, con 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub>, en un 100% de humedad relativa hasta completar 7 días.

Todas las gotas con los embriones fueron cubiertas con aceite mineral y cultivados por 8 días en atmosfera descrita anteriormente por pasos. El porcentaje de ovocitos que clivaron de 2 a 4 células fueron evaluados 42- 44 h posterior a la fertilización y el porcentaje de producción de blastocistos fue evaluado a los 8 días posteriores a la fertilización, mientras que la viabilidad de los embriones fue clasificada bajo observación estereoscópica y fueron clasificados como aptos o no aptos para la criopreservación.

#### **3.7 Variables a analizar**

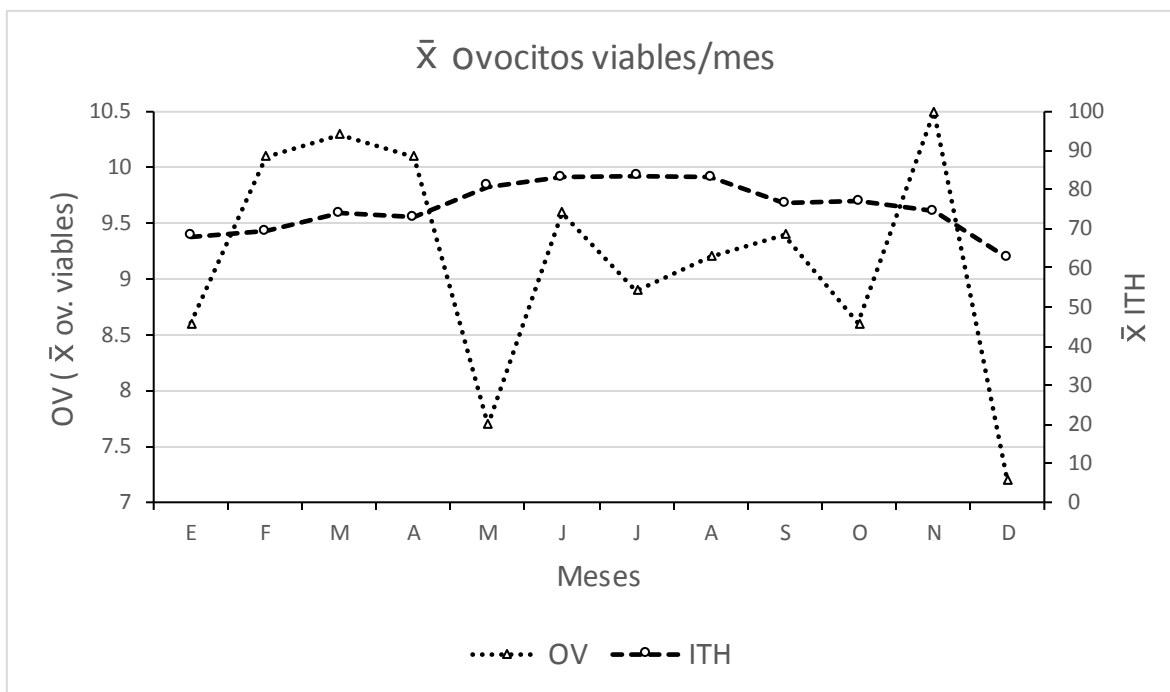
- Cantidad y calidad de ovocitos
- Cantidad y calidad de embriones producidos

### **4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se desarrolló el experimento con un diseño completamente al azar con el fin de determinar la calidad y cantidad de ovocitos viables y embriones.

