

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



**CALIDAD OVOCITARIA Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO*,
EN VACAS Y NOVILLAS HOLSTEIN FRIESIAN BAJO DIFERENTES RANGOS
DEL ÍNDICE DE TEMPERATURA-HUMEDAD Y ESTRÉS CALÓRICO**

Tesis

Que presenta HUGO ZURIEL GUERRERO GALLEGO

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Torreón, Coahuila

Diciembre 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

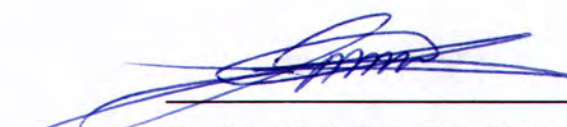
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO




**CALIDAD OVOCITARIA Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO*,
EN VACAS Y NOVILLAS HOLSTEIN FRIESIAN BAJO DIFERENTES
RANGOS DEL ÍNDICE DE TEMPERATURA-HUMEDAD Y ESTRÉS
CALÓRICO**

Tesis

Que presenta HUGO ZURIEL GUERRERO GALLEGO
Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA


Dr. Juan Luis Morales Cruz
Director UAAAN


PhD. Rodolfo Pedroso Sosa
Director Externo Universidad
Técnica de Manabí, FCZ

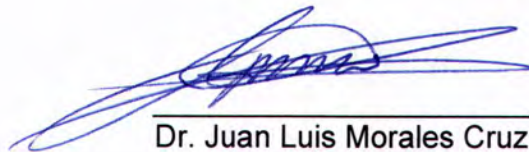
Torreón, Coahuila

Diciembre 2021

CALIDAD OVOCITARIA Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES
IN VITRO, EN VACAS Y NOVILLAS HOLSTEIN FRIESIAN BAJO
DIFERENTES RANGOS DEL ÍNDICE DE TEMPERATURA-
HUMEDAD Y ESTRÉS CALÓRICO

Tesis

Elaborada por HUGO ZURIEL GUERRERO GALLEGO como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Producción Agropecuaria con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



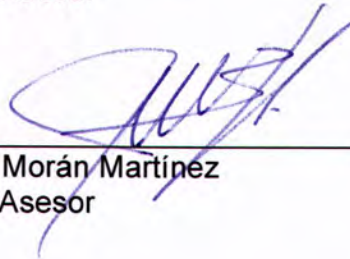
Dr. Juan Luis Morales Cruz
Asesor Principal



Dr. Carlos Leyva Orasma
Asesor



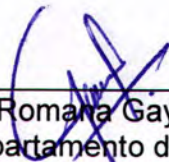
Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque
Asesor



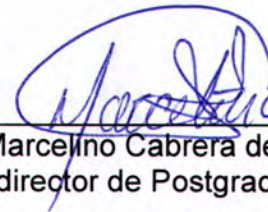
Dr. Javier Morán Martínez
Asesor



PhD. Rodolfo Pedroso Sosa
Asesor



Dra. Leticia Román Gaytán Alemán
Jefe del Departamento de Postgrado



Dr. Marcelino Cabrera de La Fuente
Subdirector de Postgrado

Agradecimientos

En primer lugar, a **Dios** por ayudarme hasta esta etapa de mi vida con un logro más, por ponerme a personas muy buenas en mi camino, por darme la vida, salud y sobre todo las Bendiciones que tiene siempre conmigo.

A mis asesores, maestros, amigos y compañeros de Programa de Postgrado en Ciencias en Producción Agropecuaria. Pero en especial a mis asesores principales, **Dr. Juan Luis Morales Cruz** y **Dr. Carlos Leyva Orasma**, por ser parte fundamental de mi formación como profesional y como ser humano, a quienes considero parte de mi familia. A mis demás asesores que me ayudaron hacer esto posible.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado.

A mis padres, **Hugo Ignacio Guerrero Perea** y **Amalia Gallegos Estrada** por apoyarme incondicionalmente en toda mi carrera y por no dudar de mí en ningún momento, por ese amor puro e infinito que hasta ahora no me ha faltado y sobre todo por sus oraciones. Padres los amo mucho.

A mi esposa **Ana Karen Albarrán Guerrero** e hijas **Josselyn Merari Guerrero Albarrán**, **Melani Amaya Guerrero Albarrán** e hijo **Hugo Damián Guerrero Albarrán** por ser el motor de mi carrera, por esas palabras de aliento y amor que me ayudaron a continuar y seguir adelante. Siempre estaré agradecido con ustedes.

A mi tía **Magdalena Guerrero Perea**, por tu apoyo incondicional y en general a toda mi familia por estar conmigo en los momentos difíciles y alegres que hemos vivido.

Dedicatoria

Mi trabajo de investigación se lo dedico principalmente a mi esposa **Ana Karen Guerrero Albarrán** e hijas **Josselyn Merari Guerrero Albarrán, Melani Amaya Guerrero Albarrán** e hijo **Hugo Damián Guerrero Abarrán**, a quienes amo con todo mi corazón, comprobando que cuando se quiere superar y ser alguien en la vida se puede lograr con ayuda de Dios y que sin apoyo de él y de ustedes no hubiera llegado tan lejos.

Y sin olvidar a mis padres **Hugo Ignacio Guerrero Perea y Amalia Gallegos Estrada** quien confiaron en mí, me apoyaron incondicionalmente cuando más los necesite, por sus consejos que formaron durante mi infancia.

A mis hermanos **Gamaliel, Gabriel, Evelyn y Danni**, por ser mi familia y por esas palabras de aliento y por su apoyo incondicional. Hermanos los amo mucho.

A mis abuelitos **Vicente Guerrero, Guadalupe Perea y Natividad Estrada**, por ser mis padres cuando más los necesite y por darme los consejos que me formaron en mi infancia y juventud. En verdad MUCHAS GRACIAS.

CARTAS DE ACEPTACIÓN DE ARTÍCULOS



AGRICULTURAL RESEARCH COMMUNICATION CENTRE

www.arccjournals.com

Reference ID. ARCC/BF-1423

Date : 14-10-2021

Dr. Morales Cruz Juan Luis,
Autonomous Agrarian University Antonio Narro,
Laguna Unit, Torreon,
Coahuila, Mexico

Acceptance of manuscript

Dear Dr. Morales,


We are pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in **Indian Journal of Animal Research**. Your submission is a well-thought out piece of writing and follows many of journal guidelines. The editors agreed that your submission showed great writing skills.

Manuscript Title : Effect of season on quantity and competence of oocytes recovered transvaginally from Holstein cows for in vitro fertilization

Author(s): Guerrero Gallego Hugo Zuriel, Calderón Leyva Guadalupe, Ángel García Oscar, Guillen Muñoz Juan Manuel, Leyva Orasma Carlos, Mellado Bosque Miguel Ángel, Pedroso Sosa Rodolfo, Pessoa Rocha LuizEsparza Alcalá Cristina and Dr. Morales Cruz Juan Luis, Guerrero Gallego Hugo Zuriel, Calderón Leyva Guadalupe, Ángel García Oscar, Guillen Muñoz Juan Manuel, Leyva Orasma Carlos, Mellado Bosque Miguel Ángel, Pedroso Sosa Rodolfo, Pessoa Rocha Luiz, Esparza Alcalá Cristina

Congratulations to you once again on your article acceptance in ARCC Journals, and we look forward to receiving more of your good submissions.

With Best Wishes and Seasonal Greetings,


Gaurav Gupta
Managing Editor

294, Narsi Village Part II, Sector 33, KARNAL -
132 001 (HARYANA), INDIA
E-mail : contact@arccjournals.com / editor@arccjournals.com
Website : www.arccjournals.com

International Journal of Biometeorology

Effect of month of harvesting and temperature-humidity index on number and quality of oocytes and in vitro embryo production in Holstein cows and heifers.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Effect of month of harvesting and temperature-humidity index on number and quality of oocytes and in vitro embryo production in Holstein cows and heifers.
Article Type:	Original Research Paper
Keywords:	Heat stress, Temperature-humidity index, Oocytes, Embryos, Ovum pick-up technique, Dairy cows.
Corresponding Author:	Juan Luis Morales-Cruz, Dr. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna: Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna Torreón, Coahuila, MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna: Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Juan Luis Morales-Cruz, Dr.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Juan Luis Morales-Cruz, Dr. Hugo Zuriel Guerrero-Gallego, Student Guadalupe Calderón-Leyva, Dra. Oscar Ángel-García, Dr. Manuel Guillen-Muñoz, Dr. Francisco Gerardo Veliz-Deras, Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque, PhD Rodolfo Pedroso Sosa, PhD. Javier Morán Martínez, Dr. Luiz Gustavo Pessoa Rocha, MV Fernando Esteban Zatarain Hernández, MVZ
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	The objective of the present study was to evaluate the effect of month of oocyte harvesting from Holstein cows and heifers and heat stress on oocyte number and quality, oocyte developmental competence, and total embryos produced in an area of intense ambient temperature for most of the year. A total of 5064 pluriparous lactating cows and 2988 nulliparous heifers were used. The oocytes were collected by the ovum pick-up technique and then subjected to the in vitro embryo production process in all seasons of the year. Overall, total oocytes per collection did not differ ($P > 0.05$) between cows (16.6 ± 2.7) and heifers (15.1 ± 1.8), but oocyte developmental competence was lower ($P < 0.05$) in cows (21.3 ± 5.4) than heifers (25.5 ± 4.0). For cows, total oocytes harvested were two-fold higher ($P < 0.05$) in November than in May. For heifers, total oocytes harvested were highest in April (17.19 ± 0.53) and lowest in May (10.94 ± 0.32 ; $P < 0.05$). For cows, total embryos were highest in

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARTAS DE ACEPTACIÓN DE ARTÍCULOS	i
Lista de Figuras	6
Lista de Cuadros	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis	3
1.2. Objetivo general	3
1.2.1. Objetivos específicos	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Desarrollo de las ovogonias durante el desarrollo embrionario	4
2.2. Desarrollo primordial y primario del folículo	5
2.3. Detención meiótica	6
2.4. Comunicación entre los ovocitos y los componentes dentro del entorno folicular	7
2.5. Estructura y funciones de la zona pelúcida	10
2.6. Vesículas extracelulares	11
2.7. Proyecciones transzonales	11
2.8. Papel de las uniones Gap (Gap junctions)	12
2.9. Fertilización del ovocito	13
3. Desarrollo embrionario temprano	14
3.1. Activación del genoma embrionario	16
3.2. Compactación y formación de blastocisto	17
3.3. Estrés calórico	18
3.4. Índice de temperatura y humedad (ITH) como indicador de EC	18

3.5.	Respuestas fisiológicas y conductuales al EC en vacas.	19
3.6.	Efecto del EC sobre el sistema endocrino.	19
3.7.	Efecto del EC en los folículos ováricos.	21
3.8.	Efecto del EC en los folículos preantrales y antrales.	21
3.9.	Efecto del EC en el ovocito.	23
4.	Deterioro de la maduración nuclear y citoplasmática a causa del EC.	25
4.1.	Alteraciones nucleares y deterioro de la función mitocondrial.	26
4.2.	Apoptosis inducida por el EC en los ovocitos.	27
4.3.	Efecto del EC en el embrión.	29
4.4.	Estrés oxidativo.	30
4.5.	Estrategias para mitigar el EC.	31
4.5.1.	Sistemas de refrigeración.	32
4.5.2.	Tratamientos hormonales.	33
4.5.3.	Transferencia de embriones producidos <i>in vitro</i>	34
4.5.4.	Tolerancia al calor (mejora genética).	36
4.5.5.	Manejo nutricional.	37
V.	ARTÍCULOS	39
VI.	CONCLUSIONES	69
VII.	RECOMENDACIONES	69
VIII.	LITERATURA CITADA	70

Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama del desarrollo de folículos tempranos y sus partes.....	6
Figura 2. Estructura del folículo ovárico.....	10
Figura 3. Eventos más importantes durante el desarrollo embrionario.....	14
Figura 4. Esquema del efecto negativo del EC e ITH en la endocrinología de la vaca Holstein.....	18
Figura 5. Diagrama de la resistencia y sensibilidad al EC en el pool ovárico de los folículos preantrales y antrales.....	20
Figura 6. Esquema del efecto negativo del EC en la maduración del ovocito de vacas Holstein.....	24
Figura 7. Apoptosis inducida por el choque térmico a través de la vía intrínseca de la esfingomielina a causa del estrés oxidativo y los antioxidantes más utilizados en medios de producción de embriones <i>in vitro</i>	29
Figura 8. Tolerancia al EC en el desarrollo embrionario entre una <i>Bos indicus</i> y <i>Bos taurus</i> , con el uso de transferencia de embriones (TE) e inseminación a tiempo fijo (IATF) como estrategias para mejorar la fertilidad en vacas Holstein Friesian en verano.....	33

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Factores que pueden promover el crecimiento y desarrollo de los folículos preantrales.....	8
Cuadro 2. Alteraciones celulares inducidas por el EC en los ovocitos en la etapa de vesícula germinal y durante la maduración.....	21

RESUMEN

La época del año puede afectar el comportamiento reproductivo de las vacas Holstein, alterando la competencia de los ovocitos, reflejando una producción reducida de embriones. El objetivo de este estudio fue evaluar el promedio de ovocitos totales, competencia de ovocitos y embriones en el proceso de producción *in vitro* en diferentes épocas del año en vacas Holstein.

Durante las cuatro estaciones del año, se realizó en cada una de las vacas donantes de ovocitos (invierno, n = 957; primavera, n = 1571; verano, n = 1776; otoño, n = 1128), mediante técnica de aspiración folicular transvaginal *in vivo*. Después de la recolección se sometieron a la producción de embriones *in vitro*. El mayor número de embriones totales se produjo en invierno y otoño, en comparación con la primavera y el verano ($3,76 \pm 0,16$ y $3,54 \pm 0,18$ frente a $2,73 \pm 0,11$ y $2,45 \pm 0,10$; respectivamente, $P < 0,05$). Durante el invierno, se observó un mayor porcentaje de competencia de ovocitos, seguido de otoño y primavera, y se mostró menor competencia en verano (26.03 ± 0.39 , 19.08 ± 0.29 , respectivamente, $P < 0.05$). La cantidad y competencia de los ovocitos recolectados y la producción de embriones *in vitro* se redujeron drásticamente durante los meses más calurosos del año en esta zona de intenso calor.

Palabras clave: Competencia de ovocitos, Embriones, Holstein, Fecundación *in vitro*, Temporada.

ABSTRACT

Season of the year can affect the reproductive behavior in Holstein cows, altering the competition of the oocytes, reflecting a reduced production of embryos. The objective of this study was to evaluate the average of total oocytes, competition of oocytes and embryos in the *in vitro* production process at different season of the year in Holstein cows.

During the four seasons of the year, was performed on each of the oocyte donor cows (winter, n = 957; spring, n = 1571; summer, n = 1776; autumn, n = 1128), by *in vivo* transvaginal follicular aspiration technique after the collection were subjected to the embryos production *in vitro*. The highest number of total embryos were produced in winter and autumn, compared to spring and summer (3.76 ± 0.16 and 3.54 ± 0.18 vs. 2.73 ± 0.11 and 2.45 ± 0.10 ; respectively, $P < 0.05$). During winter, a higher percentage of oocyte competition was observed, followed by autumn and spring, and less competition shown in summer (26.03 ± 0.39 , 19.08 ± 0.29 , respectively, $P < 0.05$). The quantity and competence of the oocytes collected, and *in vitro* embryo production were drastically reduced during the hottest months of the year in this area of intense heat.

Key Words: Competence of oocytes, Embryos, Holstein, *In vitro* fertilization, Season.

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace algunos años varios estudios han revelado la importancia que tienen las condiciones ambientales como las crecientes temperaturas globales (Alemu *et al.*, 2018; Amamou *et al.*, 2019) a causa de los cambios climáticos en la producción láctea (Edwards *et al.*, 2009) y reproducción de los animales bajo condiciones de estrés calórico (EC), convirtiendo esto en un desafío importante para la industria láctea mundial en los futuros años (Polski *et al.*, 2017 y Li *et al.*, 2021). El EC resulta en pérdidas económicas anuales para la industria ganadera en general en los EE. UU. que van desde \$ 1.69 a 2.36 mil millones de dólares (Polski y Keyserlingk, 2017; Wang *et al.*, 2020). Hoy en día, el EC a causa del medio ambiente es una gran preocupación debido a sus impactos perjudiciales, especialmente en los animales de alta productividad (Slimen *et al.*, 2016). En las regiones tropicales, subtropicales y áridas, la alta temperatura ambiente es el factor principal que pone en riesgo la eficiencia en la producción animal (Li *et al.*, 2021).

Cuando los animales están expuestos a temperaturas que exceden su umbral de confort térmico o la temperatura corporal aumenta o disminuye de la zona termoneutra ocurre el estrés térmico (Wang *et al.*, 2020). En los bovinos de leche la zona termoneutra oscila entre los 16 ° C y los 25 ° C, dentro de los cuales los animales pueden mantener una temperatura corporal fisiológica de 38,4 - 39,1 °C. El EC se produce cuando el animal tiene la incapacidad para disipar suficiente calor para mantener la homotermia, debido principalmente a las altas temperaturas del aire, la alta humedad, la radiación térmica, el escaso movimiento del aire y por el calor metabólico en las vacas productoras de leche (Jeenali *et al.*, 2019). Teniendo como respuesta de adaptación al EC, cambios fisiológicos, metabólicos, celulares y moleculares (Lopes *et al.*, 2012 y Alemu *et al.*, 2018). Para estimar el nivel de EC en el ganado, se utiliza el Índice de Temperatura y Humedad (ITH), como un indicador calculado que incorpora los efectos de la temperatura ambiental con la humedad relativa (Shu *et al.*, 2021). Cuando el rango de ITH se encuentra por debajo <71 se considera como zona

de confort térmico, 72 y 78 se considera como EC leve, 79-88 como EC severo y superior 89 como EC muy severo (Armstrong, 1994; Mader *et al.*, 2006 y López *et al.*, 2016).

En vacas Holstein Friesian el rango de ITH alto es un problema que tiene afectos deletéreos en la capacidad reproductiva, en las funciones fisiológicas y celulares en varios tejidos (Polski *et al.*, 2017), a nivel reproductivo se ha demostrado que el ITH elevado compromete el crecimiento folicular, la secreción hormonal, la esteroidogénesis, así como el flujo sanguíneo uterino y endometrial, provocando un bajo potencial en el desarrollo y calidad de los ovocitos para el desarrollo de un embrión (Lopes *et al.*, 2012). En condiciones *in vivo* el desarrollo embrionario se ve afectado por el EC durante los días 1 al 7 después del estro (Slimen *et al.*, 2016). Se ha comprobado que dependiendo del rango del ITH depende la intensidad del EC, causando un daño celular reversible o irreversible en diferentes estructuras y organelos en el desarrollo del ovocito y embrión (Ortiz *et al.*, 2010a; De Aguiar *et al.*, 2020). Tales efectos pueden desencadenar una respuesta adaptativa y/o de muerte celular conocida como apoptosis (Lopes *et al.*, 2012).

Las altas temperaturas 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 disipar el calor, provocando condiciones de EC que se ven reflejadas en la disminución del consumo voluntario de alimentos, la baja producción láctea (West, 2003; Roth, 2020b), y disminución de la eficiencia reproductiva (Wolfenson *et al.*, 2000; Hansen, 2007; Roth, 2021).

Sin embargo, existen pocos estudios que demuestren el efecto perjudicial de los diferentes rangos de ITH en la calidad y competencia de los ovocitos para desarrollar un embrión *in vitro* en el ganado Holstein Friesian bajo condiciones de producción intensiva.

1.1. Hipótesis

La viabilidad, cantidad y competencia de los ovocitos en la técnica de producción *in vitro* de embriones (IVEP) se pueden ver afectados deletéreamente en vacas y novillas Holstein Friesian a medida que aumenta el rango de ITH.

1.2. Objetivo general

Se planteo como objetivo general, evaluar la calidad ovocitaria y la competencia de ovocitos en la IVEP con diferentes rangos de ITH en vacas y novillas nulíparas Holstein Friesian.

1.2.1. Objetivos específicos

- Comparación de la competencia ovocitaria y producción de embriones *in vitro* en ganado lechero Hostein Friesian durante las diferentes estaciones del año en región semiárida del norte de México.
- Evaluación de la viabilidad, cantidad y competencia ovocitaria en la producción de embriones *in vitro* en vacas y novillas Holstein con diferentes rangos de ITH

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Desarrollo de las ovogonias durante el desarrollo embrionario

El desarrollo ovárico del embrión bovino empieza entre la tercera y sexta semana después de la concepción, en este periodo se producen numerosos eventos celulares, como, por ejemplo; la colonización masiva del ovario con las células mesonéfricas. Estas células son consideradas como las precursoras de las células foliculares (Palma *et al.*, 2012). Otros eventos celulares son la migración las células germinales a la cresta genital, la diferenciación sexual gonadal, la mitosis y la apoptosis de las células germinales (Matzuk *et al.*, 2002)

El proceso de formación de células germinales incluye varias etapas (Palma *et al.*, 2012):

- I. Generación de las células germinales primordiales (PGC) en el saco vitelino
- II. Migración de PGC a la cresta genital
- III. Colonización de las gónadas por las CGP
- IV. Diferenciación de las CGP a ovogonias
- V. Proliferación oogonial
- VI. Iniciación meiótica
- VII. Arresto en la etapa de diploteno de la profase meiótica

Las células germinales primordiales son predecesoras de los ovocitos y se desarrollan durante la gastrulación, cuando el embrión se diferencia en las etapas de células germinales de ectodermo, mesodermo y endodermo (Matzuk *et al.*, 2002). Estas células primero se vuelven reconocibles en el borde posterior del disco embrionario en la gastrulación. Después se mueven hacia el mesodermo y endodermo recién formados y unos días después las CGP se encuentran en el mesodermo visceral y posteriormente rodean el saco vitelino y la alantoides, aquí proliferan y migran a través del mesenterio primitivo hacia la gónada todavía indiferenciada, pero en desarrollo (Palma *et al.*, 2012).