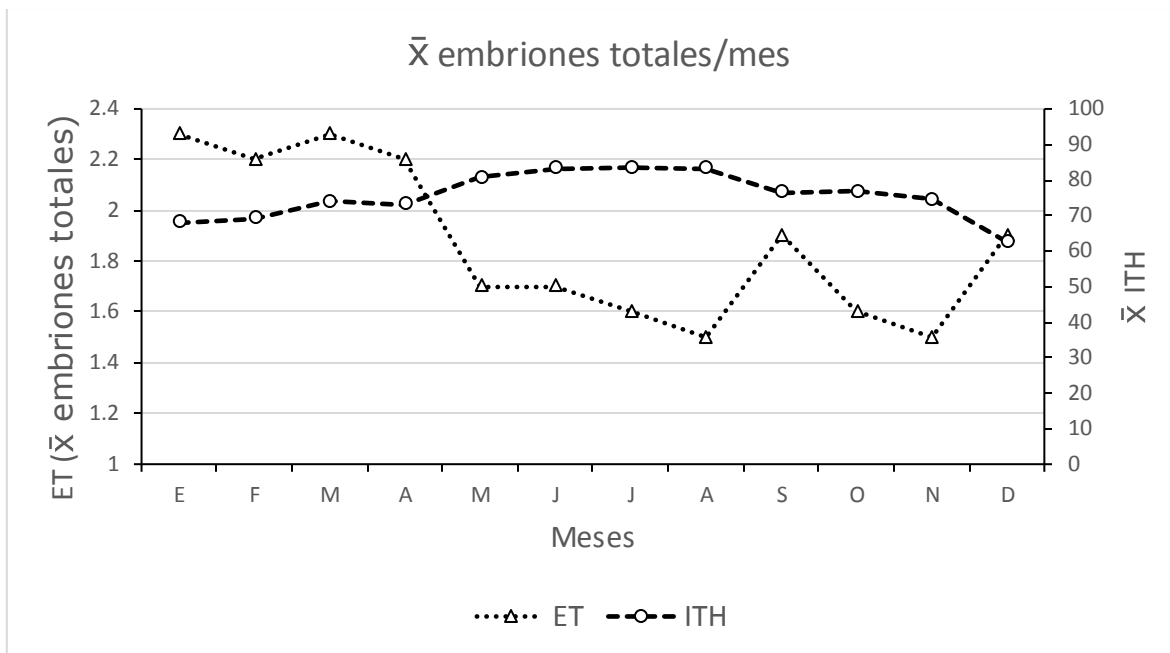
Los datos se analizaron por un análisis de varianza (ANOVA) mediante pruebas de post hoc ( $P < 0.05$ ), utilizando el paquete estadístico SAS v. 9.00 (2002).

## 5. RESULTADOS



**Figura 7.** Producción de ovocitos viables (OV) comparados con el ITH.

En esta figura se muestra que cuando hay un ITH alto la producción de OV disminuye y cuando hay un ITH bajo la producción de OV aumenta. En los meses de mayo a agosto son los meses más marcados que existe con un ITH alto, por ende la producción de OV tienen un promedio bajo, esto se da en el último mes de primavera y todos los meses de verano. La alta producción de OV se da en los meses de enero a abril y noviembre donde el TH es bajo.



**Figura 8.** Producción de embriones totales (ET) comparados con el ITH.

En esta figura se muestra que cuando hay un ITH alto la producción de ET disminuye y cuando hay un ITH bajo la producción de ET aumenta. En los meses de mayo a agosto son los meses más marcados que existen con un ITH alto, por ende la producción de ET tiene un promedio bajo, esto se da en el último mes de primavera y todos los meses de verano. La alta producción de ET se da en los meses de enero a abril donde el ITH es bajo.

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio se utilizó el ITH para estimar el EC en el ganado. El ITH, propuesto por Thom en 1959 se ha aplicado ampliamente para evaluar el EC en condiciones de moderadas a altas (Jeelani *et al.*, 2019).

Los resultados de Jeelani (2019) con los de este estudio concuerdan, no hay cambios cuando hay un ITH <72, las principales respuestas fisiológicas ocurrieron después de que alcanzara un ITH de 72 a 79, pero cuando el ITH alcanza o pasa del 80, hay cambios fisiológicos importantes, en este estudio el ITH más alto fue de un rango de 80 a 83.5 en los meses de mayo a agosto en donde hay cambios fisiológicos como la disminución de ovocitos viables y en la producción de embriones. Conforme a Armstrong (1994) se coincidió que cuando hay un ITH <71 se considera como una zona de confort, 72-79 como EC leve, 80-90 como EC moderado y >90 como EC severo.

Este estudio realizado concuerda con los resultados de Polsky *et al.*, (2017) donde encontraron que cuando hay un aumento de ITH > 80 hay EC y por ende un aumento de temperatura corporal de la vaca en particular la temperatura uterina, esta es una de las principales razones que se considera la baja tasa de gestación en la época de verano.

Menciona Sakatani (2017) que la baja tasa de gestación en verano es por la interrupción de funciones ováricas y uterinas; esto afecta varios aspectos relacionados con la preñez, como la secreción de hormonas reproductivas, calidad de ovocitos, el éxito de la fertilización y el desarrollo embrionario.

En este estudio realizado concuerda con los resultados de Gendelman *et al.*, (2010) donde encontraron que ovocitos recolectados de vacas durante el verano donde hay un ITH alto muestran una menor capacidad para ser fertilizados y desarrollarse en la etapa de blastocisto que los recolectados durante el invierno.

Esto se debe a los efectos del EC sobre la dinámica ovárica tienen consecuencias en el corto y largo plazo, para que la dinámica ovárica se normalice deben pasar de 2 a 3 ciclos estrales desde la última afectación por calor (Roth, 2015).

Los efectos del EC sobre la actividad reproductiva a nivel hormonal tiene efectos que influyen en la función sexual, existen tres niveles que son del eje



Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (HHG): 1) en el hipotálamo, tiene su efecto a través de la CRH (Hormona liberadora de corticotropina) donde se inhibe la secreción de GnRH; 2) en la hipófisis, disminuye la liberación de LH y FSH en respuesta a la inhibición de la GnRH y 3) en las gónadas, altera el efecto estimulador de las gonadotropinas (Pereira, 2005).

Al disminuir la liberación de gonadotropinas (LH y FSH), la producción de estrógenos también se verá afectada, lo que conlleva a fallas en el desarrollo y calidad de los ovocitos, en la fertilización y la implantación del embrión debido a la incorrecta preparación del útero y la formación de un cuerpo lúteo de mala calidad.

Sakatani (2017) menciona que los complejos cúmulos ovocitos (COCs) en la etapa de vesícula germinal (VG) expuestos a altas temperaturas de 40 °C a 41°C muestra deterioro de la maduración citoplasmática y nuclear de los ovocitos, hay un aumento en la formación anormal y la disminución de la capacidad de desarrollo después de la FIV.

Como resultado cuando existe un ITH alto hay un EC en los COCs en el estadio de VG, comprometiendo las funciones de los ovocitos e induciendo la apoptosis, así como la alteración de partes del citoesqueleto y altera la transcripción de genes de la madre, el contenido de ATP y la funciones mitocondrial. El EC no solo afecta la función de los ovocitos, sino también las funciones de las células del cúmulo, como la matriz metalopeptidasa 9 (MMP9) y la secreción de progesterona. Estos cambios afectan la síntesis de proteínas de los ovocitos e interrumpen la maduración de los ovocitos y un mayor desarrollo (Sakatani, 2017).

Se considera que las mitocondrias son un factor clave que influye en la adquisición de la competencia de ovocitos y, por lo tanto, podría ser un sitio para la expresión de marcadores valiosos que reflejen la calidad de los ovocitos. Cualquier factor estresante que interrumpa la replicación o el funcionamiento mitocondrial podría afectar la competencia de los ovocitos (Roth, 2018).

Paes *et al.*, (2016) realizó un experimento *in vitro*, donde se cultivaron fragmentos ováricos durante 7 días, el COCs y ovocitos aislados que fueron sometidos a EC durante las primeras 12 horas del experimento. Se encontró que el tratamiento térmico incrementó la activación de folículos primordiales, redujo la

maduración nuclear del ovocito en los COCs, alteró la secreción de hormonas esteroideas y aumentó la producción de radicales oxidativos.

El EC también induce estrés oxidativo que conduce a la elevación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los ovocitos. Las ROS dañan el ADN e inducen la apoptosis o disfunción de orgánulos celulares como las mitocondrias. Por lo tanto, la producción de ROS en ovocitos sometidos a EC alteraría la calidad y viabilidad de los ovocitos (Sakatani, 2017). En este estudio no se midió este aspecto sin embargo es posible suponer que los ovocitos que están más expuestos a alto ITH pudieran afectarse en el mismo sentido.

Molina (2017) menciona que posiblemente los cambios fisiológicos por causa del aumento del ITH afecta al ovocito dentro del folículo, la fecundación y los primeros dos días de desarrollo embrionario; al tercer y cuarto día el embrión adquiere cierta tolerancia al ITH alto y al EC, misma que aumenta al quinto día.