2.2. Desarrollo primordial y primario del folículo

Los ovarios de las hembras bovinas contienen folículos de varios tamaños (Palma *et al.*, 2012). Podemos definir al folículo ovárico como: una estructura con dos principales funciones; la primera es la producción de hormonas y la segunda es la producción y crecimiento de ovocitos con el objetivo principal de poder ser fecundados. Estas dos funciones se llevan a cabo por los folículos antrales. El folículo está formado por un ovocito inmaduro cubierto por células de la pre-granulosa o granulosa, los folículos más pequeños son los folículos primordiales y están formados por una sola capa de células de la granulosa alrededor del ovocito (Scenna, 2006). Los folículos antrales tienen la particularidad de mantener el arresto meiótico de ovocito (Fouladi *et al.*, 1998; Jaffe y Edbert 2016). El ovocito de los mamíferos se desarrolla y alcanza la madurez para ovular dentro del folículo.

Los folículos de gran tamaño son llamados preovulatorios o de Graaf, que tienen aproximadamente de dos a tres capas de células internas de la granulosa, llamadas también células del cúmulus, y de cinco a diez capas de células externas llamadas células murales de la granulosa, como se muestra en la figura 1 (Jaffe y Egbert, 2016).

Las células de la granulosa son indispensables para el crecimiento del ovocito, diferenciación, meiosis, maduración del citoplasma y el control de la actividad transcripcional dentro del ovocito (Khan *et al.*, 2020).

El crecimiento y diferenciación de las células que rodean al ovocito en el animal sexualmente maduro se le llama foliculogénesis, mientras que el crecimiento y diferenciación de la célula destinada a producir un óvulo se le conoce como ovogénesis (Robert y Gilbert, 2018).

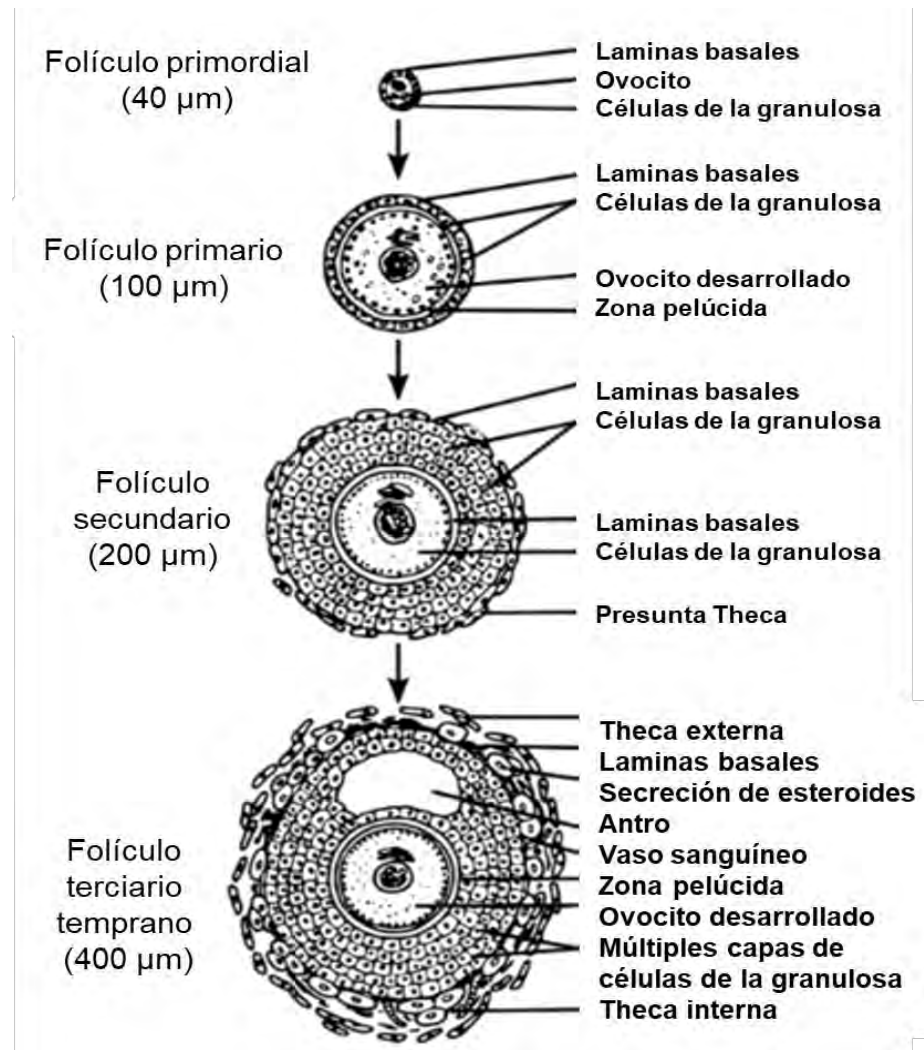


Figura 1. Diagrama del desarrollo de folículos tempranos y sus partes (Modificada de Robert y Gilbert, 2018).

2.3. Detención meiótica

Se puede definir como un ovocito maduro cuando este morfológicamente se encuentra detenido en metafase II (MII) y se puede presumir que este ovocito tiene la capacidad de ser fecundado. En la mayoría de los mamíferos, la meiosis de los ovocitos se inicia durante la vida fetal, pero se detiene prenatalmente en la etapa de diploteno de la profase I (Tarazona *et al.*, 2010; Jaffe y Edbert 2016). La detención meiótica se mantiene hasta el desarrollo folicular a un folículo de Graaf. Durante ese tiempo, los ovocitos están en constante comunicación con las

células foliculares, que interactúan por efecto de las hormonas gonadotropinas y esteroides, así como con otras moléculas intrafoliculares, como los factores de crecimiento (Reinen *et al.*, 2018).

Cuando el ovocito de los bovinos alcanza un diámetro de aproximadamente 110 μm , este puede tener la capacidad de iniciar la maduración meiótica (Palma *et al.*, 2012). El tamaño del ovocito, que se origina y se desarrolla dentro de los folículos de 3 mm a 10 mm, puede variar de entre 123 μm y 125 μm y se ha demostrado que existe una relación directa entre el tamaño con la tasa de desarrollo posterior (Tarazona *et al.*, 2010). Es decir, los ovocitos de mayor tamaño poseen una mayor capacidad de desarrollo en comparación a los ovocitos más pequeños. Existen otros factores que pueden influir en la reanudación meiótica y en el desarrollo de los ovocitos, como lo puede ser los componentes del líquido folicular. Ya que este se origina del plasma sanguíneo y puede ser modificado por la actividad metabólica de la pared folicular (Rodrigues *et al.*, 2019). Además, de que está compuesto por más de 40 proteínas diferentes, por ejemplo: albúmina y enzimas lisosomales, así como iones, ácido ascórbico, esteroides (estradiol y progesterona) y gonadotropinas (LH y FSH) e incluso puede acumular toxinas (Li *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2019).

2.4. Comunicación entre los ovocitos y los componentes dentro del entorno folicular.

Durante el desarrollo de los ovocitos y crecimiento de los folículos, se necesita de una comunicación y señalización muy intensa entre los ovocitos y los componentes dentro del entorno folicular, todo esto con el propósito de garantizar la adquisición de la capacidad de desarrollo de los ovocitos (Del collado *et al.*, 2018). Esto por medio de señales externas e internas entre el ovocito y el folículo, esta comunicación bidireccional permite el mantenimiento de la sincronía entre el desarrollo folicular y la ovogénesis (Robert y Gilbert, 2018). La comunicación de célula a célula se da por señalización paracrina a través del líquido folicular (Jaffe y Egbert 2016; Robert y Gilbert, 2018). Se ha encontrado que la asincronía

entre el comportamiento folicular y el ovocito, puede provocar un efecto negativo en el folículo, lo que da como resultado una reducción de la fertilidad o incluso puede provocar una infertilidad en la hembra (Badinga *et al.*, 1993).

Hasta que el folículo alcance la etapa antral o terciario, la foliculogénesis es independiente de las gonadotropinas, pero se necesitan de señales paracrinas esencialmente para garantizar los cambios morfológicos y funcionales del ovocito (Wolfenson y Rorh 2019). EL ovocito ordena estos procesos, en parte por medio de los factores secretados por ovocitos (OSF). Unos de los factores más importantes de esta familia son:

- ✓ El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)
- ✓ El factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9)
- ✓ La proteína morfogenética ósea 15 (BMP15)

El papel que juegan estos factores es la activación de los genes implicados en el crecimiento y morfogénesis tanto de las células somáticas como del ovocito (Robert y Gilbert, 2018; Reinen *et al.*, 2018).

La importancia de los OSF en el desarrollo de los ovocitos son cruciales ya que se ha demostrado que participan en la regulación del factor de crecimiento de ovocitos KitL (Del collado *et al.*, 2018). Además, de que aumentan la expresión en las células del cúmulo durante el crecimiento de los ovocitos, también son importantes en la disminución de su expresión cuando el ovocito está completamente desarrollado (Del collado *et al.*, 2018). Y también, se ha encontrado que estimulan la proliferación celular e impulsan la diferenciación de las células de la granulosa y el cúmulo durante la foliculogénesis (Jaffe y Egbert 2016; Del collado *et al.*, 2018; Reinen *et al.*, 2018).

Cuadro 1. Factores que pueden promover el crecimiento y desarrollo de los folículos preantrales (Palma *et al.*, 2012).

Factor	Origen	Función
TNF α	Ovocito	Regula la apoptosis de los ovocitos

MMP15	Ovocito	Diferenciación y proliferación de folículos primarios
GDF-9	Ovocito	Diferenciación y proliferación de folículos primarios
EGF/bFGF	Ovocito	Induce el desarrollo de los folículos primordiales y preantrales
Figα (Figla)	Ovocito	Coordinación de genes estructurales para el desarrollo del folículo primordial (Zp1, Zp2 y Zp3 de la ZP)
Proteína ckit	Ovocito y theca	Transición del folículo primordial al folículo primario. Migración y proliferación de células germinales
Activina	Células de la granulosa	Proliferación de células de la granulosa
KL	Células de la pregranulosa	Induce el desarrollo del folículo primordial al folículo primario
GH	Endocrina	Desarrollo de GC y de la theca de folículos preantrales
Insulina	Endocrina	Induce el desarrollo del folículo primordial al folículo primario
IGF-1	Células de la granulosa	Estimula el desarrollo del folículo preantral al folículo antral
AMH	Células de la granulosa	Inhibición del desarrollo del folículo primordial
AhR	Células de la granulosa	Regulación del tamaño de la reserva de ovocitos
BMP4	Theca/estroma	Promueve la transición del folículo primordial al folículo primario y la supervivencia de los ovocitos
KGF	Theca	Proliferación de las células de la granulosa

AhR: receptor de hidrocarburos aromáticos, AMH: hormona anti-Mulleriana, BMP: proteína morfogénica ósea, EGF / bFGF: factor de crecimiento de la epidermis / factor de crecimiento básico de fibroblastos, GDF: factor de diferenciación del crecimiento, GH: hormona del crecimiento, Figα: factor en la línea germinal alfa, IGF: factor de crecimiento de la insulina, KGF: factor de crecimiento de queratinocitos, KL: ligando del kit, TNF: factor de necrosis tumoral.

2.5. Estructura y funciones de la zona pelúcida.

A medida que crece el ovocito, se forma la zona pelúcida (ZP), la cual está compuesta principalmente por glucoproteínas (Scenna 2006; Palma *et al.*, 2012). La ZP tiene la principal función de ser una barrera física que separa al ovocito y las células de la granulosa (Del Collado *et al.*, 2018). Por otro lado, la ZP es una matriz extracelular que rodea a los ovocitos en crecimiento, así como ovocitos ovulados y embriones en etapa inicial (Jaffe y Egbert, 2016). Dentro de las funciones importantes que tiene la ZP, es la unión a espermatozoides con esta, para que posteriormente pueda inducir la reacción acrosómica del espermatozoide, además también juega un papel muy importante en el bloqueo de la poliespermia, además ayuda en la prevención de la dispersión de blastómeros durante el desarrollo previo a la implantación, además facilita el paso del embrión a través del oviducto y protege al embrión durante las primeras etapas de su desarrollo (Scenna, 2006).

Todas estas glicoproteínas de la ZP son secretadas exclusivamente por el ovocito en crecimiento hasta el momento de la ovulación (Matzuk *et al.*, 2002).

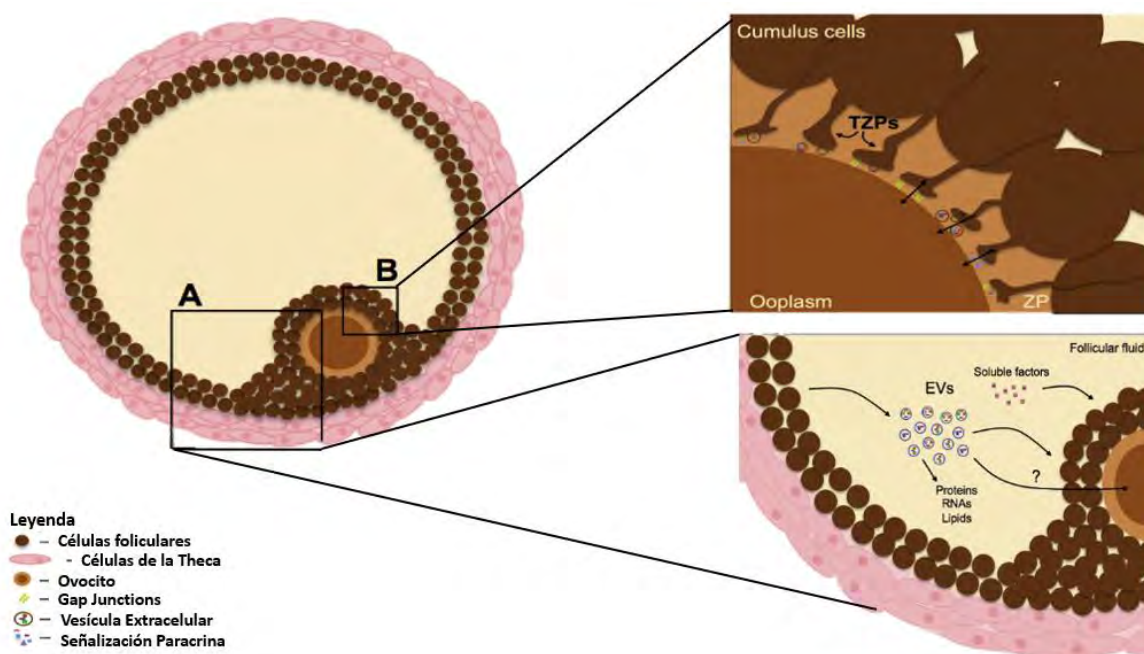


Figura 2. Estructura del folículo ovárico (tomada Del collado *et al.*, 2018).

2.6. Vesículas extracelulares.

Las vesículas extracelulares son secretadas por las células y tienen la principal función de transportar biomoléculas como proteínas, ARNm, miARN, metabolitos y lípidos (Del collado *et al.*, 2018). Además, estas vesículas están presentes en los diferentes fluidos corporales incluyendo el líquido folicular (Figura 2), en diferentes especies como la equina, bovina y humana (Navakanitworakul *et al.*, 2016).

Otra de las funciones que tienen estas vesículas extracelulares, es el facilitar los mecanismos de transferencia de diferentes macromoléculas entre las células del cúmulo y el ovocito. Además, se ha demostrado que a medida que el folículo crece, hay una mayor cantidad de estas vesículas en el líquido folicular, y también se ha encontrado que estas vesículas pueden tener un efecto positivo en la expresión génica de los ovocitos durante la maduración *in vitro* del complejo-cúmulo-ovocito (COC) y durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Hung *et al.*, 2015)

2.7. Proyecciones transzonales.

Las proyecciones transzonales (TZPs) son puentes o proyecciones citoplasmáticas de las células del cúmulo a través de la zona pelúcida, que conectan a las células del cúmulo con el oolema del ovocito (Del collado *et al.*, 2018). Las TZPs están compuestas por dos tipos de filamentos citoplasmáticos. Y de acuerdo a su estructura tienen diferente función:

- 1) La tubulina-TZPs: está involucrada en la adhesión celular
- 2) La actina-TZPs: comunicación celular

Como ya se ha mencionado antes las TZPs tienen como principal función, es ser una ruta de comunicación dentro del COC. Además, se ha demostrado que existen alrededor de tres mil TZPs por ovocito y que esta cantidad depende de la secreción de FSH y GDF-9 (Hung *et al.*, 2015). Ya que en un estudio en ausencia de FSH redujo la cantidad de TZPs en el ovocito (El-Hayek *et al.*, 2018).

Por otro lado, se ha demostrado que la tasa de maduración, crecimiento y desarrollo de los ovocitos depende en gran parte a la interacción entre las TZPs y de las células del cúmulo, esta interacción es bidireccional y esencial para el desarrollo de un embrión con alto potencial (Del collado *et al.*, 2018). Este potencial se puede lograr gracias a un mayor número de proyecciones citoplasmáticas entre el ovocito y las células de cúmulo, facilitando la transferencia de moléculas que participan en el metabolismo celular, en el desarrollo y en la reanudación de la meiosis (Picada *et al.*, 2019).

2.8. Papel de las uniones Gap (Gap junctions).

Las uniones gap son canales o estructuras de proteínas transmembrana compuestas por seis conexinas presentes en las membranas plasmáticas opuestas de las células vecinas (Scenna 2006). Tienen la particularidad de unir a las células de la granulosa y cúmulo que están entre los ovocitos (Jaffe y Egbert 2016). Estas uniones están compuestas por al menos 13 proteínas diferentes llamadas conexinas, sin embargo, varios estudios identificaron la conexina 43 como la proteína de unión gap más importante y presente en las uniones de separación que unen las células del cúmulo al ovocito (Palma *et al.*, 2012).

Varios estudios indican que estas conexinas son necesarias para la foliculogénesis y ovogénesis (Chang *et al.*, 2016). Otra función de las uniones Gap, es la comunicación intercelular en el crecimiento celular, diferenciación y el desarrollo ovocitario y embrionario (Parrish, 2014). Además, estas uniones transportan moléculas pequeñas (<1 kDa) como, por ejemplo: iones, aminoácidos y metabolitos importantes para el desarrollo de los ovocitos. Otra función muy importante de las uniones Gap, es el mantenimiento del paro meiótico de los ovocitos (Del Collado *et al.*, 2018).

2.9. Fertilización del ovocito.

La fertilización del ovocito requiere tres pasos fundamentales (Kaji y Kudo 2004):

1. La migración de espermatozoides a través del tracto reproductivo
2. La unión y migración de los espermatozoides a través de la zona pelúcida
3. La fusión de las membranas de los espermatozoides con los ovocitos

De manera natural los espermatozoides viajan primero a través de la vagina y cuello uterino hasta llegar al útero, donde comienza la preparación de los espermatozoides para la fertilización (Hansen 2009). La preparación de espermatozoides, conocida como capacitación espermática, comienza en el útero y se completa en el istmo del oviducto (Lonergan *et al.*, 2016).

Una célula espermática consiste básicamente de una cabeza, parte media y cola (flagelo). La cabeza es el área en que se transporta la cromatina ésta contiene el ADN de un núcleo haploide, tiene capa que se llama acrosoma, la cual cubre el extremo anterior de la cabeza del espermatozoide, esta estructura contiene enzimas que se usarán para penetrar las membranas de la zona pelúcida (Rubinstein *et al.*, 2006). El acrosoma es un gran organelo similar a un lisosoma derivado de aparato de Golgi que se superpone al núcleo en la región apical de la cabeza del espermatozoide. Este orgánulo secreta enzimas como serina proteasa, acrosina, que ayudan a la penetración de los espermatozoides en la zona pelúcida (Kaji y Kudo 2004). La energía para la motilidad de la célula de esperma se genera en la pieza intermedia, donde abundan las mitocondrias.

El propósito de la cola del espermatozoide es proporcionar movimiento para poder llegar a donde se encuentra el ovocito (ámpula) y penetrarlo (Palma *et al.*, 2012). El ovocito tiene varias capas, las cuales el espermatozoide debe penetrar. Las capas son: el cúmulo oóforo, la zona pelúcida, el espacio perivitelino y la membrana vitelina. Las propiedades físicas de los espermatozoides y de los ovocitos permiten que cada uno de ellos se fusione y complete con éxito el acto de la fertilización (Rubinstein *et al.*, 2006).

Todos los aspectos físicos de los espermatozoides y de los ovocitos contribuyen a la penetración y fusión de las propiedades genómicas de los gametos (Parrish 2014). La unión de los espermatozoides a la zona pelúcida es un evento mediado por receptores y sólo un acrosoma intacto puede unirse a este receptor. Una vez que los espermatozoides se unen a la zona pelúcida, la proteína de unión del esperma estimula los eventos que conducen a la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosómica (Richards 2005). Una vez que el esperma ha penetrado en la zona pelúcida, se mueve al espacio vitelino y entra en contacto con la membrana vitelina del ovocito. Después de la fusión con el ovocito, la envoltura nuclear del esperma se rompe y la cromatina del espermatozoide y del ovocito migran al centro del óvulo donde comienza la unión de los cromosomas de los gametos (Parrish 2014). Posteriormente estas dos células haploides producen una célula diploide, que contiene la composición genómica de la descendencia. Estos pasos concluyen el acto de la fertilización y conducen al desarrollo de un embrión de una célula (Shimizu *et al.*, 2003; Young 2004).

3. Desarrollo embrionario temprano.

En el desarrollo del embrión ocurre en varias etapas diferentes como lo es la fertilización, las etapas de una, dos, cuatro, ocho células hasta llegar a la etapa de 16 células (desarrollo pluripotencial), posteriormente se desarrolla en mórula, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto eclosionado, reconocimiento materno de la preñez y la unión placentaria (Young 2004).

Después de la fertilización y unión de los dos pronúcleos (masculino y femenino), se desarrolla un cigoto que con el avance de tiempo se convertirá en embrión, el cigoto experimenta una serie de divisiones celulares sincronizadas, a este proceso también se le puede llamar escisión o clivaje (Scenna 2006).

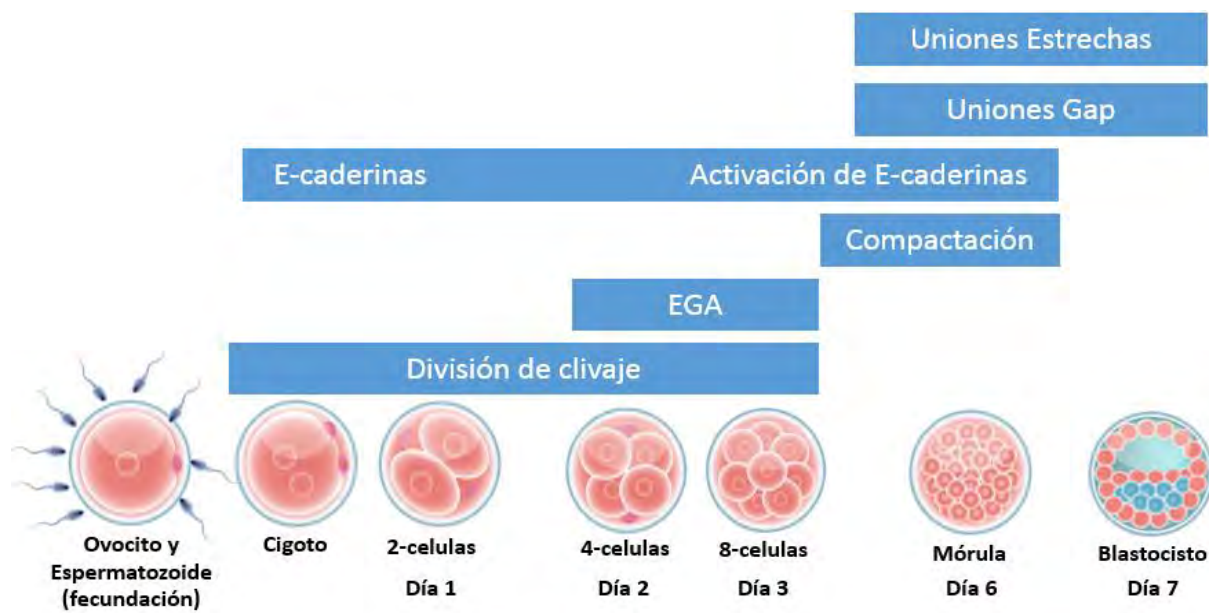


Figura 3. Eventos más importantes durante el desarrollo embrionario. EGA= Activación del genoma embrionario (Tomada y modificada de Scenna, 2006).

Durante el desarrollo embrionario después de la fertilización el cigoto empieza con una serie de divisiones celulares bien orquestadas. La primera división de la segmentación genera un embrión de dos células, y estas células se llaman blastómeros. A medida que el embrión temprano se transporta a través de la región del istmo del oviducto, cada blastómero sufre divisiones que producen embriones de cuatro, ocho, 16 y 32 células (Lonergan *et al.*, 2016) como se muestra en la figura 3. El embrión en el bovino ingresa al cuerno uterino en el día cinco o seis después del estro, en ese momento, los blastómeros se aplanan uno contra el otro formando una "bola sólida" de células llamada mórula. A partir de esta etapa del desarrollo embrionario, el embrión comienza a formar una cavidad llena de líquido (blastocelo), llamado y clasificado como blastocisto. La acumulación adicional de líquido dentro del blastocelo le permite al embrión expandirse (blastocisto expandido) y finalmente eclosionar (escapar) de la zona pelúcida (blastocisto eclosionado), esto aproximadamente el día nueve después del estro (Scenna 2006).

En los bovinos de leche un paso crítico para una preñez exitosa es eclosión del embrión, ya que en esta etapa se requiere un desarrollo filamentosos del embrión la unión en el endometrio uterino (Scenna 2006 y Gendelman *et al.*, 2010).

Para el establecimiento de una preñez viable en una hembra, en gran parte depende principalmente de los gametos funcionales, el ovocito en la hembra y el espermatozoide por parte del macho, la unión de estos gametos debe ocurrir dentro de la vida funcional de la hembra y se debe tener un ambiente uterino adecuado, con altas concentraciones de progesterona provenientes de un cuerpo lúteo funcional para garantizar un correcto desarrollo embrionario y fetal (Scenna 2006).

3.1. Activación del genoma embrionario.

Durante el desarrollo temprano *in vivo* del embrión bovino, este pasa los primeros cuatro días en el oviducto donde estará en contacto con el fluido oviductal. Durante este periodo ocurren cambios morfológicos y metabólicos muy importantes. Estos cambios incluyen, la primera división de escisión, la activación del genoma embrionario, la compactación, la formación del blastocelo y la diferenciación celular (Lonergan *et al.*, 2016). La activación del genoma embrionario se considera uno de los eventos más importante en el desarrollo embrionario temprano. Sin la activación del genoma, el embrión bovino detendría su desarrollo a un estadio mayor de ocho a 16 células, a este fenómeno se conoce como "bloqueo del desarrollo embrionario" (Meirelles *et al.*, 2004).

Se ha demostrado, que para que se pueda llevar a cabo la correcta activación del genoma embrionario, se necesita de una cascada de eventos moleculares y celulares (Al-Katanani *et al.*, 2002), como lo es la condensación de cromosomas, la finalización de la primera meiosis I (Hansen 2009; Palma *et al.*, 2012), cambios en los organelos como lo es el citoplasma, reordenamiento de las mitocondrias necesarias para la generación de energía para el desarrollo y activación del genoma embrionario (Gendelman *et al.* 2010). Referente a esto Gendelman y Roth (2012), realizaron un estudio donde midieron la expresión de genes

implicados en la maduración y desarrollo temprano en embriones producidos *in vivo* como *in vitro* en condiciones de EC y encontraron una menor expresión de GDF-9, POU5F1 y GAPDH en las primeras etapas de desarrollo embrionario necesarios para la activación del genoma embrionario.

3.2. Compactación y formación de blastocisto.

La compactación representa un evento crítico clave para el desarrollo embrionario en todos los mamíferos. Este evento permite la polarización y diferenciación de blastómeros en dos poblaciones celulares diferentes (mediante la inducción de moléculas de adhesión celular entre blastómeros que mejoran la comunicación celular y la adherencia), que facilitan la acumulación de líquido dentro del embrión que contribuyen directamente a la formación de blastocisto y posterior eclosión del embrión de la zona pelúcida (Geldelman *et al.*, 2010). Durante la compactación, los blastómeros se adhieren y se aplanan entre sí y no se pueden reconocer los límites entre las células (Geldelman y Roth, 2012). Esta compactación esta mediada por el aumento de los contactos interblastoméricos y por moléculas de adhesión, principalmente por las E-cadherina que inducen la polarización celular y la diferenciación de blastómeros en dos poblaciones de células (Scenna 2006).

Las E-cadherinas son glicoproteínas transmembrana mediadoras de la adhesión de célula-célula de forma homotípica (unión entre células con fenotipos similares). Existen tres dominios o regiones principales en las E-cadherinas (Scenna 2006 y Geldelman *et al.*, 2010):

- Dominio extracelular: responsable del reconocimiento específico de las mismas E-cadherinas presentes en las células vecinas
- Dominio transmembrana: este abarca la membrana celular
- Dominio citoplasmático: este se extiende en la célula y se asocia con las proteínas citoplasmáticas llamadas cateninas, que se unen a las cadherinas y a su vez a los filamentos de actina en el citoesqueleto

Se ha encontrado que las E-cadherinas son muy importantes en el ovocito del ratón durante el periodo inicial de la activación del genoma embrionario. Además,

las E-cadherinas juegan un papel muy importante en la adhesión entre los blastómeros para una correcta compactación del blastocisto (Scenna, 2006).

3.3. Estrés calórico.

El EC lo podemos definir, como la incapacidad de los animales para disipar suficiente calor y mantener la homotermia o mantener el equilibrio térmico (Sammad *et al.*, 2019), se debe principalmente a las altas temperaturas y humedad en el ambiente, a la radiación térmica, al escaso movimiento del aire y al calor metabólico en el caso de las vacas productoras de leche (Jeenali *et al.*, 2019). Cuando las vacas Holstein están en condiciones de EC se activa una respuesta de adaptación que puede provocar cambios fisiológicos, metabólicos, celulares y moleculares (Lopes *et al.*, 2012 y Alemu *et al.*, 2018) con el objetivo de mitigar el calor. Los animales homoeotérmicos tienen una zona termoneutral donde se mantiene la temperatura corporal normal constante dentro de un rango específico para lograr un gasto de energía es mínimo y productividad máxima (Wang *et al.*, 2020). La respuesta al EC depende de la gravedad y duración de la exposición al calor (Roth, 2021).

3.4. Índice de temperatura y humedad (ITH) como indicador de EC.

Para poder hacer una predicción del nivel de EC presente en los animales, un indicador aproximado más utilizado en la industria de ganado lechero es el ITH. Este incorpora los efectos de la temperatura ambiental con la humedad relativa (Polski, 2017). Este índice de predicción de EC fue utilizado por primera vez por Thom (1959), para la predicción del efecto de la temperatura ambiente en humanos.

El ITH se mide en unidades y dividir en categorías o rangos, de acuerdo a Armstrong (1994), cuando el ITH se encuentra <71 tenemos una zona de confort térmico, de 72 a 79 como un EC leve, 80 a 89 como estrés severo y >90 como EC muy severo. Se ha encontrado que dependiendo del rango de ITH se

observan respuestas biológicas diferentes, por ejemplo, De Rensis *et al.* (2015), demostraron que cuando se tiene un $ITH \geq 74$ causará una disminución drástica en la producción de leche.

3.5. Respuestas fisiológicas y conductuales al EC en vacas.

La regulación térmica de la vaca Holstein se basa principalmente en tres mecanismos físicos de pérdida de calor: conducción, conversión y radiación (Wang *et al.*, 2020.). A todo esto, cuando la temperatura corporal está por encima de la temperatura ambiente, el animal es capaz de mitigar o tener un intercambio de calor del cuerpo al medio ambiente por medio de las rutas mencionadas anteriormente. Sin embargo, cuando la temperatura ambiental alcanza o excede la temperatura corporal, estas rutas se pierden o no son suficientes para mantener la normotermia del animal (Collier y Gebremehin, 2015).

Otra vía de intercambio de calor del cuerpo al medio ambiente, es por medio de la evaporación (sudoración y jadeo). Es decir, en los animales con EC se aumenta la frecuencia cardíaca, lo que provoca un jadeo rápido y superficial.

Con respecto a las respuestas conductuales y adaptativas más rápidas de las vacas en lactancia frente al EC, estas son: el aumento de consumo de agua, la reducción de rumia e ingesta de alimento, así como la disminución de producción de leche y un bajo rendimiento reproductivo, es decir son estrategias metabólicas del animal para reducir el calor metabólico (Sammad *et al.*, 2019).

3.6. Efecto del EC sobre el sistema endocrino.

El EC durante el verano afecta negativamente varios procesos biológicos, teniendo como resultado una afectación en la tasa de concepción de las vacas (Sartori *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el aumento de la temperatura corporal durante el verano puede tener efectos directos o indirectos sobre el aparato reproductor, principalmente en el eje hipotálamo-pituitario-ovárico (Wolfenson y Roth, 2019 ; Roth, 2021).

La hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) son gonadotropinas que desempeñan funciones muy importantes, de las cuales destacan la regulación del crecimiento folicular, la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo (CL). Por lo tanto, cuando hay una deficiencia en la secreción de estas hormonas a consecuencia del EC, se podría afectar las funciones ováricas (Figura 4).

Wolfenson *et al.* (1995), encontraron que cuando hay una depresión de la LH por el EC, podría afectar la cascada de eventos que producen la ovulación, maduración de los ovocitos y formación de un CL funcional. Por otro lado, Roth *et al.* (2000), demostraron que en condiciones de EC la secreción de FSH aumenta y que esta se asocia con un aumento del número de folículos, probablemente debido a la disminución de inhibina proveniente de un folículo preovulatorio. Además, se sugiere que el aumento de la FSH puede ser la causa de dobles ovulaciones y partos gemelares durante el verano.

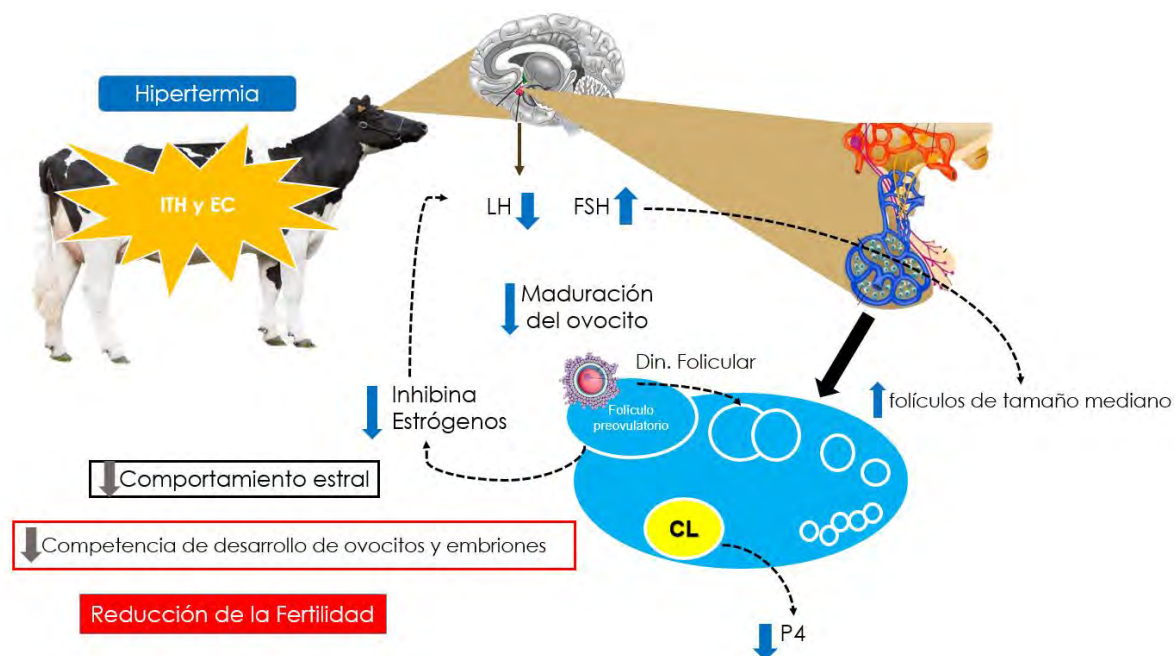


Figura 4. Esquema del efecto negativo del EC e ITH en la endocrinología de la vaca Holstein (Adaptada de Roth, 2020)

3.7. Efecto del EC en los folículos ováricos.

La foliculogénesis en el bovino es un proceso largo que dura aproximadamente 180 días (Sammad *et al.*, 2019). La dinámica folicular consiste en el reclutamiento, selección de folículos primordiales para su crecimiento para que finalmente se desarrolle un folículo dominante o preovulatorio. Se ha demostrado en estudios que el EC altera la dinámica folicular, de manera particular en los folículos preovulatorios (Roth, 2008 y Edwards *et al.*, 2009). Las causas por el cual el EC afecta la dominancia del folículo, se deben probablemente al número de folículos medianos y grandes provenientes de una onda folicular y por la duración prolongada de la dominancia del folículo preovulatorio (Wolfenson *et al.*, 1995).

Con respecto a la función folicular en condiciones de EC, se ha encontrado una baja producción de hormonas esteroideogénicas de los folículos (Badinga *et al.*, 1993), esto debido por una baja actividad de la enzima aromatasa en las células de la granulosa y por una baja concentración de estradiol en el líquido folicular proveniente del folículo dominante (Roth, 2015). La baja concentración de estradiol se puede asociar con la baja expresión o intensidad de estrógeno de las vacas durante el verano. Además, se ha encontrado que a consecuencia de la alteración de las hormonas esteroideogénicas puede provocar problemas en la ovulación y quistes ováricos (Wolfenson *et al.*, 2000).

Otra causa del EC en la producción esteroideogénica, es la alteración de la función lútea y la concentración de progesterona en la circulación sanguínea. Esta hormona tiene la particularidad de promover un ambiente uterino adecuado para la supervivencia del embrión.

3.8. Efecto del EC en los folículos preantrales y antrales.

Se ha demostrado que el EC afecta negativamente a los folículos antrales de manera *in vivo* (Roth 2015) como *in vitro* (De Aguiar *et al.*, 2020). Ya que existe evidencias de que el EC tiene efectos negativos en el desarrollo del folículo antral,

teniendo como respuesta a este estrés una deficiencia en la maduración y competencia de los ovocitos (Paula-Lopes, 2018; Roth 2017).

Pero en la última década se ha tomado el interés de investigar el daño del EC en los folículos preantrales. Esto debido a que la foliculogénesis comprende de varias etapas de los folículos preantrales, es decir antes del desarrollo de la cavidad antral. Existe poca información actual sobre como el EC afecta estas etapas, al respecto Paes *et al.* (2016), encontraron en un estudio donde midieron la supervivencia y desarrollo de folículos de bovinos cultivados *in vitro* con condiciones de EC (41 °C), afectaban la activación temprana de los folículos primordiales (dentro del tejido ovárico) y que los folículos preantrales secundarios (aislados del ovario) parecen ser menos sensibles al calor en menor medida. En este mismo sentido, De Aguiar *et al.* (2020), realizó un estudio donde también cultivaron folículos preantrales *in vitro* de bovinos en condiciones de EC y encontraron que el EC afecta negativamente todas las etapas de los folículos preantrales. Y que los folículos en etapa secundaria son más sensibles al EC, seguidos de los folículos primarios y secundarios tempranos. Estos hallazgos pueden dar una explicación del fenómeno de la baja fertilidad en la época de otoño, a causa del daño de los folículos preantrales.

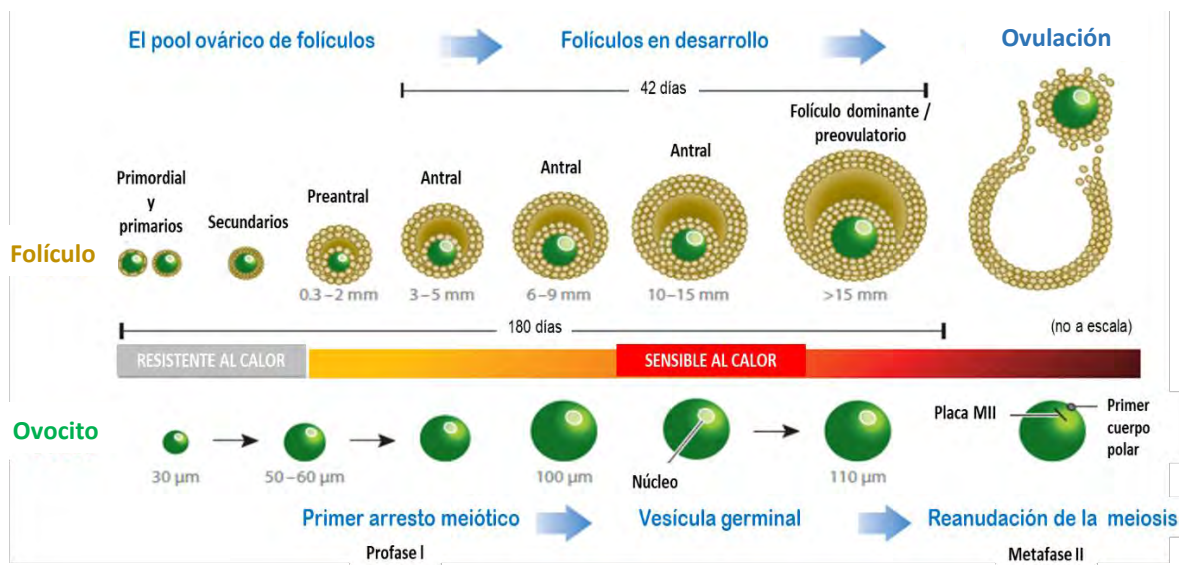


Figura 5. Diagrama de la resistencia y sensibilidad al estrés por calor en el pool ovárico de los folículos preantrales y antrales (Adaptado de Wolfenson y Roth, 2019).