Esto es reforzado por Roth (2018) quien hizo un estudio donde comparo el desarrollo embrionario en condiciones térmicas de 39°C contra 41°C durante las etapas de: dos células, 4-8 células y mórula compacta. No obtuvo desarrollo de blastocitos al día 7 de los embriones estresados en etapa de dos células, obtuvieron un menor desarrollo de blastocitos al día 7 de los embriones provenientes del grupo tratado en la etapa de 4 a 8 células y la misma cantidad de blastocitos provenientes de los grupos tratados en el estadio de mórula.

Sakatani *et al.*, (2012) realizaron un experimento donde la aplicaron un tratamiento de 40°C durante 24 horas en un cultivo de mórulas, el cual no tuvo ningún efecto adverso en el desarrollo de blastocitos mientras que sí hubo una disminución significativa en el porcentaje de blastocitos desarrollados cuando el mismo tratamiento se aplicó a nivel de cigotos.

La exposición al calor de 40 °C a 42 °C disminuyó significativamente la competencia de desarrollo de los embriones en etapa de 1 a 8 células, pero mostró poco o ningún efecto en las etapas de mórula y blastocisto. Además, incluso si sobrevivieron al EC inicial, los embriones en etapa temprana expuestos a temperaturas elevadas mostraron un número total de células más baja, especialmente un número reducido de células de trofotodermo en los blastocistos (Sakatani, 2017).

La exposición al calor de los embriones en etapa temprana causa la rotura de microfilamentos, microtúbulos y la inflamación mitocondrial, lo que resulta en daño organelar. Además, la elevación de la temperatura aumenta el número de células apoptóticas en embriones de 2 células. Por lo tanto, esta evidencia indica que el EC afecta directamente a los embriones en etapa temprana y conduce a una menor competencia en el desarrollo (Roth, 2018; Sakatani, 2017). Esto puede haber afectado la competencia de los ovocitos viables a convertirse en blastocistos, ya que en los meses con ITH alto disminuyó la producción embrionaria.

## **7. CONCLUSIONES**

Se concluye que el nivel de ITH alto afecta deletéreo la producción de ovocitos viables y de embriones obtenidos por OPU y producidos *in vitro* respectivamente.

Se deben hacer estudios encaminado a evaluar los posibles daños a nivel celular y molecular.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alnimer, M., De Rosa, G., Grasso, F., Napolitano, F., Bordi, A. 2002. Effect of climate on the response to three oestrous synchronisation techniques in lactating dairy cows. *Animal reproduction science*. 71(3-4):157-168.
- Ambrose, J.D., Drost, M., Monson, R.L., Rutledge, J.J., Leibfried-Rutledge, M.L., Thatcher, M.J., Kassa, T., Binelli, M., Hansen, P.J., Chenoweth, P.J., Thatcher, W.W. 1999. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heatstressed dairy cattle. *J Dairy Sci*. 82:2369-2376.
- Armstrong, D. 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. *Journal of dairy science*. 77(7):2044-2050.
- Arechiga, C.F., Vazquez, F.S., Ortiz, O., Hernandez, C.J., Porras, A., McDrowell, L.R., Hansen, P.J. 1998. Effect of injection of  $\beta$ -carotene or vitamin e and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*. 50:65-76.
- Báez, C.F., Chávez, C.A., Hernández, F.H., villamediana, M.P. 2010. Evaluación de la capacidad de desarrollo in vitro de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Rev Cient*. 20(3):259-267.
- Bols, P., Van Soom, A., Ysebaert, M., Vandenheede, J., & de Kruif, A. 1996. Effects of spiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*. 45:1001-1014.
- Barash, H., Silanikove, M., Shamay, A., Ezra, E. 2001. Interrelationships among ambient temperature, day length, and milk yield in dairy cows under a mediterranean climate. *J. Dairy Sci*. 84:2314-2320.
- Breen, K.M., Karsh, F.J. 2003. Does cortisol inhibitor pulsatile luteinizing hormone secretion at the hypothalamic or pituitary level. *Endocrinology*. 145(2):692-698.