3.9. Efecto del EC en el ovocito.

Se ha documentado que el EC tiene un efecto perjudicial en la reserva de ovocitos de las vacas bajo esta condición en un estudio realizado en vacas Holstein por Gendelman *et al.* (2010), donde encontraron una menor competencia ovocitaria en las primeras divisiones embrionarias hasta la etapa de blastocistos, cuando los ovocitos provenían de vacas con condiciones de EC (verano).

Además, se ha propuesto que se requiere de un periodo de dos a tres ciclos estrales para la recuperación del daño causado por el EC a los ovocitos. Este fenómeno se puede apreciar en la fertilidad en la época de otoño cuando el EC es considerado leve o cuando las vacas no están expuestas al EC (Roth *et al.*, 2001a).

Durante el periodo del folículo preovulatorio, el ovocito parece ser muy sensible al EC, ya que en estudios *in vivo* (Roth 2008) e *in vitro* (Lawrence *et al.*, 2004) donde los ovocitos estaban en condiciones de EC, se encontró que en respuesta estos producían especies reactivas de oxígeno.

Por otro lado, se ha demostrado que el microambiente dentro del folículo bajo EC, afecta la capacidad y viabilidad del ovocito. Lo que afecta negativamente la competencia del ovocito. La competencia del ovocito se define como el potencial que tiene este para madurar y someterse a una fertilización y desarrollo embrionario exitoso (Roth 2017). Otras posibles causas del daño en el ovocito por el EC, pueden deberse a los cambios morfológicos en las células de este, provocando un estrés oxidativo, fragmentación nuclear y deterioro mitocondrial (Roth, 2018).

Cuadro 2. Alteraciones celulares inducidas por el EC en los ovocitos en etapa vesícula germinal (GV) y durante la maduración (Paula-Lopes *et al.*, 2012).

Partes de la célula	Estructuras	Alteraciones	Referencias

		Ovocitos en etapa de VG	Ovocitos Madurados	
Citoplasma	Filamentos de actina	-----	Reducción de la polimerización de la actina pericelular y transzonal.	(Ju and Tseng, 2004; Tseng <i>et al.</i> , 2004; Roth and Hansen, 2005).
	Microtúbulos	-----	Desorganización de los microtúbulos.	(Ju and Tseng, 2004; Tseng <i>et al.</i> , 2004; Ju <i>et al.</i> , 2005; Roth and Hansen, 2005).
	Gránulos corticales (CG)	Aumento de la translocación de CG a oolemma.	Aumento de la translocación de CG a oolemma.	(Payton <i>et al.</i> , 2004; Edwards <i>et al.</i> , 2005).
	Mitocondria	Reducción de la actividad mitocondrial.	Reducción de la actividad mitocondrial.	(Ispada <i>et al.</i> , 2011; Lima, 2012).
	Proteínas	-Reducción de la síntesis proteica total. -La actividad de la caspasa del grupo II no se vio afectada.	-Reducción de la síntesis proteica total. -Aumento de la actividad de la caspasa del grupo II.	(Curci <i>et al.</i> , 1987; Edwards and Hansen, 1996; Edwards and Hansen, 1997).
Núcleo	Huso meiótico	-Reducción de la maduración meiótica (estadio MII). -----	-Reducción de la maduración meiótica (estadio MII). -Reducción del tamaño del huso meiótico.	(Roth and Hansen, 2004a; Lima, 2012). (Payton <i>et al.</i> , 2004; Roth and Hansen, 2005; Paula-Lopes <i>et al.</i> , 2008).
		ADN	Aumento de la fragmentación del ADN. (TUNEL positivo).	Aumento de la fragmentación del ADN. (TUNEL positivo).
	ARN	La cantidad de ARN total no se vio afectada.	La cantidad de poli (A) ARN no se vio afectada.	(Payton <i>et al.</i> , 2011; Gendelman and Roth, 2012).

Membrana	Lípidos	-Aumento del ácido graso saturado.	-----	-(Zeron <i>et al.</i> , 2001).
		-----	-Translocación de fosfatidilserina a la lámina externa de la membrana plasmática (Anexina-V).	-(Kalo and Roth, 2011).

4. Deterioro de la maduración nuclear y citoplasmática a causa del EC.

Se han realizado estudios *in vitro* de ovocitos bajo condiciones de EC inducido (40 °C a 41.5 °C) y se encontró una alteración en la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito (Jeenali *et al.*, 2019). Ya que la exposición a estas altas temperaturas durante la maduración, afectó la producción de microtubulina, microfilamentos responsables del transporte nuclear y organelar del ovocito (Roth y Hansen 2005). Como resultado la mayoría de los ovocitos no maduran correctamente y se detienen en las etapas de metafase I y II.

La maduración citoplasmática consiste en múltiples eventos, como lo es la reorganización de los orgánulos citoplasmáticos (gránulos corticales, mitocondrias y el retículo endoplasmático) a través de las acciones de los microfilamentos citoesquelético y por los microtúbulos como se puede observar en la figura 6 (Alamu *et al.*, 2018). En respuesta a todo esto, los ovocitos probablemente tendrán una baja probabilidad de ser fertilizados exitosamente y posterior desarrollo embrionario temprano hasta llegar a la etapa de blastocisto (Roth, 2015).

En cuanto a las alteraciones citoplasmáticas a causa del EC se encuentran los cambios del citoesqueleto, lo que afecta la organización de los microtúbulos y microfilamentos en el ovocito (Roth and Hansen, 2005). Estas alteraciones comprometen el transporte y distribución de los orgánulos citoplasmáticos, así como la separación de los cromosomas durante la fertilización y escisión del embrión (Paula-Lopes *et al.*, 2012). Durante la maduración de los ovocitos los microfilamentos de actina son fundamentales en traslocación de los gránulos corticales a la región cortical.

El EC afecta de igual manera a la estructura de los heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina de los microtúbulos del ovocito (Figura 6). En un estudio Ju *et al.* (2005), donde expusieron los ovocitos a temperaturas de 42 °C de manera *in vitro*, encontraron que estas altas temperaturas afectan negativamente en la polimerización y despolimerización de los microtúbulos, y esto probablemente afecte la separación de los cromosomas durante la fertilización y división embrionaria. Además, se ha demostrado que el EC causa una deformación de los microtúbulos en la etapa de metafase I y II, provocando la desorganización del huso meiótico y desalineación de los cromosomas (Roth y Hansen, 2005).

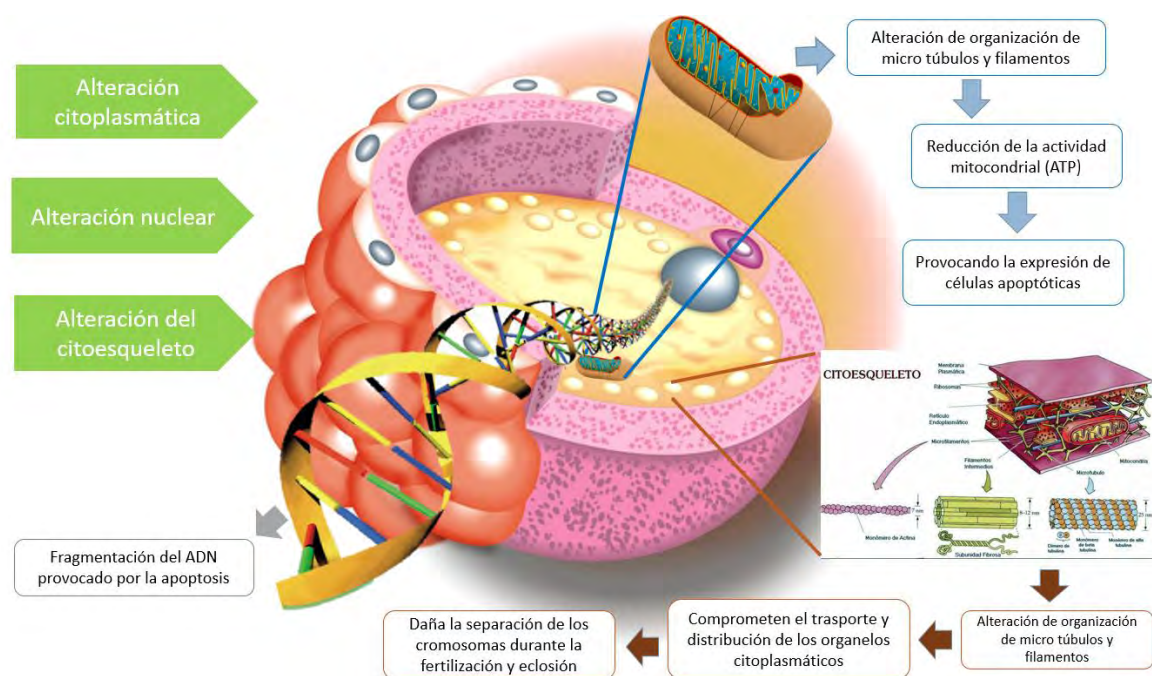


Figura 6. Esquema del efecto negativo del EC en la maduración del ovocito de vacas Holstein (Adaptada de Alamu *et al.*, 2018).

4.1. Alteraciones nucleares y deterioro de la función mitocondrial

La depresión de la maduración nuclear es uno de los cambios causados por el EC en los ovocitos bovinos (Paula-Lopes *et al.*, 2012). Esta alteración puede provocar una fragmentación del ADN y provocar la apoptosis del ovocito. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que el EC reduce la competencia en el desarrollo

de los ovocitos, tasas de maduración nuclear, escisión en los embriones (Paula-Lopes *et al.*, 2008).

Por otra parte, las mitocondrias son orgánulos citoplasmáticos que se encuentran en todas las células eucariotas y tienen la capacidad de generar trifosfato de adenosina (ATP), que es la principal fuente de energía de la célula y son esenciales para diversas funciones celulares (Roth, 2017). Las mitocondrias están involucradas en el metabolismo celular, en la homeostasis de la célula y juega un papel muy importante en la apoptosis. Además, están asociadas con la competencia del desarrollo de los ovocitos (Roth, 2015). Las mitocondrias del ovocito son la fuente de energía primaria (ATP) durante el desarrollo embrionario y el número de estas aumenta drásticamente a medida que crece el ovocito y durante las primeras etapas embrionarias (Roth, 2017).

Se ha demostrado de manera *in vitro* la importancia de los niveles de ATP durante la maduración en ovocitos bovinos (Gendelman y Roth 2012b). En estudios recientes se ha demostrado que las mitocondrias son las principales impulsadoras de la competencia en el desarrollo de los ovocitos y del desarrollo embrionario temprano y que las mitocondrias son muy sensibles al EC (Roth, 2021).

4.2. Apoptosis inducida por el EC en los ovocitos.

La apoptosis o también conocida muerte celular programada, es un proceso natural de las células que juega un papel crítico en el desarrollo y homeostasis tisular de los tejidos adultos (Loo, 2011). La apoptosis es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a estímulos estresantes. Las alteraciones inducidas por el EC en la función mitocondrial de las células del ovocito pueden inducir una activación de las cascadas apoptóticas como se puede observar en la figura 7 (Roth, 2017).

Sobre las causas estresantes en el ovocito al respecto, Nabeneshi *et al.* (2012), mencionan que se puede inducir la apoptosis por el exceso de las especies reactivas de oxígeno y por el agotamiento del glutatión. Por otro lado, Roth (2015)

menciona que en estudios realizados donde se han expuesto los ovocitos bovinos a temperaturas mayores de 40 °C durante la maduración *in vitro*, se tuvieron resultados que demuestran una expresión alta de las caspasas 2, 3 y 7 y mostraron una fragmentación nuclear (Roth 2017).

Las caspasas son proteínas clave en la transducción y ejecución de las señales apoptóticas por diferentes estímulos. Existen dos grandes grupos de caspasas, las denominadas iniciadoras y las ejecutoras (Elinos-Báez *et al.*, 2003).

Una vía de inducción de apoptosis es la llamada vía mitocondrial. En esta vía tenemos a la familia de genes Bcl-2 que regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria (Nabeneshi *et al.*, 2012). La activación de las proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 producen un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana; entre ellas, el citocromo c (Loo 2011). La liberación de la proteína citocromo c en la mitocondria es un evento clave que desencadena la activación rápida de las caspasas y proteasas celulares claves para la provocar la muerte celular (Elmore 2007).

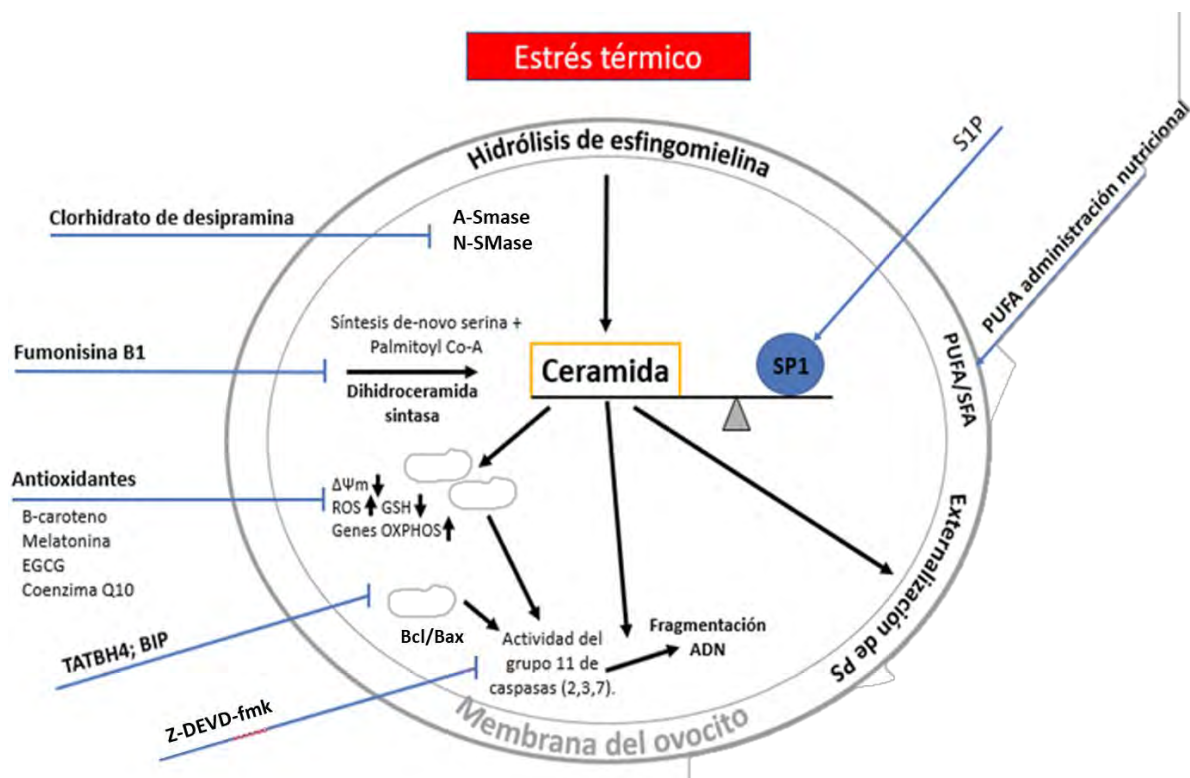


Figura 7. Apoptosis inducida por el choque térmico a través de la vía intrínseca de la esfingomielina a causa del estrés oxidativo y antioxidantes más utilizados en medios de producción de embriones *in vitro* (Adaptada de Roth, 2015). Fosfatidilserina (PS), Esfingomielinasa ácida (A-SMasa), Inhibidor específico Z-DEVD-FMK, Péptidos antiapoptóticos dominio BH4 de Bcl-xL (TAT-BH4), Péptido inhibidor de Bax (BIP), Galato de epigallocatequina (EGCG), Miembro mitocondrial reducido ($\Delta\psi_m$), Especies reactivas de oxígeno (ROS); Glutatión intracelular reducido (GSH); Fosforilación oxidativa deteriorada (OXPHOS), Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)

4.3. Efecto del EC en el embrión.

Como ya se ha mencionado antes, la gran parte del EC implica alteraciones en el folículo y ovocito, pero también el embrión antes de la implantación es muy sensible al EC. En este sentido se ha encontrado que en embriones de dos células son más sensibles al EC que aquellos en etapas avanzadas (Hansen, 2007). Esto probablemente se deba a la activación del genoma embrionario

durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Se ha propuesto que esto permite al embrión avanzado tener una capacidad de transcripción génica que le permite tener una mejor resistencia al EC. Uno de los mecanismos como defensa del embrión al EC es la apoptosis (Nabenishi *et al.*, 2011).

Además, se ha demostrado que el EC durante la gestación provoca una reducción del crecimiento fetal (Sammad *et al.*, 2019). Una de las causas más importantes por lo cual suceden las muertes embrionarias tempranas en los primeros días de gestación, es la calidad del CL y la baja producción de progesterona. En este mismo sentido, una baja concentración de progesterona plasmática durante la fase lútea del ciclo estral, puede comprometer el desarrollo folicular, maduración de los ovocitos y sobre todo puede provocar una muerte embrionaria temprana a causa de un fracaso en la implantación del embrión (Lamming y Royal 2001).

Otro mecanismo del efecto perjudicial del EC en los embriones, es la producción de radicales libres y la producción de antioxidantes en el desarrollo embrionario (Sakatani *et al.*, 2004).

4.4. Estrés oxidativo.

El ganado bovino y especialmente la raza Holstein está propensa a diversos tipos de estrés que pueden afectar su producción de leche, salud y desempeño reproductivo. Además, puede haber una combinación entre los tipos de estrés, por ejemplo, a causa del estrés térmico se puede inducir un estrés oxidativo en el animal (Roth, 2015). El estrés oxidativo es el resultado de una alteración en las concentraciones en estado estacionario de prooxidantes y antioxidantes, lo que conduce a una sobreproducción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS), y una disminución de la defensa antioxidante (Slimen *et al.*, 2016). Varios estudios han concluido que la exposición al calor aumenta la producción de ROS e induce estrés oxidativo, lo que puede provocar citotoxicidad, afectando negativamente la capacidad de maduración de los ovocitos, fertilización y desarrollo embrionaria (Bernabucci *et al.*, 2002). También

puede causar una alteración de los organelos celulares en el ovocito y embrión provocando la apoptosis celular (Nabenishi *et al.*, 2012 y Roth 2015). Además, se ha demostrado que el estrés oxidativo a causa del EC puede provocar trastornos metabólicos y enfermedades infecciosas (Li *et al.*, 2021).

El estrés por calor conduce a una sobreproducción de iones de metales de transición (TMI) al aumentar la tasa de liberación de hierro de la ferritina. TMI puede hacer donaciones de electrones al oxígeno, formando anión superóxido y / o peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Como es altamente reactivo, el O⁻₂ es el precursor de la mayoría de las ROS y un mediador en las reacciones oxidativas en cadena.

Los aumentos incontrolados de las concentraciones de ROS conducen a reacciones en cadena mediadas por radicales libres que se dirigen indiscriminadamente a proteínas, lípidos, polisacáridos) y ácido desoxirribonucleico (ADN).

También se ha demostrado que el EC aumenta las actividades de las enzimas antioxidantes, como lo son el superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) (Bernabucci *et al.*, 2002). El aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes en respuesta al aumento de los niveles de ROS tiene como objetivo mantener las controladas las concentraciones de radicales libres generados (Jeenali *et al.*, 2019).

Además, muchos autores informaron que las concentraciones de antioxidantes endógenos como el glutatión, las vitaminas (E, C y A) y el β-caroteno disminuyen durante la temporada de calor en múltiples especies animales (Kumar *et al.*, 2011). Esta disminución se explica por la movilización de antioxidantes celulares para desintoxicar los radicales libres generados por la exposición al calor y para preservar las concentraciones mínimas de los ROS (Figura 7).

4.5. Estrategias para mitigar el EC.

Estas estrategias se han propuesto con el propósito de mejorar la tasa de concepción en verano. Además, de tener el objetivo de prevenir la hipertermia

severa a la que pueden estar expuestos los animales. Para esto se han desarrollado diferentes estrategias de acuerdo al tipo de clima y nivel de EC. Una de las estrategias más común para mitigar el EC, es el proporcionar a los animales una sombra con el objetivo de eliminar la radiación directa (Roth, 2020b).

4.5.1. Sistemas de refrigeración

La modificación del medio ambiente en el que se encuentran los animales puede reducir la ganancia de calor y podría elevar la disipación de calor. El principal objetivo de las estrategias de refrigeración es mantener la temperatura ambiente más baja que la temperatura corporal del animal (Ortiz *et al.*, 2010b). En este sentido para que los sistemas de refrigeración sean eficaces se debe tener en cuenta la radiación solar, la temperatura ambiente y la humedad relativa, para mejorar o combinar los mecanismos termorreguladores que permitan a los animales intercambiar el calor con el medio ambiente, entre estos mecanismos se encuentran la convección, conducción, radiación y evaporación (Collier *et al.*, 2019).