- Castaño-bello, H. 1995. Control y regulación de la temperatura corporal In Fisiología Veterinaria. García sacristán, A. (ed.) McGraw-Hill Interamericana de España. pp. 1015-1024.
- Castaño, F. A., Rugeles, C. C., Betancur, C. A., & Ramirez, L, C. 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
- Cavestany, D., El-kishy, A.B., Foote, R.H. 1985. Effect of season and high environmental temperature on fertility of Holstein cattle. *J. Dairy Sci*. 68:1471-1478.
- Chebel, R., Santos, J., Reynolds, J., Cerri, R., Juchem, S., Overton, M. 2004. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci*. 84:239-255.
- Chen, S. U., Lien, Y. R., Cheng, Y. Y., Chen, H. F., Ho, H. N., & Yang, Y. S. 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws and grids. *Human reproduction*. 16:2350-2356.
- Cruz, V., Elizondo, V., Ulloa, A., Fernández, G. 2009. The effect of GnRH after insemination on progesterone concentrations and conception rates in repeat-breeding Holstein cows under heat stress conditions. *Técnica Pecuaria en México*. 47(1):107-115.
- De Loos, F., van Vliet, C., van Maurik, P., Kruij, T. A. 1989. Morphology of Immature Bovine Oocytes. *Gamete research*. 24(2):197-204.
- 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.
- De Rensis F, Lopez-Gatius F, García-Ispuerto I, Morini G, Scaramuzzi RJ. 2017. Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season. *Theriogenology*. 91: 145–153.

- De Rensis, F., Scaramuzzi, J. R. 2003. Heat Stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow. *Theriogenology*. 60:1139-1151.
- Dikmen, S., & Hansen, P. J. 2009. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment?. *Journal of dairy science*. 92(1):109-116.
- Ealy, A.D., Arechiga, C.F., Bray, D.R., Risco, C.A., Hansen, P.J. 1994. Effectiveness of short-term cooling and vitamin e for alleviation of infertility induced by heat stress in dairy cows. *J. Dairy Sci*. 77:3601-3607.
- Edwards, J.L., Hansen, P.J. 1997. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Molecular Reproduction and Development*. 46:138–145.
- Espinoza, J.L., Sánchez, J., Gracia, J.A., Sánchez, J.R., Ortega, R., Palacios, A. 2009. Thermoregulation differs in Chinampo (*Bos Taurus*) and locally born dairy cattle. *Turk J Vet Anim Sci*. 33:175-180.
- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., & Lazzari, G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*. 55(6):1341-1357.
- García, K., Gastaldi, L., Ghiano, J., Domínguez, J., Sosa, N. 2010. Manejo del estrés calórico en el tambo. Proyecto Lechero INTA Ficha técnica nº 13.
- Gardón, J. 1999. Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones bovinos en diferentes estadios de desarrollo embrionario obtenidos, por fertilización in vitro. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. Córdoba. 193 p.
- Gendelman, M., Aroyo, A., Yavin, S., & Roth, Z. 2010. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*. 140(1):73-82.
- Ghiano, A. J., Taverna, A. M. S. M., Gastaldi, M. S. L., Walter, T. E. 2014. Manejo del estrés calórico. [En línea]. Jornada Nacional de Forrajes Conservados. Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta\\_-](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_-)

5\_jornada\_nacional\_de\_forrajes\_conservados\_-\_m\_3.pdf [Fecha de consulta 14/enero/2019].

- 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(2):315-321.
- González, G. J. 2013. Análisis de programas y protocolos de preparación de hembras bovinas para realización de OPU en la obtención de ovocitos para FIV. Universidad de Oviedo. Oviedo, España. 32 p.
- Grünert, E., Birgel, E. H., Vale, W. G., Birgel Júnior, E. H. 2005. Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia. 1 ed. Varela São Paulo, Brasil. 551 p.
- Gwazdauskas, F. C., Wilcox, C. J., Thatcher, W. W. 1975. Environmental and management factors affecting conception rate in a subtropical climate. *Journal Dairy Science.* 58:88–92.
- Hansen, P.J. 2004. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim Reprod Sci.* 82-83:349-360.
- Hansen, P.J. 2007. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology.* 68:242-249.
- Hansen, P. J., Arechiga, C. F. 1999. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. *Journal of Animal Science.* 77:36-50.
- Hansen, P. J., Drost, M., Rivera, R. M., Paula, L. F., Katanani, Y.M., Krininger, C.E. Chase, C.C. 2001. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology.* 55:91-103.
- Hernández-Cerón, J., Chase Jr, C. C., & Hansen, P. J. 2004. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus breeds. *Journal of dairy science.* 87(1):53-58.



- Herradón, P. G., Quintela, L. A., Becerra, J. J., Ruibal, S., & Fernández, M. 2007. Fecundación in vitro: alternativa para la mejora genética en bovinos. Arch Latinoam Prod Anim. 15(1):34-41.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology. 47:23-32.
- Igono, M.O., Bjotvedt, G., Sanford-Crane, H.T. 1992. Environmental profile and critical temperature effects on milk production of Holstein cows in desert climate. Int J Biometeorol. 36:77-87.
- Inskeep, E. K. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. Journal of animal science. 82(13):E24-E39
- Jeelani. R., Konwar. D., Khan. A., Kumar. D., Chakraborty. D., y Brahma. B. 2019. Reassessment of temperature-humidity index for measuring heat stress in crossbred dairy cattle of a sub-tropical region. Journal of thermal biology. 82:99-106.
- Johnson, H. D., Shanklin, M., Kibler, H., Ragsdale, A. 1961. Role of heat tolerance and production level in responses of lactating Holsteins to various temperature-humidity conditions. In Journal of Dairy Science. 44(6):1191.
- Leva, P. E., Valtorta, S., Fornasero, L. V. 1996. Disminución de la producción lechera estival: situación actual y efecto del cambio global. Resúmenes del 20º Congreso de Producción Animal, AAPA. Argentina. Revista Argentina de Producción Animal. 16(1):26.
- López, G., Brizuela, A. B., Rondán, G., Lissaso, C.M., Alejandra C. Kemerer, A.C., de los Santos, M. 2016. Determinación del índice de temperatura y humedad (ITH) para vacas lecheras, en el departamento Nogoyá, entre ríos. Revista Científica Agropecuaria. 20:57-65.
- Lorenzo, P.L. 1992. Maduración in vitro de oocitos de ganado vacuno. "Tesis doctoral". Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 245 p.

Mader, T. L., Davis, M. S., Brown-Brandl, T. 2006. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 84(3):712-719.

McDowell, R. E. 1972. Improvement of livestock production in warm climates.

Molina. C. R. 2017. El estrés calórico afecta el comportamiento reproductivo y el desarrollo embrionario temprano en bovinos. *Nutrición Animal Tropical*. 11(1):1-15.

National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). 1976. Livestock hot weather stress. US Dept. Commerce, Natl. Weather Serv. Central Reg., Reg. Operations Manual Lett C-31-76. US Govt.

Paes, V.M., L.A. Vieira, H.H.V. Correia, N.A.R. Sa, A.A.A. Moura, A.D. Sales, A.P.R. Rodrigues, D.M. Magalhães-Padilha, F.W. Santos, G.A. Aqgar, C.C. Campello, L.S.A. Camargo, y J.R. Figueiredo. 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.

Paula-Lopes, F. F., Chase, C. C., Al-Katanani, Y. M., Krininger, C. E., Rivera, R. M., Tekin, S., ... & Hansen, P. J. 2003. 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.

Peláez, P.V. 2011. Producción in vitro de embriones bovinos. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador. 86 p.

Pereira, C. C. 2005. Fundamentos de bioclimatología aplicados à produção animal. 1 ed. FEPMVZ. Belo Horizonte, Brasil. 195 p.

Pereira, M. H. C., Rodrigues, A. D. P., Martins, T., Oliveira, W. V. C., Silveira, P. S. A., Wiltbank, M. C., & Vasconcelos, J. L. M. 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. *Journal of dairy science*. 96(11):6904-6914.