El uso de ventiladores es una de las estrategias para mitigar el EC por medio de la convección en las explotaciones lecheras, y se utiliza este método para enfriar a las vacas con el movimiento del aire alrededor del animal (Ortiz *et al.*, 2010b). Esta estrategia solo es efectiva si la temperatura del aire es menor que la temperatura del animal. Existen tres principales métodos de sistemas de refrigeración más utilizados. Número uno: el uso de ventiladores de gran volumen a una baja velocidad, dos: ventiladores de bajo volumen y alta velocidad y tres: ventilación de túnel. El método de ventilador con agua rociada, consistió en tirar agua a baja presión sumada a la corriente de aire creada por los ventiladores suspendidos en el techo. Este sistema se utiliza normalmente en áreas de alimentación de regiones secas y semihúmedas (Armstrong 1994).

Para el método de ventilación por aspersión existen dos métodos: el primero consiste en utilizar aspersores que producen grandes gotas de agua que mojan

completamente a la vaca y que enfría al animal mientras que el agua se evapora, y el segundo método utiliza nebulizadores que producen pequeñas gotas de agua que permanecen suspendidas en el aire, que se evaporan antes de llegar al suelo y enfría el aire circundante (Ortiz *et al.*, 2010b). Estos métodos pueden funcionar muy bien en climas áridos (Wang *et al.*, 2020). El enfoque de estos sistemas es mantener al animal la mayor parte del tiempo o periodos de enfriamiento con periodos de 30 a 50 min tres veces al día, con el objetivo de maximizar el número de ciclos secos y húmedo por hora. Con esto se espera mantener la temperatura normal del animal durante los días con EC (Roth, 2020b).

Ortiz *et al.* (2010b), encontraron que los sistemas de enfriamiento evaporativo llamado Korral Kool, pueden ser una buena opción de mitigación de calor en las vacas en climas áridos con baja humedad, mostrando una mejora en el rendimiento productivo y reproductivo de las vacas. Este método consiste en producir una fina niebla en el aire mediante ventiladores para impulsar el aire y crear un movimiento ciclónico del aire para disminuir la temperatura del aire que rodea a las vacas.

4.5.2. Tratamientos hormonales.

Los tratamientos hormonales tienen el potencial de minimizar los efectos negativos del EC en los animales. Ya que se ha demostrado que uno de los principales efectos negativos en las vacas, son los celos silenciosos o la baja expresión del estro, provocando la pérdida de servicios o inseminaciones por concepción y a consecuencia de estos problemas se aumentan los días abiertos posparto en las vacas con EC (Sammad *et al.*, 2019). Por lo tanto, en condiciones de EC los programas de sincronización o utilización de gonadotropinas puede ser una estrategia buena para mejorar la fertilidad.

-El uso de GnRH y hCG: se ha propuesto que la aplicación de una dosis única de GnRH al inicio del estro, para reforzar la secreción del pico de LH y provocar la ovulación al momento de la inseminación artificial (IA) o luteinización del folículo dominante en vacas Holstein. Además, se ha estudiado la aplicación de

GnRH o hCG en el día 5 posinseminación puede mejorar la tasa de concepción. Esto debido a que la aplicación de la GnRH puede inducir la formación de CL accesorios para una mayor secreción de progesterona (Roth, 2020b). Por otro lado, la aplicación de GnRH entre los días 5 y 16 posteriores a la IA aumenta la tasa de concepción en climas áridos (Wolfenson y Roth, 2019).

-Uso de Ovsynch: objetivo de este tratamiento propuesto por primera vez por Pusley *et al.* (1995), se basa principalmente en la sincronización de la ovulación en los programas de IA en vacas Holstein para mejorar la tasa de preñez en la época de verano. Ya que se ha demostrado que el EC puede provocar una depresión del comportamiento estral de la hembra, creando un problema en la detección de celo, teniendo como resultado un aumento de servicios por concepción y días abiertos en las vacas (Sammad *et al.*, 2019).

-Uso de Progesterona: se ha estudiado la aplicación de progesterona exógena en las primeras etapas de la gestación en vacas, y se ha encontrado resultados favorables en la tasa de concepción. Esto probablemente se debe a que la progesterona aumenta la supervivencia del embrión al mejorar el ambiente uterino de la vaca. Además, se ha informado que el uso de un dispositivo intravaginal (DIV) de progesterona de liberación lenta, en el día 5 ± 1 después de la IA durante 13 días, se tuvieron resultados positivos en la tasa de concepción en la época de verano (Friedman *et al.*, 2014).

4.5.3. Transferencia de embriones producidos *in vitro*.

El uso de transferencia de embriones (TE) parece ser una estrategia nueva muy eficiente en las explotaciones lecheras en regiones cálidas (Sammad *et al.*, 2019). Negrón-Pérez *et al.* (2019), sugieren que con el uso de la TE puede ser eficaz para disminuir las muertes embrionarias tempranas que muy frecuentemente suceden en verano en las explotaciones lecheras. Esto posiblemente se debe, a que al utilizar embriones *in vitro* de más de 7 días en desarrollo, estos puedan tener una mejor resistencia al EC, y desarrollo para la hipertermia materna. Aunque hay estudios que demuestran que la utilización de

embriones en etapa de blastocisto tiene más probabilidad de resultar en gestación en comparación de una mórula tardía (Sakatani *et al.*, 2004). Esto se debe posiblemente a que estos embriones en etapas avanzadas del desarrollo tienen una mayor tolerancia al EC (Negrón-Pérez *et al.*, 2019). Por tal razón la TE pudiera ser una buena estrategia para mejorar la fertilidad, es porque los embriones que se transfieren ya pasaron la etapa más crítica (activación del genoma embrionario) para su desarrollo embrionario. Ya que se ha demostrado que la TE mejora las tasas de fertilidad durante el verano (Figura 8).

Por otro lado, en cuanto al uso de embriones congelados se ha encontrado que el uso de estos embriones para la TE tiene menos eficacia en comparación cuando se utilizan embriones frescos (Sakatani, 2017). En este mismo sentido se ha demostrado que las vacas que se les transfiere un embrión fresco tuvieron más probabilidades de quedar gestantes que las vacas que son inseminadas artificialmente en verano (Negrón-Pérez *et al.*, 2019), además la transferencia de embriones frescos supero de 9 a 12 puntos porcentuales a la transferencia con embriones congelados (Al-Katanani *et al.*, 2002). Aunque, se necesitan más estudios referentes a esta estrategia con el uso de embriones congelados o frescos.

Además, se informado de la adición de factores de supervivencia en los embriones producidos *in vitro*, como el uso de antioxidantes y factores de crecimiento en los medios que se utilizan en el laboratorio para el proceso de producción *in vitro*, minimizan el efecto negativo del EC durante el desarrollo embrionario y la apoptosis, por lo cual se ha propuesto que los embriones producidos *in vitro* pueden tener mejor resistencia al EC (Wang *et al.*, 2020).

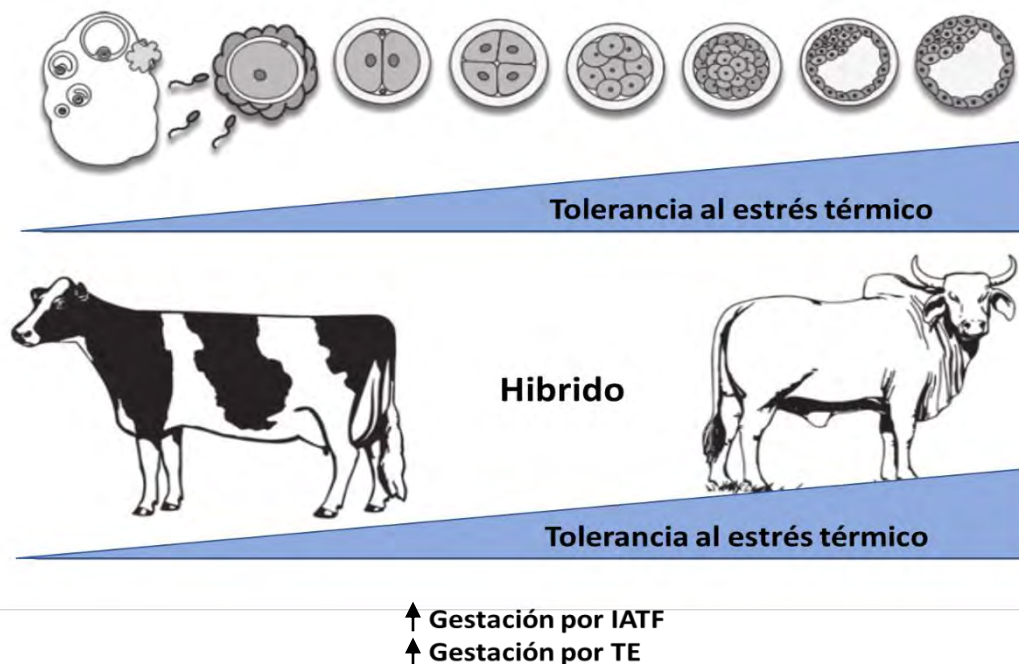


Figura 8. Tolerancia al EC en el desarrollo embrionario entre una *Bos indicus* y *Bos taurus*, con el uso de transferencia de embriones (TE) e inseminación a tiempo fijo (IATF) como estrategias para mejorar la fertilidad en vacas Holstein Friesian en verano (adaptada de Negrón-Pérez *et al.*, 2019).

4.5.4. Tolerancia al calor (mejora genética).

La magnitud de la respuesta del animal a temperaturas ambientales elevadas está definida por la especie de ganado y su estado fisiológico. La raza juega un papel muy importante en la influencia genética para la tolerancia al EC (Wang *et al.*, 2020.) La vaca Holstein de hoy en día están seleccionadas para una mayor producción de leche, pero no para una mejor fertilidad (Sammad *et al.*, 2019). Para la solución del problema que ocasiona el EC, se tiene que pensar en la fertilidad y tolerancia al EC en la selección de las nuevas generaciones de animales para producción en la industria lechera. Se deben identificar animales superiores que tengan genes y marcadores genéticos para la termotolerancia y la fertilidad. Existen características o condiciones que pudieran mejorar la tolerancia térmica, como lo es el color de pelaje, la densidad del pelaje y

condiciones de animales con pelo liso (Anzures *et al.*, 2019). Se hay realizado estudios que muestran que el color del cabello está asociado con la absorción de la radiación de calor y la longitud del cabello está relacionada con la pérdida de calor con las vías de conducción, convección, radiación y evaporación (Ortiz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2020).

4.5.5. Manejo nutricional.

Las estrategias de manejo nutricional para el ganado lechero bajo condiciones de EC, tienen como objetivo, ayudar a las vacas a mantener la homeostasis o prevenir las deficiencias de nutrientes (Lees *et al.*, 2019). Dentro de estas estrategias, una simple podría ser cambiar los tiempos de servida de la dieta, es decir alimentar a los animales en la mañana y tarde o de noche (Negrón-Pérez *et al.*, 2019). Esta estrategia tiene como objetivo que los animales no se alimentes en periodos de EC.

De las estrategias nutricionales más sugeridas son:

- ✓ Dietas de alta energía
- ✓ Suplementos probióticos de levaduras
- ✓ Uso de antioxidantes
- ✓ Control de la proporción de fibra en la dieta

La suplementación de vitaminas A, C y E y minerales, como el cobre (Cu) y zinc, se proponen como una alternativa que podrían disminuir el daño oxidativo debido a causa del EC. Ya que el Cu es parte de la estructura de la enzima glutatión peroxidasa y la dismutasa y la dismutasa contiene en su estructura química la vitamina E.

El consumo de materia seca es más bajo durante la estación de verano o en días calurosos, disminuyendo los nutrientes disponibles para la absorción y los nutrientes absorbidos se utilizan de manera menos eficiente (Das *et al.*, 2016). Se recomienda utilizar raciones con más de 18 % de proteína en base seca, ya que la sobrealimentación requiere más energía para excretar el exceso de nitrógeno en forma de urea (West, 2003).

Además, se ha encontrado que la suplementación con productos a base de levaduras juega un papel muy importante en la digestibilidad de los nutrientes al alterar la producción de ácidos grasos volátiles en el rumen, disminuyen la producción de amoníaco ruminal y aumenta la población de microorganismos en el rumen (Das *et al.*, 2016). Por tal motivo se requiere eficientar el manejo de la nutrición en los aspectos de balanceo, horarios de servida del alimento, evitar competencia del alimento, tamaño de la partícula entre otros factores importante que intervienen en el proceso fisiológico de los animales.

V. ARTÍCULOS

1 *Original Research Article*

2 **Effect of season on quantity and competence of oocytes recovered transvaginally**
 3 **from Holstein cows for *in vitro* fertilization**

4 H.Z. Guerrero-Gallego¹, G. Calderon-Leyva¹, O. Angel-García¹, J.M. Guillen-Muñoz¹,
 5 C. Leyva¹, M. Mellado², R. Pedroso³, L.G. Pessoa⁴, C. Esparza¹, and J.L. Morales^{1*}.

6 ¹Autonomous Agrarian University Antonio Narro, Laguna Unit, Torreon, Coahuila,
 7 Mexico. ²Autonomous Agrarian University Antonio Narro, Saltillo Unit, Saltillo, Coahuila,
 8 Mexico. ³Technical University of Manabi, Ecuador. ⁴Private practice⁴.

9 **ABSTRACT**

10
 11 **Background:** Season of the year can affect the reproductive behavior in Holstein cows, altering
 12 the competition of the oocytes, reflecting a reduced production of embryos. The objective of this
 13 study was to evaluate the average of total oocytes, competition of oocytes and embryos in the *in*
 14 *vitro* production process at different season of the year in Holstein cows.

15 **Methods:** During the four seasons of the year, was performed on each of the oocyte donor cows
 16 (winter, n = 957; spring, n = 1571; summer, n = 1776; autumn, n = 1128), by *in vivo* transvaginal
 17 follicular aspiration technique after the collection were subjected to the embryos production *in*
 18 *vitro*.

19 **Result:** The highest number of total embryos were produced in winter and autumn, compared to
 20 spring and summer (3.76 ± 0.16 and 3.54 ± 0.18 vs. 2.73 ± 0.11 and 2.45 ± 0.10 ; respectively,
 21 $P < 0.05$). During winter, a higher percentage of oocyte competition was observed, followed by
 22 autumn and spring, and less competition shown in summer (26.03 ± 0.39 , 19.08 ± 0.29 ,
 23 respectively, $P < 0.05$). The quantity and competence of the oocytes collected, and *in vitro* embryo
 24 production were drastically reduced during the hottest months of the year in this area of intense
 25 heat.

26

27 **Key Words:** Competence of oocytes, Embryos, Holstein, *In vitro* fertilization, Season.

28

29 ***Corresponding Email:** moralesnarrojlm@gmail.com

30 **1**Autonomous Agrarian University Antonio Narro, Laguna Unit, Torreon, Coahuila, Mexico

31

INTRODUCTION

32
33 It has been shown that the season of the year influences the reproductive behavior of dairy
34 cows (Hansen, 2019) which is due to an alteration of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis,
35 especially in seasons with intense heat (Autukaité *et al.*, 2021; Souza-Cácares *et al.* 2019). In this
36 sense, the heat stress (HS) decreases fertility in dairy cows causing a decrease in milk production
37 (Khanday *et al.*, 2019; Sandip *et al.*, 2019; Mellado *et al.* 2013), increases the days open and the
38 interval between calvings, and as a consequence, increases the culling rate of cows, which entails
39 a considerable economic loss (St-Pierre *et al.* 2003).

40 The high ambient temperatures negatively affect reproductive efficiency (Wolfenson and
41 Roth, 2019), among them are the modification of the estrous behavior of the cow reflected in a
42 poor expression of estrus, the follicular dynamics (Sammad *et al.* 2020), the decreased competition
43 of oocytes, and embryo quality (Hansen, 2019). In addition, thermal stress causes a low proportion
44 of embryos that reached the blastocyst stage (Roth, 2021), and increases the number of apoptotic
45 cells in follicles (De Aguiar *et al.* 2020) and in embryos produced *in vivo* and *in vitro* (Edwards *et al.*
46 2009).

47 Despite these studies, few studies have been done obtaining oocytes in different seasons of
48 the year with the *in vivo* transvaginal follicular aspiration technique (OPU) and subsequent *in vitro*
49 embryonic production (IVP) in lactating dairy cows. The objective of this study, was to evaluate
50 the average of total oocytes using the OPU technique on the competition of oocytes and embryos
51 in the *in vitro* production process at different season of the year in Holstein cows.

MATERIAL AND METHODS

52
53 All handling and maintenance of the animals used in this study were in accordance with
54 the guide for the ethical use of animals for research (FASS, 2010), and national (NAM, 2002).

Location of the study area and climatic conditions

55
56 The study was carried out in various commercial dairy farms in the same area (ratio of 35
57 km²) of northern México, located at coordinates 25° 31' N and 103° 13' W, at an altitude of 1,100
58 meters above sea level. The climatic conditions in this semi-arid region are mean annual rainfall
59 of 230 mm; average maximum temperature of 41.4 °C during May and June, and the lowest (-2

60 °C) during December and January. The relative humidity ranges between 20 and 55% (INIFAP,
61 2017).

62 **Experimental animals and groups**

63 For the development of the experiment, 5432 high-yielding Holstein cows between two
64 and three calvings were used, with 60 to 90 days in lactation, with a body condition of 3.5 on a
65 scale of 1-5 (Bernabucci *et al.* 2005). The health of all cows was monitored from calving to oocyte
66 collection and only cows that did not have reproductive disorders were selected according to
67 gynecological examination. The feeding and balancing of the diet was according to the
68 requirements described by the NRC (2001) for cows weighing 650 kg and daily milk production
69 of 35 kg. During the four seasons of the year 2017, OPU was performed on each of the oocyte
70 donor cows (winter, n = 957; spring, n = 1571; summer, n = 1776; autumn, n = 1128).

71 The OPU was performed *in vivo*, using ultrasound equipment (CHISON, Digital
72 Ultrasound System, Model: 8300 VET, 5.0 MHz Sectorial) connected to a vaginal transducer
73 coupled to a follicular aspiration guide with a 20 G × 2" cannula, which is joined by a follicular
74 aspiration system equipped with a 50 ml conical tube for collection with a vacuum pump (Pionner
75 Pro Pump, Pioneer Pro Pump Single -115v, Single Foot Pedal, PS 653, Canada), according to the
76 technique described by Solis *et al.* (2012).

77 The cumulus-oocyte complex (COC) collected in each aspiration session were counted,
78 morphologically evaluated, and classified, taking as a reference the criteria proposed by De Loos
79 *et al.* (1989) using grade I, II and III oocytes. After the evaluation, COC were subjected to the IVP
80 process according to the technique described by Paula-Lopes and Hansen (2002), in the
81 Reproductive Biotechnology laboratory of the Autonomous Agrarian University Antonio Narro,
82 Laguna Unit. The embryos obtained were morphologically evaluated following the procedure of
83 Bó and Mappletoft (2013).

84 The variables evaluated in this experiment were: average the oocytes recovered, total
85 embryos produced derived from oocytes collected, and percentage of oocyte competition.
86 Developmental competence is defined as the oocyte's ability to mature and undergo fertilization
87 and further embryonic development (Roth, 2017).

88 **Statistical analysis**

89 Data were evaluated using an ANOVA in a completely randomized design (PROC GLM
90 of SAS; SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). In case of observing significant differences among
91 seasons, the comparison of means was carried out with the PDIFF option of SAS. The differences
92 were considered significant at $P \leq 0.05$.

93

94

RESULTS AND DISCUSSION

95 **Total oocytes recovered:** Figure 1 shows the results of the total average of oocytes collected by
96 OPU in Holstein cows during the four seasons of the year. The total production of oocytes among
97 seasons differed ($P < 0.05$). The highest number of oocytes was obtained in winter, followed by
98 autumn ($P < 0.05$). The lowest oocyte production was observed in spring and summer, without a
99 not significant difference between them ($P > 0.05$).

100 In this study, it was observed that the number of oocytes obtained per cow was lower in
101 the seasons (spring and summer) with more intense heat, this probably was due to the effect of
102 higher environmental temperature, which affect the number of oocytes (De Rensis *et al.* 2015),
103 while in the wintertime a greater quantity of oocytes produced per cow was observed. This adverse
104 effect of high ambient temperature on reproduction has been reported in various studies (Hansen,
105 2019; Wolfenson and Roth, 2019). Results in terms of oocytes obtained in this work and from
106 previous studies may be due to the modification of the follicular dynamics of cows during high
107 environmental heat, which alters follicular dominance and decreases the size of medium-sized
108 follicles (Roth, 2021). Also, HS alters follicular development and compromises the development
109 potential of oocytes (Paula-Lopes *et al.* 2012) and this, in turn, could affect the number of suitable
110 follicles at the time of OPU. High environmental heat alters the hypothalamic-pituitary-gonadal
111 axis, ovarian follicles in the different stages of development, these could modify the general pattern
112 of follicular wave dynamics (Wolfenson and Roth, 2019) thus, affect the oocytes obtained from
113 cows subjected to OPU.

114 **In vitro embryo production:** Figure 2 shows the average number of total embryos derived from
115 oocytes collected by OPU in Holstein cows during the four seasons of the year. The highest number
116 of total embryos were produced in winter and autumn, compared to the spring and summer seasons
117 ($P < 0.05$).