- Polsky, L. B., Madureira, A. M., Drago Filho, E. L., Soriano, S., Sica, A. F., Vasconcelos, J. L., & Cerri, R. L. 2017. Association between ambient temperature and humidity, vaginal temperature, and automatic activity monitoring on induced estrus in lactating cows. *Journal of dairy science*. 100(10):8590-8601.
- Putney, D. J., Drost, M., Thatcher, W.W. 1998. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperature between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology*. 30:195-209.
- Putney, D. J., Mullins, S., Thatcher, W. W., Drost, M., Gross, T. S. 1989. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Animal Reproduction Science*. 19:37-51.
- Ramos, R. 2008. Avaliação de Estresse Térmico em Vacas Leiteiras Mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) Criadas em Clima Tropical Quente Úmido no Estado do Ceará. Tesis para obtener el grado de maestro en zootecnia. Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Ceará. pp.13-59.
- Roman-Ponce, H., Thatcher, W. W., Caton, D., Barron, D. H., & Wilcox, C. J. 1978. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. *Journal of animal science*. 46(1):175-180.
- Roth, Z. 2015. Physiology and endocrinology symposium: Cellular and molecular mechanisms of heat stress related to bovine ovarian function. *Journal of animal science*. 93(5):2034-2044.
- Roth, Z. 2018. Symposium review: Reduction in oocyte developmental competence by stress is associated with alterations in mitochondrial function. *Journal of dairy science*. 101(4):3642-3654.
- Roth, Z., Arav, A., Bor, A., Zeron, Y., Braw-Tal, R., Wolfenson, D. 2001. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction-cambridge*. 122(5):737-744.

- Ryan, D.P., Blakewood, E.G., Lynn, J.W., Munyakazi, L., Godke, R.A. 1992. Effect of heat-stress on bovine embryo development in vitro. *J Anim. Sci.* 70 (11):3490-3497.
- Sakatani, M. 2017. Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced in vitro. *Journal of Reproduction and Development.* 63(4): 347–352.
- Sakatani, M., N.V. Alvarez, M. Takahashi, y P.J. Hansen. 2012. Consequences of physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response genes in cattle. *J. Dairy Sci.* 95(6): 3080–3091.
- Sakumoto, R., K.-G. Hayashi, S. Saito, H. Kanahara, K. Kizaki, y K. Iga. 2015. Comparison of the global gene expression profiles in the bovine endometrium between summer and autumn. *J. Reprod. Dev.* 61(4): 297–303.
- Sartori, S., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S.A., Guenther, J.N., Parrish, J.J., Wiltbank, M.C. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci.* 85:2803-2812.
- Sierra, D.K. 2015. Determinación de la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem a varios periodos de tiempo en el Camal Municipal de Tulcán. “Tesis de grado previa la obtención del título de Ingeniera en Desarrollo Integral Agropecuario”. Universidad Politécnica Estatal del Carchi. Tulcán, Ecuador. 75 p.
- Silanikove, N. 2000. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livestock production science.* 67(1-2): 1-18.
- Tervit, H. R. 1996. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Animal Reproduction Science.* 42:227-238.
- Valle, A. 1984. Importancia del porcentaje de área negra en animales Holstein sobre el proceso adaptativo. III. Respuestas fisiológicas a la exposición solar directa. *Zootecnia Tropical.* 2:3-20.

- Valtorta, S., Gallardo, M. 1996. El estrés por calor en producción lechera. *Miscelánea*. (81):173-185.
- Vasconcelos, J. L. M., Silcox, R. W., Lacerda, J. A., Pursley, J. R., Wiltbank, M. C. 1997. Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to heat stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. *Biology of Reproduction*, 56:230-230.
- West, J., W. 1995. Managing and feeding lactating dairy cows in hotweather. In: *Management of Dairy Cattle in Hot Weather*. Protiva-Monsanto. St. Louis Mo.
- West, J. W., Mullinix, B. G., Bernard, J. K. 2003. Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:232-242.
- Wiersma, F. 1990. THI for dairy cows. Department of Agricultural Engineer. The University of Arizona. Tucson, AZ.
- Wilson, S. J., Kirby, C. J., Koenigsfeld, A. T., Keisler, D. H., y Lucy, M. C. 1998. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 81(8):2132-2138
- Wolfenson, D., Roth, Z., Meidan, R. 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science*. 61-61:535-547.
- Zárate, O.E. 2006. Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos. "Tesis para obtener el grado de maestro en ciencia animal". Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 64p.