118 Regarding embryo production, the results were consistent with the competition of oocytes,
119 since fewer embryos were produced in the summer, followed by spring and there was a greater
120 embryo produced in winter and autumn. These results may be explained by the findings of Walsh
121 *et al.* (2011) who documented that the inability of embryonic development is due to the poor
122 quality of the oocyte, which, as explained above, was found in the most intense hot seasons.

123 In various studies it has been proven that HS has unfavorable effects on the oocyte, these
124 same effects being the ones that could lead to a reduction in embryo production. In this study,
125 cleavage was not evaluated, however, and according to Gendelman and Roth (2012), the rate of
126 cleavage regardless of season is high when compared to fertilized oocytes that complete their
127 development into blastocyst. It could be that this is independent of the fact that the oocytes in the
128 season of intense heat are fertilized and may even cleave, as the competition of the oocytes is
129 affected as previously verified. Fertilized ovum may not have progressed in their development and
130 probably for this reason embryonic production was lower. In another experiment, it was reported
131 that heat stress during *in vitro* fertilization decreases fertilization success (Sakatani *et al.* 2015),
132 which supports the explanation of the lower embryonic production in the seasons with intense heat
133 compared with seasons with less severe heat (Payton *et al.* 2004).

134 **Competition of oocytes:** Figure 3 shows the percentage of competition of oocytes collected by
135 OPU throughout the year that developed to embryos in Holstein cows. The percentage of oocyte
136 competition through the times of the year significantly differed. That is, a higher ($P<0.05$)
137 percentage of competition was observed during winter, followed by autumn and spring seasons,
138 and the poorest competition occurred during summer ($P<0.05$).

139 In this sense, the competence of oocytes is a complex process that involves the integral
140 maturation of the oocyte and the acquisition of the capacity to achieve its development (Khanday
141 *et al.*, 2019; Hansen, 2019). In the same way that was observed in the above-mentioned variables,
142 the competition of the oocytes was greater in the temperate seasons compared to seasons with
143 intense warm weather. Some reports indicate the effect of season on the development of oocytes
144 (Silva *et al.* 2016; Gendelman and Roth, 2012) and, as in the present study, a decrease in their
145 growth and maturation was reported.

146 Again, the results of the present study could also be supported by what was proposed by
147 Wolfenson and Roth (2019), who mention that HS for prolonged periods could alter the follicular

148 microenvironment, damaging the competence of the cell, and for this reason, the oocytes would
149 have less capacity to cleavage and become an embryo. These findings could explain the decrease
150 in fertility of Holstein cows in hot months in the region where the present study was carried out
151 (Mellado *et al.* 2013).

152 Oocytes collected from Holstein cows during the summer have reduced oocyte
153 competition, and this is expressed by delayed division and a low rate of embryo development to
154 the blastocyst stage. This through the mechanism by which HS affects the competition of oocytes
155 implies cellular and molecular damage, resulting in a failure in the maturation and fertilization of
156 the oocytes (Roth, 2021).

157 CONCLUSIONS

158 The objective of this study was to evaluate the average total oocytes using the OPU
159 technique on the competition of oocytes and embryos in the *in vitro* production process at different
160 times of the year in Holstein cows. We conclude that the quantity, competition of oocytes and
161 embryo production *in vitro* varied markedly according to the time of year in which oocytes were
162 collected from Holstein cows in an area of intense heat, likewise, the time that had the greatest
163 negative effect on the variables evaluated were summer compared to winter.

164

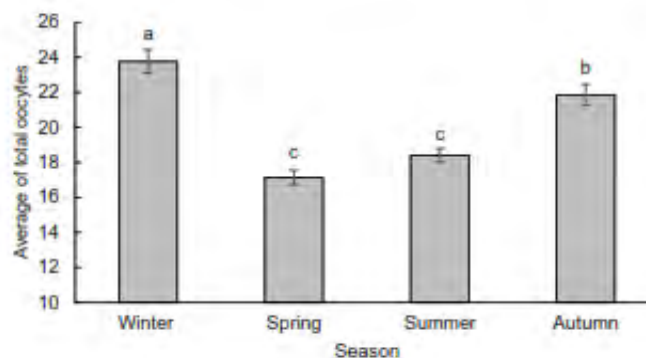
165 REFERENCES

- 166 Autukaitė, J., Poškienė, L., Juozaitienė, V., Antanaitis, R., Baumgartner, W. and Žilinskas, H.
167 (2021). The Influence of Thermal Stress on Serum Biochemical Profile in Sheep. *Indian Journal*
168 *of Animal Research*. **55**(6): 647-651. DOI:10.18805/IJAR.B-1349.
- 169 Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., and Nardone, A. (2005). Influence of Body Condition
170 Score on Relationships Between Metabolic Status and Oxidative Stress in Periparturient Dairy
171 Cows. *Journal of Dairy Science*. **88**(6): 2017-2026.
- 172 Bó, G.A., and Mappletoft, R.J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal*
173 *Reproduction*. **10**(3): 344-348.
- 174 De Aguiar, H.L., Hyde, A.K., Pedroza, H.G., and Denicol, C.A. (2020). Heat stress of impairs in
175 vitro development of preantral follicles of cattle. *Animal Reproduction Science*. **213**.

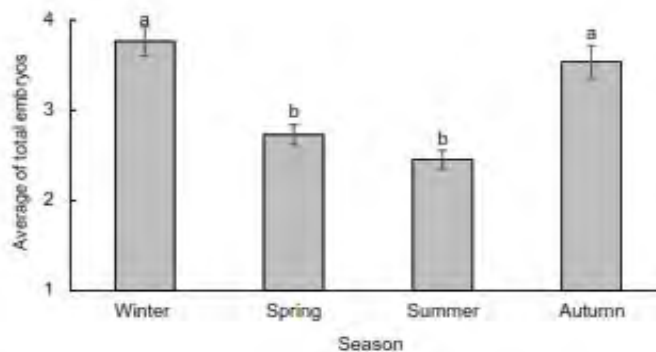
- 176 De Loos, F., Van Vliet, C., Van Maurik, P., and Kruip, T.A. (1989). Morphology of Immature
177 Bovine Oocytes. *Gamete research*. **24**: 197-204.
- 178 De Rensis, F., García-Ispuerto, I., and López-Gatiús, F. (2015). Seasonal Heat Stress: Clinical
179 Implications and Hormone Treatments for the Fertility of Dairy Cows. *Theriogenology*. **84**(5):
180 659-666
- 181 Edwards, J.L., Bogart, A.N., Rispoli, L.A., Saxton, S., and Schrick, F.N. (2009). Developmental
182 competence of bovine embryos from heat-stressed ova. *Journal Dairy Science*. **92**: 563-570.
- 183 FASS. (2010). Guide for the care and use of agricultural animals in agricultural research and
184 teaching, 3rd Edition, Federation Animal Science Society, Champaign, IL, USA. 177.
- 185 Gendelman, M., and Roth, Z. (2012). In vivo vs. in vitro models for studying the effects of elevated
186 temperatura on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression.
187 *Animal Reproduction Science*. **134**: 125-134.
- 188 Hansen, P.J. (2019). Reproductive physiology of the heat-stressed dairy cow: implications for
189 fertility and assisted reproduction. *Animal Reproduction*. **16**(3): 497-507.
- 190 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). (2017). Red
191 Nacional de Estaciones Agrometeorológicas Automatizadas.
192 <https://clima.inifap.gob.mx/lnmysr/Estaciones>
- 193 Khanday, S.B., Ahmed, J.A., Nashirudduliah, N., Sharma, U., and Chakraborty, D. (2019). Effect
194 of antioxidant ascorbic acid on in vitro maturation of Caprine oocytes under normal and elevated
195 temperatures. *Indian Journal of Animal Research*. **53**(8): 1020-1024.
- 196 Mellado, M., Sepulveda, E., Meza-Herrera, C., Veliz, F.G., Arevalo, J.R., Mellado, J., and De
197 Santiago, A. (2013). Effects of heat stress on reproductive efficiency of high yielding Holstein
198 cows in a hot-arid environment. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. **26**: 193-200.
- 199 NAM (2002). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy of Medicine,
200 Mexico and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care
201 International, Mexico, DF, Mexico.

- 202 National Research Council (NRC). (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh
203 Revised Edition, 2001. Washington, DC: The National Academies Press.
204 <https://doi.org/10.17226/9825>.
- 205 Paula-Lopes, F.F., and Hansen, P.J. (2002). Heat shock-induced apoptosis in preimplantation
206 bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biology of reproduction*. **66**: 1169-
207 1177.
- 208 Paula-Lopes, F.F., Lima, R.S., Risolia, P.H.B., Ispada, J., Assumpção, M.E.O.A., and Visintin,
209 J.A. (2012). Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. *Animal*
210 *Reproduction*. **9**(3): 395-403.
- 211 Payton, R.R., Romar, R., Coy, P., Saxton, M.A., Lawrence, L.J., and Lammett, J.E. (2004).
212 Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of
213 heat stress in vitro. *Biology of reproduction*. **71**: 1303-1308.
- 214 Roth Z. (2021). Heat stress reduces maturation and developmental capacity in bovine oocytes.
215 *Reproduction. Fertility and Development*. **33**: 66-75.
- 216 Roth, Z. (2017). Effect of Heat Stress on Reproduction in Dairy Cows-Insights into the Cellular
217 and Molecular Responses of the Oocyte. *Annual review of animal biosciences*. **5**: 2.1-2.20.
- 218 Sakatani, M., Yamanaka, K., Balboula, A.Z., Takenouchi, N., and Takahashi, M. (2015). Heat
219 stress during in vitro fertilization decreases fertilization success by disrupting anti-polyspermy
220 systems of the oocytes. *Molecular reproduction and development*. **82**: 36-47.
- 221 Sammad, A., Umer, S., Shi, R., Zhu, H., Zhao, X., and Wang, Y. (2020). Dairy cow reproduction
222 under the influence of heat stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. **104**: 978-
223 986.
- 224 Sandip K., Singh, S.K., and Srivastava A.K. (2019). Effect of I/M Se and Vit E administration
225 combined with cooler hours feeding regime on milk production in buffaloes in hot-humid climate
226 of Bundelkhand region. *Indian Journal of Animal Research*. **53**(9): 1258-1260.

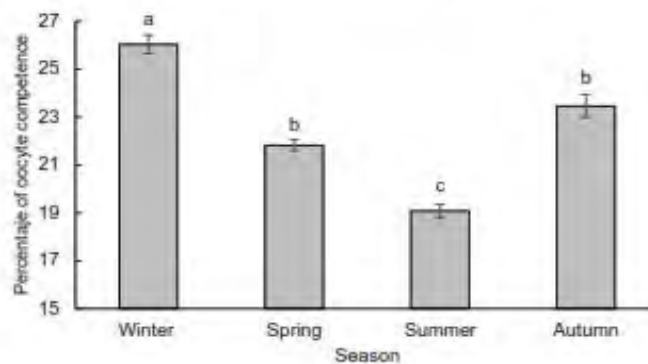
- 227 Silva, J.R.V., Van den Hurk, R., and Figueiredo, J.R. (2016). Ovarian follicle development in vitro
228 and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domestic Animal*
229 *Endocrinology*. **55**: 123-135.
- 230 Solís, C.A., Guerra, R., Sandoya, G., y De Armas, R. (2012). Efecto de sincronización de la onda
231 folicular y de la frecuencia de aspiración de foliculos en novillas de la raza Brahman. *Revista*
232 *electrónica de Veterinaria*. **13**.
- 233 Souza-Cácares, M.B., Fialho, A.L.L., Silva, W.A.L., Cardoso, J.T.C., Pöhland, R., Martins,
234 M.I.M., and Melo-Sterza, F.A. (2019). Oocyte quality and heat shock proteins in oocytes from
235 bovine breeds adapted to the tropics under different conditions of environmental thermal stress.
236 *Theriogenology*. **18**: 30860-4.
- 237 St-Pierre, N.R., Cobanov, B., and Schmitkey, G. (2003). Economic Losses from Heat Stress by US
238 Livestock Industries. *Journal of Dairy Science*. **86**: 52-77.
- 239 Walsh, S.W., Williams, E.J., and Evans, A.C.O. (2011). A review of the causes of poor fertility in
240 high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*. **123**: 127-138.
- 241 Wolfenson, D., and Roth, Z. (2019). Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Animal*
242 *Frontiers*. **9**: 32-38.



244 **Fig. 1 Total oocytes (mean \pm SEM) collected per cow via OPU in Holstein cows (n =**
 245 **5432) during the four seasons of the year. ^{a, b, c} = different letters indicate statistical**
 246 **difference ($P \leq 0.05$).**












247 **Fig. 2 Total embryos (mean \pm SEM) derived from oocytes collected per cow using the**
 248 **OPU technique in Holstein cows (n = 5432) during the four seasons of the year. a, b,**
 249 **= different letters indicate statistical difference ($P \leq 0.05$).**
 250



251 **Fig. 3 Percentage of competition of oocytes collected per cow using the OPU technique**
 252 **in Holstein cows (n = 5432) that developed into embryos (mean \pm SEM) during the**
 253 **four seasons of the year.**
 254

1 Effect of month of harvesting and temperature-humidity index on number and quality of oocytes and *in vitro*
 2 embryo production in Holstein cows and heifers

3 Guerrero-Gallego HZ¹ , Calderón-Leyva G¹ , Ángel-García O¹ , Guillén-Muñoz JM¹ , Veliz
 4 DFG¹ , Mellado BMA² , Pedroso SR³ , Moran MJ⁴ , Pessoa RLG⁵, Zatarain HFE⁵,
 5 Morales CJL^{1*} 

6 ¹Agrarian Autonomous University Antonio Narro, Department of Veterinary Science, Torreon, Mexico.

7 ²Agrarian Autonomous University Antonio Narro, Department of Animal Nutrition, Saltillo, Mexico.

8 ³Technical University of Manabí, Portoviejo, Ecuador, Faculty of Zootechnical Science ⁴Autonomous
 9 University of Coahuila, Faculty of Biological Sciences, Torreón, Mexico. ⁵Private practice, Torreón, Mexico

10 *Corresponding autor: moralesnarrojl@gmail.com

11 Abstract

12 The objective of the present study was to evaluate the effect of month of oocyte harvesting from Holstein cows
 13 and heifers and heat stress on oocyte number and quality, oocyte developmental competence, and total embryos
 14 produced in an area of intense ambient temperature for most of the year. A total of 5064 pluriparous lactating
 15 cows and 2988 nulliparous heifers were used. The oocytes were collected by the ovum pick-up technique and
 16 then subjected to the *in vitro* embryo production process in all seasons of the year. Overall, total oocytes per
 17 collection did not differ ($P>0.05$) between cows (16.6 ± 2.7) and heifers (15.1 ± 1.8), but oocyte developmental
 18 competence was lower ($P<0.05$) in cows (21.3 ± 5.4) than heifers (25.5 ± 4.0). For cows, total oocytes harvested
 19 were two-fold higher ($P<0.05$) in November than in May. For heifers, total oocytes harvested were highest in
 20 April (17.19 ± 0.53) and lowest in May (10.94 ± 0.32 ; $P<0.05$). For cows, total embryos were highest in
 21 November (2.58 ± 0.42) and lowest in August (1.28 ± 0.10 ; $P<0.05$). In addition, total oocyte harvested for both
 22 cows and heifers declined with a temperature-humidity index above 84. Furthermore, for both cows and heifers,
 23 total embryo production plummeted with $\text{THI} \geq 80$. Thus, taken together, these results indicate that severe heat
 24 stress impaired the number and quality of oocytes harvested from donor Holstein pluriparous cows and heifers,
 25 oocyte developmental competence, and total embryos produced in this area of intense ambient temperature for
 26 most of the year.

27 **Keywords:** Heat stress, Temperature-humidity index, Oocytes, Embryos, Ovum pick-up technique, Dairy
 28 cows.

29 **Statements and Declarations**

30 All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis
 31 were performed by Juan Luis Morales Cruz, Luiz Gustavo Pessoa Rocha, and Fernando Esteban Zatarain. The

32 first draft of the manuscript was written by Hugo Zuriel Guerrero Gallego and all authors commented on
33 previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

34 Conceptualization: Juan Luis Morales Cruz, Fernando Esteban Zatarain, Luiz Gustavo Pessoa Rocha;
35 Methodology: Juan Luis Morales Cruz, Hugo Zuriel Guerrero Gallego; Formal analysis and investigation:
36 Miguel Angel Mellado Bosque, Guadalupe Calderón Leyva; Writing - original draft preparation: Hugo Zuriel
37 Guerrero Gallego, Juan Luis Morales Cruz; Writing - review and editing: Juan Manuel Guillen Muñoz, Oscar
38 Ángel García, Francisco Gerardo Velíz Deras, Javier Moran Martínez; Funding acquisition: Juan Luis Morales
39 Cruz; Resources: Juan Luis Morales Cruz; Supervision: Luiz Gustavo Pessoa Rocha, Fernando Esteban
40 Zatarain, Hugo Zuriel Guerrero Gallego.

41 The research leading to these results received funding from the Agrarian Autonomous University Antonio
42 Narro, with project number: UAAAN -UL/1330-8241-2868. **Financial interests:** The authors have no
43 competing interests to declare that are relevant to the content of this article.

44 Introduction

45 For some years, several studies have revealed the importance of environmental conditions on the reproduction
46 performance of dairy cows subjected to heat stress (HS) (Edwards et al., 2009; Alemu et al., 2018; Amamou et
47 al., 2019; Sammad et al., 2020), which constitutes a significant challenge for the global milk production industry
48 and the welfare of cows (Polski et al., 2017; Li et al., 2021). Under these circumstances, dry matter intake is
49 reduced, water consumption is increased, and nutrient absorption is reduced (Becker et al., 2020).

50 Currently, HS is of great concern due to its detrimental impact on reproductive efficiency, especially in high
51 milk-producing cows (Slimen et al., 2016). Furthermore, high environmental temperature is considered the
52 main factor that places efficiency in animal production at risk (Li et al., 2021).

53 Thermal stress occurs when animals are exposed to temperatures that exceed their thermal comfort threshold or
54 when body temperature rises or falls from the thermoneutral zone of the animal (Wang et al., 2020). The
55 response to heat stress brings about physiological, metabolic, cellular, and molecular changes (Lopes et al.,
56 2012; Alemu et al., 2018).

57 In particular, Holstein cows subjected to increased heat stress present reproductive problems reflected in their
58 reproductive capacity and physiological and cellular functions in various tissues (Polski et al., 2017). It has
59 been shown that high ambient temperature compromises follicular growth, hormonal secretion, steroidogenesis,
60 as well as uterine and endometrial blood flow, causing a low potential in the development and quality of oocytes,
61 which later compromises the embryo development (Lopes et al., 2012; Khan et al., 2020). Under *in vivo*
62 conditions, embryonic development is affected by heat stress during days 1 to 7 after estrus (Slimen et al.,
63 2016). It has been observed that high ambient temperature can cause reversible or irreversible cell damage in
64 different structures and organelles of the embryo (Ortiz et al., 2010; De Aguiar et al., 2020). Such effects can
65 trigger an adaptive response and/or cell death (apoptosis) (Lopes et al., 2012).

66 In some areas of Mexico, high ambient temperatures are typical during spring, summer, and fall, which
67 drastically reduce the reproductive performance of dairy cows (Mellado et al., 2013). This detrimental effect
68 disturbs the quantity, quality, and competence of oocytes to develop into embryos (Ferreira et al., 2011;
69 Abdelatty et al., 2018). There is a paucity of literature on oocyte yield using the ovum pick-up (OPU) technique
70 and *in vitro* embryo production, based on large numbers of dairy cows. Therefore, this study aimed to evaluate
71 the effect of month of oocyte harvesting and the intensity of heat stress (temperature-humidity index) at the
72 time of *in vivo* collection of oocytes by the OPU technique on the oocyte traits and their developmental
73 competence *in vitro* embryo production (IVEP) in Holstein cows and heifers subjected to heat stress for the
74 most of the year.

75 Materials and methods

76 The handling of the animals used in this study was carried out following the guidelines for the ethical use of
77 animals for research (FASS 2010), national (NAM 2002), and institutional, with reference number UAAAN -
78 UL/1330-8241-2868.

79 *Location of the study area and climatic conditions*

80 The study was carried out in commercial dairy farms in northern Mexico (within a radius of 35 km²; 25° 31' N
81 and 103° 13' W), at an altitude of 1,100 meters above sea level. The region has a semi-arid climate with an
82 average annual rainfall of 230 mm; the average maximum temperature is 41.4° C during May and June, and a
83 minimum of -2° C during December and January. Relative humidity ranges between 20 and 55% throughout
84 the year (INIFAP 2018).

85 *Animals and handling conditions*

86 A total of 8052 Holstein cows were used, with a body condition score between 3.25 and 3.75 on a scale of 1-5
87 (Bernabucci et al., 2005); 5064 were pluriparous cows, and 2,988 were heifers. These animals were selected as
88 oocyte donors, the oocytes were collected using the OPU technique throughout the year (Figure 1).

89 Cows were selected considering a 305-d milk production greater than 10,000 kg in their previous lactation.
90 Cows underwent oocyte collection between 60 and 90 days post-partum. The feeding was following the NRC
91 (2001) requirements corresponding to its physiological state and milk production in the case of cows.

92 *Design of the experiment*

93 The OPU was performed *in vivo* according to the technique described by Solís et al. (2012), using ultrasound
94 equipment (CHISON, Digital Ultrasound System, Model: 8300 VET. 5.0 MHz sector), connected to a vaginal
95 transducer and coupled to a follicular aspiration guide with a cannula (20 G × 2"), attached to a suction circuit
96 equipped with a 50 mL conical tube for the collection of liquid with a vacuum pump (Pioneer Pro Pump, Pioneer
97 Pro Pump Single -115v, Single Foot Pedal, PS 653, Canada).

98 Subsequently, the cumulus-oocyte complexes (COC) collected in each OPU session were counted,
99 morphologically evaluated, and classified based on their quality according to De Loos et al. (1989) criteria.
100 Oocytes of grades I, II, and III were considered viable, and grade IV was deemed non-viable. After evaluation,
101 the COCs were subjected to the IVEP process according to the technique described by Paula-Lopes and Hansen
102 (2002). In brief, 20 oocytes were placed in 50 μ L microdroplets of maturation medium (TCM199 with Earle's
103 salts supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 iu of penicillin mL^{-1} , 0.01 mg of streptomycin mL^{-1} , two
104 μ g of estradiol mL^{-1} , 20 μ g of FSH mL^{-1} and 0.2 mmol of sodium pyruvate mL^{-1}) for 24 h at 37 °C with 5% CO_2
105 with humidified air. After *in vitro* maturation, COCs were washed in Hepes-TALP medium and transferred to
106 4-drop capacity plates, in groups of 30 oocytes per drop with fertilization medium containing 600 μ L of IVF-
107 TALP and 25 μ L of PHE (0.5 mM penicillin, 0.25 mM hypotaurine, and 25 μ M epinephrine in 0.9% NaCl
108 [w/v]) and were fertilized with 1×10^6 Percoll-purified sperm cells under the same conditions as *in vitro*
109 maturation. After 24 h, zygotes were separated from the surrounding cells by shaking them in Hepes-TALP
110 medium for 5 minutes in microcentrifuge tubes and washed two or three times with Hepes-TALP. Then, the
111 zygotes were placed in groups of 25 to 30 embryos in 50 μ L drops of optimized modified potassium simplex
112 medium, covered with mineral oil at 38 °C and 5% CO_2 (v/v) in humidified air. The embryos obtained were
113 morphologically evaluated according to what was described by Bó and Mappletoft (2013).

114 Oocyte competence was defined as the ability of the oocyte to mature, undergo fertilization, and develop into
115 embryo *in vitro*, 7 days after embryo culture (Roth 2015).

116 *Meteorological data and THI calculation*

117 Meteorological data were obtained from a climatological station located 18 km away from the dairy barn. Thus,
118 these data truthfully reflect weather conditions on the dairy farm. Climatic information consisted of daily
119 maximum temperatures in °C and relative humidity. In addition, the air temperature was recorded with a
120 mercury thermometer shielded from radiation and moisture but freely exposed to the air. This information was
121 used to calculate the daily temperature-humidity index (THI) using the following equation (Mader et al., 2006):

$$122 \text{ THI} = 0.8 \times \text{temperature} + \text{RH} / 100 \times (\text{temperature} - 14.4) + 46.4$$

123 RH refers to relative humidity. According to Armstrong (1994), Mader et al. (2006), and López et al. (2016),
124 $\text{THI} < 71$ is considered as a thermal comfort zone, 72 to 78 is considered as mild HS, 79 to 88 is severe HS, and
125 > 89 is extreme HS.

126 *Statistical analysis*

127 The data were evaluated by ANOVA in a completely randomized design (PROC GLM). When there were
128 statistically significant differences in the variables, comparison among months was carried out with the least
129 significant difference after Bonferroni corrections. Associations between THI and total oocytes collected, viable
130 oocytes, and oocyte developmental competence, and total embryos were evaluated using non-linear models

131 (CurveExpert Professional 2.5.6 4 software; Hyams Development, Madison, AL, USA). For all statistical
132 analyses, values with $P < 0.05$ were regarded as statistically significant.

133 Results

134 *Total oocytes*

135 The influence of month of oocyte collection in cows and heifers on total oocytes harvested is presented in Figure
136 2. Total oocyte collection markedly decreased ($P < 0.05$) in May for both cows and heifers. The highest number
137 of oocytes collected occurred in February and November for cows ($P < 0.05$) and February, March, April, and
138 November for heifers ($P < 0.05$). For both cows and heifers, total oocytes/collection steadily increased from May
139 to November. Total oocytes collected in November were two-fold higher than those collected in May.

140 For heifers, there was a fairly strong association ($P < 0.01$) between total number of oocytes recovered and THI
141 (Figure 3), with a steady decline in the number of oocytes from $\text{THI} = 76$ onwards. In the case of cows, oocyte
142 recovery plummeted at $\text{THI} = 86$.

143

144 *Viable oocytes*

145 The mean (\pm SD) population of viable oocytes recovered from cows and heifers by OPU is presented in Figure
146 4. For cows, the general tendency ($P < 0.05$) was for lower viable oocytes obtained during the warmer (summer)
147 months and, after that, a higher follicular population during the cooler (winter and fall) months. For heifers, the
148 months with the higher ($P < 0.05$) viable oocytes were February to April and November, with the lowest numbers
149 in summer and autumn months. For cows, the association between THI and viable oocytes was weak, with not
150 a clear tendency of heat stress on this variable (Figure 5). However, there was a tendency for lower viable
151 oocytes for heifers as THI increased ($r^2 = 0.42$).

152

153 *Oocyte developmental competition*

154 For cows, a tendency for a decline ($P < 0.05$) in oocyte developmental competition was observed from January
155 to September. Oocyte developmental competition was two-fold higher ($P < 0.05$) in December than September.
156 The highest ($P < 0.05$) oocyte developmental competition values were reached for heifers in January and
157 December, and the lowest in the summer months (Figure 6). For cows, oocyte developmental competition
158 markedly declined with $\text{THI} > 80$, whereas in heifers, a steady decline of this variable occurred from moderate
159 ($\text{THI} = 76$ to severe ($\text{THI} = 90$) heat stress (Figure 7).

160

161 *Total embryos*

162 The mean (\pm SD) total embryo produced per collection in heat-stressed pluriparous cows and heifers is
163 presented in Table 1. For cows, there was a significant difference ($P < 0.05$) in the number of embryos produced
164 per OPU session for the other months of the year. The highest mean number of embryos per OPU session was
165 recorded in the winter months and November, whereas the lowest values were registered in the summer months
166 (Figure 8). The same tendency was observed for heifers, although the reduction of embryo production in

167 summer was not as pronounced as in pluriparous cows. In cows, embryo production markedly declined when
168 THI reached 80 units, whereas, in heifers, there was a decline in embryo production from THI=78 (Figure 9).
169 However, surprisingly, the lowest embryo production did not coincide with the highest THI (90 units).

170

171 The general tendency as determined by this method (embryo production per OPU session per cow) was low,
172 with decreasing embryo production during the warm months, with a steady increase during the cooler months
173 (June to August) - with peak embryo production during spring (September to October).

174

175 In most months of the year, cows and heifers were exposed to high to extreme heat stress. Furthermore, when
176 THI increased to the level of very severe HS, the production of viable oocytes (OV) decreased ($P < 0.05$)
177 compared to months with mild THI. This effect was particularly negative during May where the THI range was
178 highest, leading to a very severe HS. Consequently, the production of OV decreased, which was reflected in the
179 last month of spring in both groups of animals. The highest OV viability in the cow group was observed during
180 February and November, with a moderate or mild HS. The months with the highest oocyte developmental
181 competence in heifers were February, March, April, and November, with mild or moderate THI.

182 Also, in December with a mild THI, a similar result was obtained to the month with a very severe THI range in
183 both groups. Table 1 shows that the months from May to August are the months with the highest average
184 environmental temperature, while the maximum temperatures reached 42 °C (May) and the minimum
185 temperatures were -5 °C (December), which coincided with lower oocyte viability in both groups in those
186 months.

187 A negative correlation was observed between the average total oocytes and the THI (Figure 3). In addition, THI
188 is the average OV in cows ($P < 0.043$) and heifers ($P < 0.007$). The mean of total embryos was higher in the
189 months with a high and severe THI, but with a very severe THI, lower means of embryo production ($P < 0.01$)
190 are present. Furthermore, in the case of cows, the negative effect of heat stress on embryo production was more
191 pronounced than heifers. This phenomenon was observed from May to September in both groups.

192 Discussion

193 *Total oocytes*

194 In the present study, the total number of oocytes obtained in cows and heifers was lower in the hottest months.
195 May was the lowest average number of total oocytes produced in both groups of animals. This is in line with
196 Rust et al. (2009), who observed a tendency for higher numbers of bovine oocytes aspirated during the colder
197 months and lower numbers during the hotter months. In addition, a negative correlation of this variable was
198 found with increasing THI. These results are possibly related to an affectation in the follicular dynamics (Roth,
199 2008; Edwards et al., 2009) since heat stress is one of the environmental factors that have more detrimental
200 effects on ovarian function, reducing oocyte development (López et al., 2016).

201 On the other hand, ultrasound studies have provided evidence that heat stress alters the dynamics of follicular
202 growth (Wolfenson and Roth, 2019; Roth 2021). The present study results confirm what was reported by
203 Gendelman et al. (2010), who performed follicular aspiration in Holstein cows during the summer and found
204 that the ovarian reserve of oocytes is sensitive to high environmental temperatures. Similarly, Wolfenson and
205 Roth (2019), found that heat stress alters gonadotropin secretion, which compromises the most essential
206 functions of the ovary, such as the regulation of follicular growth and oocyte maturation and development (Roth
207 2020b).

208 Furthermore, HS has been reported to depress GnRH and LH secretion, compromising their functions and
209 causing low ovulation (Wolfenson et al., 1995). Unlike LH, FSH secretion increases under heat stress conditions
210 and is associated with more follicles growing in the ovary (Wolfenson and Roth, 2019; Roth 2020a). Thus, the
211 variability in hormonal secretion can be a crucial point in explaining the alterations in oocyte development in
212 the different months of the year.

213 *Oocyte viability*

214 Both cows and heifers were subjected to heat stress during most months of the year. However, viable oocytes
215 did not differ among many winter, summer, and autumn months. Furthermore, the correlation between THI and
216 viable oocytes for both cows and heifers was moderate to low. These results are puzzling because it is well
217 documented that hyperthermia during *in vitro* maturation impairs various organizational processes in the
218 oocyte, such as migration of both cortical granules and mitochondria (Wang et al., 2009). Therefore, it has been
219 suggested that the partial congregation of mitochondrial distribution in the heat-stressed oocytes can be due to
220 poor intercession of mitochondrial translocation by microtubules (Ju et al. 2005; Roth and Hansen 2005). Roth
221 (2021), also observed that when oocytes *in vitro* are exposed to temperatures greater than 41 °C, they suffered
222 damage to the cytoplasm.

223 Another possible cause of the results of this variable is possibly because the viability of the oocytes is subjective
224 and depends on the experience and criteria of the evaluator. Although the present study was the same expert
225 technician who evaluated all the oocytes, which guarantees the reliability of the results, only the visual
226 morphology criterion was used for their selection. Wang and Sun (2007), indicate that the visual morphology
227 technique is not so exact, which could give a variability of results in the evaluation of this variable; therefore,
228 we suggest that more reliable techniques should be developed with more precise selection criteria of viable
229 oocytes with greater accuracy for maximizing IVEP.

230 *Oocyte developmental competence*

231 In cows, a lower oocyte developmental competence was observed from June to September and from June to
232 August in heifers. This result is probably because heifers are comparatively heat resistant due to less production
233 of metabolic heat and more heat dissipation efficiency, despite the fact that heifers were not cooled throughout
234 their growth phase. In the case of lactating pluriparous cows, body temperature increases with high ambient
235 temperature, and they could not dissipate body heat adequately to maintain thermal equilibrium (Bernabucci et

236 al., 2010). This heat accumulation would result in compromised reproduction function (Wolfenson and Roth
237 2019).

238 In heifers, oocyte developmental competence was negatively affected by increasing THI, although this
239 association was weak. In the case of the cows, the association between these variables was stronger. In heifers,
240 oocyte developmental competence in most months did not necessarily decrease, which may indicate that heifers
241 are more tolerant of heat stress than mature cattle, although they still suffer from HS to some degree. To
242 acclimatize to HS, heifers experience a series of physiological and metabolic changes to achieve the
243 redistribution of energy, hereafter the compromised growth performance (Wang et al., 2020).

244 This may be related to the metabolic expenditure to which cows are exposed due to the high production of the
245 ongoing lactation (Hansen 2019). In this sense, Roth (2020b) found that lactating cows have less capacity to
246 dissipate heat. On the other hand, Sartori et al. (2002) documented that cows with higher milk production have
247 a low efficiency in embryonic development, and consequently, a lower oocyte developmental competence than
248 non-lactating cows.

249 The present study's results agree with Gendelman et al. (2010), who observed a decrease in the oocyte
250 developmental competence of oocytes collected from Holstein cows in the summer and a delayed division in
251 the first embryonic divisions. Likewise, Roth (2020b) found a low proportion in the development of embryos
252 until the blastocyst stage in heat-stressed cows. On the other hand, it has been shown that the mechanisms by
253 which severe heat stress affects oocyte competence involve cellular and molecular damage (Al-Katani et al.,
254 2002). This leads to a failure in the maturation and fertilization of the oocytes. Furthermore, high temperatures
255 (41 °C) in the germinal vesicle stage reduce the meiosis and metaphase II stage in embryos (Lopes et al., 2012).

256 *Embryo production*

257 The embryo production obtained in the present study is comparable to the 2.1 embryos per OPU-IVEP
258 procedure for Holstein cows (Pontes et al., 2010). Still, it is much higher than values reported by Rust et al.
259 (2009), who never reached >0.5 embryos per collection in a commercial embryo production program using
260 OPU.

261 There was a marked reduction in embryo production in the warmest months; these differences were more
262 significant in cows than heifers. According to Roth (2015, 2018), two to three estrous cycles are needed to
263 recover the quality of oocytes damaged by high ambient temperatures. It is worthing to note that hyperthermia
264 of oocytes also hampers embryonic development, even in the absence of subsequent heat stress (Edwards et al.,
265 2009), which compromises fertility (Lopez-Gatius 2003).

266 In heifers, the effect of HS in summer on embryo production was not as clear as in cows. A possible explanation
267 is the greater tolerance capacity to heat stress and adjustments in their thermoregulation during heat stress than
268 lactating cows (Sartori et al., 2002). The lower embryo production derived from oocytes harvested in the
269 summer months is apparently due to the direct effects of HS on the embryo (Hansen 2019), which triggers

270 mechanisms that reduce its survival. Roth (2015) and Sakatani (2017) found a lower production of *in vitro*
 271 embryos in the warmer months than cold months.

272 Embryos in the early stages of development are more sensitive to heat stress (Hansen 2007), than in the
 273 blastocyst stage (Al-Katani et al., 2002). This possibly is due to the activation of the embryonic genome that
 274 occurs in the early stage of embryonic development and after it allows the embryo to develop thermotolerance
 275 (Roth 2020a). Another possible cause of low IVEP in months with high temperatures is due to low expression
 276 of the growth differentiation factor gene (GDF9; essential for the early development of the embryo; Gendelman
 277 et al., 2010) since according to Ferreira et al. (2016), during the summer there is a lower expression of this gene
 278 in the maturation of *in vitro* oocytes obtained from both heifers and lactating cows.

279 Conclusion

280 These results reaffirm that high-yielding dairy cows in a hot-arid environment at 25 °N are susceptible to heat
 281 load, which is reflected in the lower number and quality of oocytes harvested by ovum pick up, and the *in vitro*-
 282 resultant embryos. The effect of month and temperature-humidity index on oocyte recovery, quality, and *in*
 283 *vitro* embryo production is an important finding that affects the efficiency of this technology in the cattle
 284 industry. This information can be used to plan future *in vitro* embryo production programs for dairy cows. This
 285 strategic planning should enhance the results obtained with this technique and make the use of this procedure
 286 more cost-effective.

287 Acknowledgements

288 To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México for granting a scholarship for doctoral
 289 studies and to company ABS México S.A the C.V. for the support to this experiment.

290 References

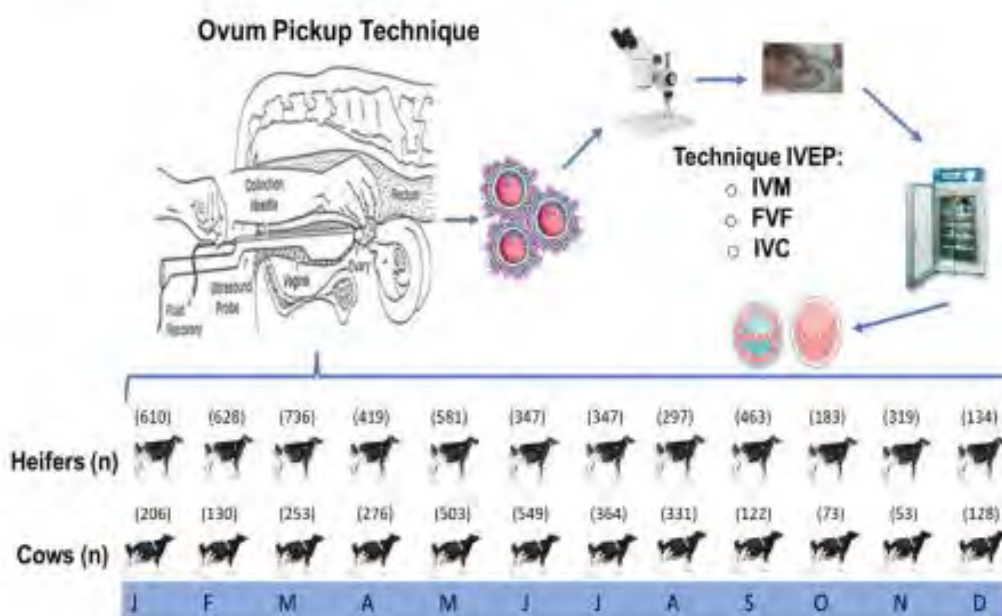
- 291 Abdelatty AM, Iwaniuk ME, Potts SB, Gad A (2018) Influence of maternal nutrition and heat stress on bovine
 292 oocyte and embryo development. *Int. J. Vet. Sci. Med* 6: S1-S5.
 293 <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.01.005>
- 294 Alemu WT, Pandey OH, Wondim SD, Gebremedhn S, Neuhofer C, Tholen E, Holker M, Schellander K, Tesfaye
 295 D (2018) Oxidative and endoplasmic reticulum stress defense mechanisms of bovine granulosa cells
 296 exposed to heat stress. *Theriogenology* 110: 130-141.
 297 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.042>
- 298 Al-Katani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ (2002) Effect of Season and Exposure to Heat Stress on Oocyte
 299 Competence in Holstein Cows. *J. Dairy Sci* 85(2): 390-396. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74086-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74086-1)
- 300
- 301 Amamou H, Beckers Y, Mahouachi M, Hammami H (2019) Thermotolerance indicators related to production
 302 and physiological responses to heat stress of holstein cows. *J. Therm. Biol* 82: 90-98.
 303 <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.03.016>

- 304 Armstrong D (1994) Heat stress interaction with shade and cooling. *J. Dairy Sci* 77(7):2044-2050.
305 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77149-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77149-6)
- 306 Becker CA, Collier RJ, Stone AE (2020) Invited review: Physiological and behavioral effects of heat stress in
307 dairy cows. *J. Dairy Sci* 103: 6751-6770. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17929>
- 308 Bernabucci U, Lacetera N, Baumgard LH, Rhoads RP, Ronchi B, Nardone A (2010) Metabolic and hormonal
309 acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal* 4(7): 1167-83.
310 <https://doi.org/10.1017/S175173111000090X>
- 311 Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, and Nardone, A (2005) Influence of Body Condition Score on
312 Relationships Between Metabolic Status and Oxidative Stress in Periparturient Dairy Cows. *J. Dairy*
313 *Sci* 88(6): 2017-2026. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72878-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72878-2)
- 314 Bó GA, and Mappletoft RJ (2013) Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod* 10(3): 344-
315 348.
- 316 De Aguiar HL, Hyde AH, Pedrosa HG, Denicol CA (2020) Heat stress of impairs in vitro development of
317 preantral follicles of cattle. *Anim Reprod Sci* 213. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106277>
- 318 De Loos F, van Vliet C, van Maurik P, Kruip TA (1989) Morphology of Immature Bovine Oocytes. *Gamete*
319 *research* 24(2):197-204. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120240207>
- 320 Edwards JL, Bogart AN, Rispoli LA, Saxton MA, and Schrick FN (2009) Developmental competence of bovine
321 embryos from heat-stressed ova. *J. Dairy Sci* 92: 563-570. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1495>
- 322 FASS (2010) Guide for the care and use of agricultural animals in agricultural research and teaching, 3rd
323 Edition, Federation Animal Science Society, Champaign, IL, USA. 177.
- 324 Ferreira RM, Ayres H, Chiaratti MR, Ferraz ML, Araújo AB, Rodrigues CA, Watanabe YF, Vireque AA,
325 Joaquim DC, Smith LC, Meirelles FV, Baruselli PS (2011) The low fertility of repeat-breeder cows
326 during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *J. Dairy*
327 *Sci* 94: 2383-2392. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3904>
- 328 Ferreira RM, Chiaratti MR, Macabelli CH, Rodrigues CA, Ferraz ML, Watanabe YF, Smith LC, Meirelles FV,
329 Baruselli PS (2016) The Infertility of Repeat-Breeder Cows During Summer Is Associated with
330 Decreased Mitochondrial DNA and Increased Expression of Mitochondrial and Apoptotic Genes in
331 Oocytes. *Biol Reprod* 94(3): 66. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.133017>
- 332 Gendelman M, Aroyo A, Yavin S, & Roth Z (2010) Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and
333 developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* 140(1): 73-82.
334 <https://doi.org/10.1530/REP-10-0055>
- 335 Hansen PJ (2007) Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated
336 temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology* 68: 242-
337 249. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.008>
- 338 Hansen PJ (2019) Reproductive physiology of the heat-stressed dairy cow: implications for fertility and assisted
339 reproduction. *Anim Reprod* 16(3): 497-507. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0053>

- 340 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (2018) Red Nacional de
 341 Estaciones Agrometeorológicas Automatizadas. <https://clima.inifap.gob.mx/lnmyvr/Estaciones>.
 342 Accessed 21 March 2021
- 343 Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE & Yang X (2005) Heat shock reduces developmental competence and alters
 344 spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology* 64: 1677–1689.
 345 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.03.025>
- 346 Khan A, Khan MZ, Umer S, Khan IM, Xu H, Zhu H, Wang Y (2020) Cellular and Molecular Adaptation of
 347 Bovine Granulosa Cells and Oocytes under Heat Stress. *Animals* 10(1): 110.
 348 <https://doi.org/10.3390/ani10010110>
- 349 Li H, Zhang Y, Li R, Wu Y, Zhang D, Xu H, Zhang Y, Qi Z (2021) Effect of seasonal thermal stress on oxidative
 350 status, immune response and stress hormones of lactating dairy cows. *Anim Nutr* 7(1): 216-223.
 351 <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.07.006>
- 352 Lopes FFP, Lima RS, Risolia PHB, Ispada J, Assumpcao MEOA, Visintin JA (2012) Heat stress induced
 353 alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. *Anim Reprod* 9(3): 395-403.
- 354 López G, Brizuela AB, Rondán G, Lissaso CM, Alejandra C, Kemerer AC, de los Santos M (2016)
 355 Determinación del índice de temperatura y humedad (ITH) para vacas lecheras, en el departamento
 356 Nogoyá, entre ríos. *Revista Científica Agropecuaria* 20: 57-65.
- 357 Lopez-Gatius F (2003) Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain.
 358 *Theriogenology* 60: 89-99. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01359-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01359-6)
- 359 Mader TL, Davis MS, Brown-Brandl T (2006) Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle.
 360 *J. Anim. Sci* 84(3): 712-719. <https://doi.org/10.2527/2006.843712x>
- 361 Mellado M, Sepulveda E, Meza-Herrera C, Veliz F, Arevalo J, Mellado J, De Santiago A (2013) Effects of heat
 362 stress on reproductive efficiency of high yielding Holstein cows in a hot-arid environment. *Rev
 363 Colomb Cienc Pec* 26: 193-200.
- 364 NAM (2002) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy of Medicine, Mexico and
 365 the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, Mexico,
 366 DF, Mexico.
- 367 National Research Council (NRC) (2001) Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition,
 368 2001. Washington, DC: The National Academies Press <https://doi.org/10.17226/9825>.
- 369 Ortiz XA, Smith JF, Bradford BJ, Harner JP, and Oddy A (2010) A comparison of the effects of 2 cattle-cooling
 370 systems on dairy cows in a desert environment. *J. Dairy Sci* 93: 4955–4960.
 371 <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3127>
- 372 Paula-Lopes FF, and Hansen PJ (2002) Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a
 373 developmentally regulated phenomenon. *Biol. Reprod* 66: 1169-1177.
 374 <https://doi.org/10.1093/biolreprod/66.4.1169>
- 375 Polsky LB, Augusto ML, Madureira EL, Drago F, Soriano S, Sica F, Vasconcelos ML, and Cerri LAR (2017)
 376 Association between ambient temperature and humidity, vaginal temperature, and automatic activity

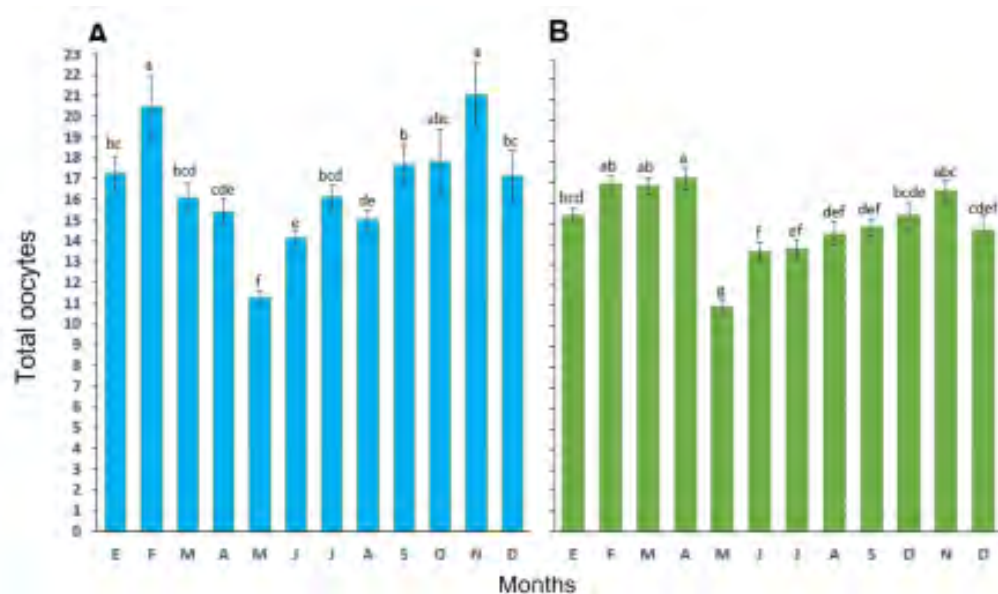
- 377 monitoring on induced estrus in lactating cows. *J. Dairy Sci* 100: 1–12.
 378 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12656>
- 379 Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, Sanches BV, Porcionato JPF, Vieira
 380 PHS, Faifer FS, Sterza FAM, Schenk JL, Seneda MM (2010) Large-scale in vitro embryo production
 381 and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm.
 382 *Theriogenology* 74: 1349–1355. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.004>
- 383 Roth Z, and Hansen PJ (2005) Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in
 384 bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction* 129(2): 235–244.
 385 <https://doi.org/10.1530/rep.1.00394>
- 386 Roth Z (2021) Heat stress reduces maturation and developmental capacity in bovine oocytes. *Reprod. Fertil*
 387 *Dev* 33: 66–75. <https://doi.org/10.1071/RD20213>
- 388 Roth Z (2008) Heat Stress, the Follicle, and Its Enclosed Oocyte: Mechanisms and Potential Strategies to Improve
 389 Fertility in Dairy Cows. *Reprod Dom Anim* 43: 238–244. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01168.x>
- 391 Roth Z (2015) Physiology and endocrinology symposium: Cellular and molecular mechanisms of heat stress
 392 related to bovine ovarian function. *J. Anim. Sci* 93(5): 2034–2044. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8625>
- 394 Roth Z (2018) Symposium review: Reduction in oocyte developmental competence by stress is associated with
 395 alterations in mitochondrial function. *J. Dairy Sci* 101(4): 3642–3654.
 396 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13389>.
- 397 Roth Z (2020^a) Reproductive physiology and endocrinology responses of cows exposed to environmental heat
 398 stress - Experiences from the past and lessons for the present. *Theriogenology* 155: 150–156.
 399 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.040>
- 400 Roth Z (2020^b) Influence of heat stress on reproduction in dairy cows—physiological and practical aspects. *J.*
 401 *Anim. Sci* 98: S80–S87. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa139>
- 402 Rust JM, Visser DS, Venter JE, Boshoff MP, Foss S, Greyling JP (2009) The effect of season on aspects of in
 403 vitro embryo production in sub-fertile beef cows. *South African. J. Anim. Sci* 39: 275–279.
- 404 Sakatani M (2017) Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced in vitro. *Journal of*
 405 *Reproduction and Development* 63(4): 347–352.
- 406 Samnadi A, Umer S, Shi R, Zhu H, Zhao X, and Wang Y (2020) Dairy cow reproduction under the influence
 407 of heat stress. *J. Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 104: 978–986. <https://doi.org/10.1111/jpn.13257>
- 408 Sartori R, Sartor-Bergfeldt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC (2002) Fertilization and early
 409 embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter.
 410 *J Dairy Sci* 85(11): 2803–12. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74367-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74367-1)
- 411 Slinen BI, Najari T, Ghram A, Abdrabba M (2016) Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and
 412 metabolic aspects, a review. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 100(3):
 413 <https://doi.org/10.1111/jpn.12379>

- 414 Solís CA, Guerra R, Sandoya G, y De Armas R (2012) Efecto de sincronización de la onda folicular y de la
 415 frecuencia de aspiración de folículos en novillas de la raza Brahman. Revista electrónica de
 416 Veterinaria. 13.
- 417 Wang JZ, Sui HS, Miao DQ, Liu N, Zhou P, Ge L, Tan JH (2009) Effects of heat stress during in vitro
 418 maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. Reproduction 137: 181-189.
 419 <https://doi.org/10.1530/REP-08-0339>
- 420 Wang J, Li J, Wang F, Xiao J, Wang Y, Yang H, Li S, and Cao Z (2020) Heat stress on calves and heifers: a
 421 review. J Animal Sci Biotechnol 11: 79. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00485-8>
- 422 Wang Q, and Sun QY (2007) Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors.
 423 Reprod. Fertil. Dev. 19: 1–12. <https://doi.org/10.1071/RD06103>
- 424 Wolfenson D, and Roth Z (2019) Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. Animal Frontiers 9:
 425 32-38. <https://doi.org/10.1093/af/vf027>
- 426 Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga LJ, Savio DR, Meidan BJ, Lew R, Braw-Tal, and Berman A (1995)
 427 Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. Biol.
 428 Reprod 52(2): 1106-1113. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.5.1106>
- 429



430

431 **Fig. 1** Scheme of the oocyte collection throughout the year using the ovum pick up (OPU) technique and the
 432 stages of the in vitro embryo production (IVEP) technique to which the oocytes from cows and heifers were
 433 subjected. IVM – *In vitro* maturation, IVF – *In vitro* fertilization, IVC – *In vitro* culture. Number in brackets
 434 are number of animals subjected to OPU per month



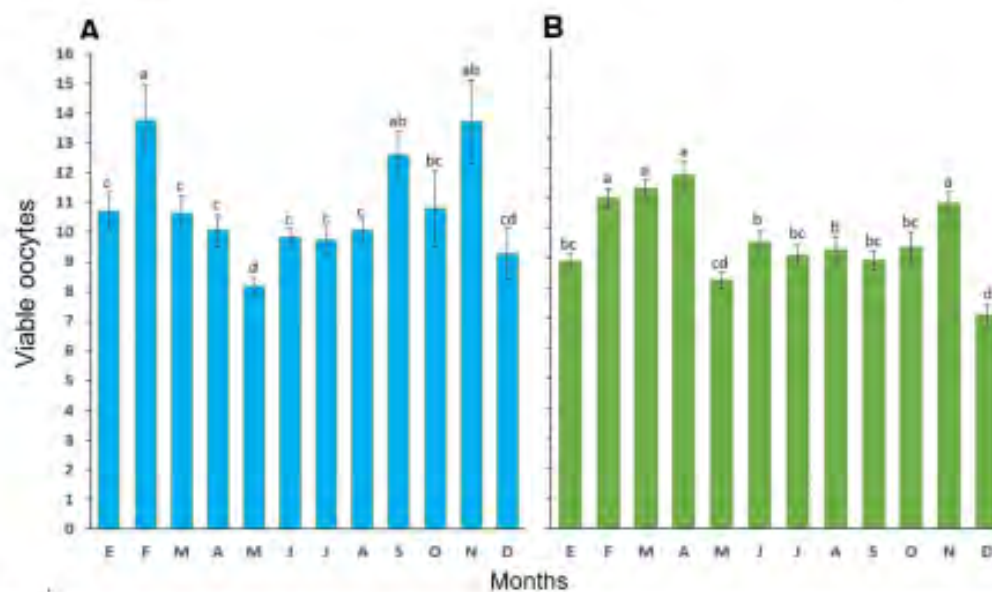
435

436

437

438

Fig. 2 The mean (\pm SD) of total oocytes harvested following oocyte recovery procedure (OPU) from high-yielding pluriparous cows (A) and heifers (B) in a hot environment. ^{a,b,c,d,e,f,g} - different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$)



439

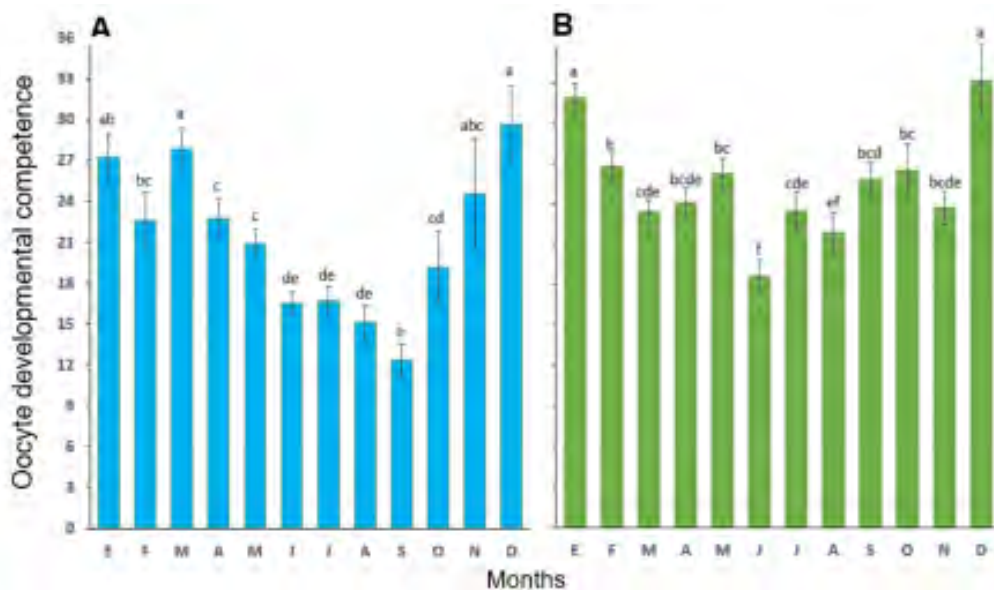
440

441

442

443

Fig. 4 The mean (\pm SD) of total viable oocytes harvested following oocyte recovery procedure (OPU) from high-yielding pluriparous cows (A) and heifers (B) in a hot environment. ^{a,b,c,d} - different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$)



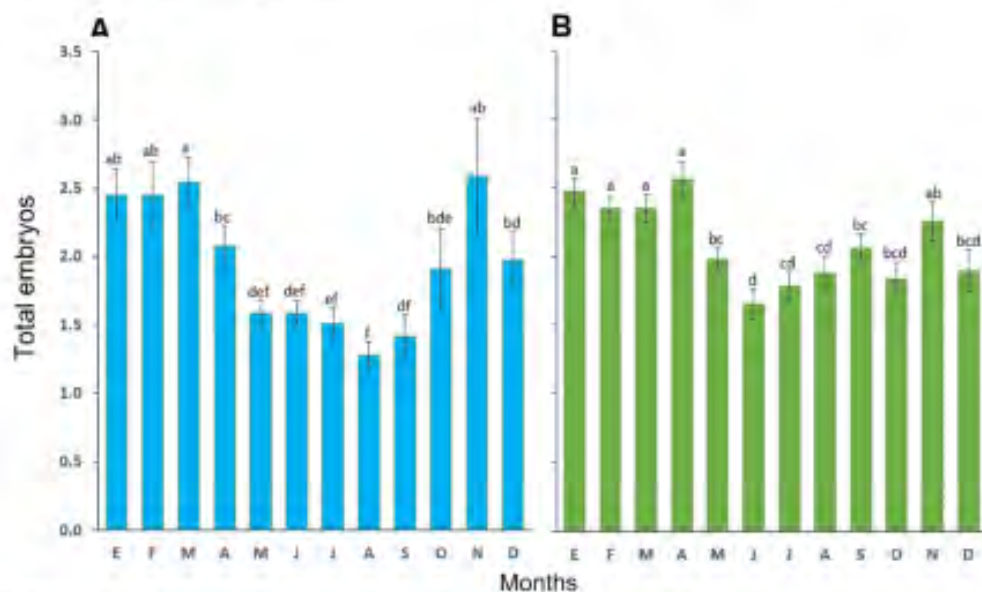
444

445

446

447

Fig. 6 The mean (\pm SD) of oocyte developmental competence harvested following oocyte recovery procedure (OPU) from high-yielding pluriparous cows (A) and heifers (B) in a hot environment. ^{a,b,c,d,e,f} – different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$)



448

449

450

451

452

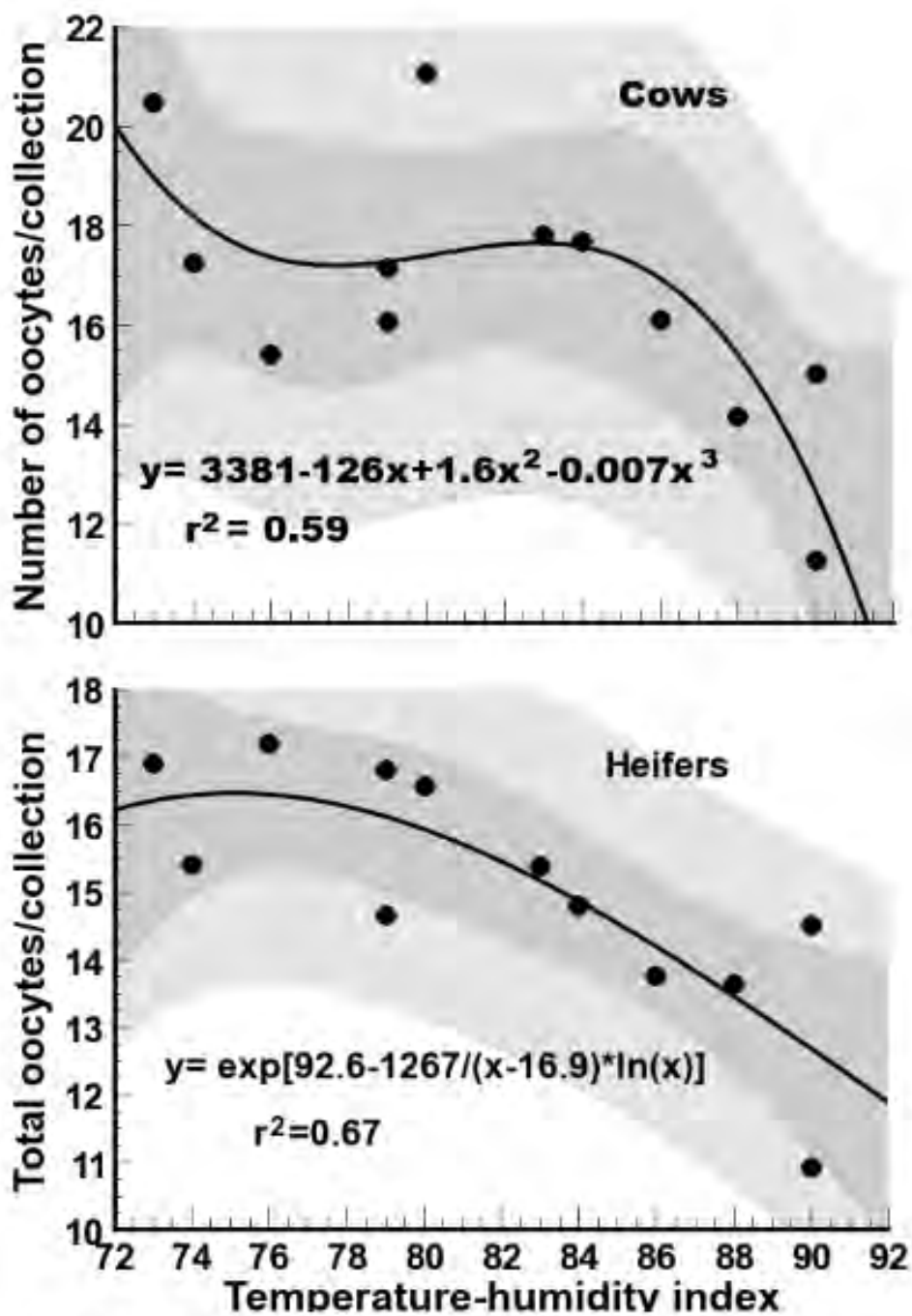
453

Fig. 8 The mean (\pm SD) of total embryos derived from oocytes harvested following oocyte recovery procedure (OPU) from high-yielding pluriparous cows (A) and heifers (B) in a hot environment. ^{a,b,c,d,e,f} – different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$)

454 **Table 1.** Average temperature (\pm SE), maximum and minimum ($^{\circ}$ C) recorded per month in 2018 (INIFAP,
 455 2018).

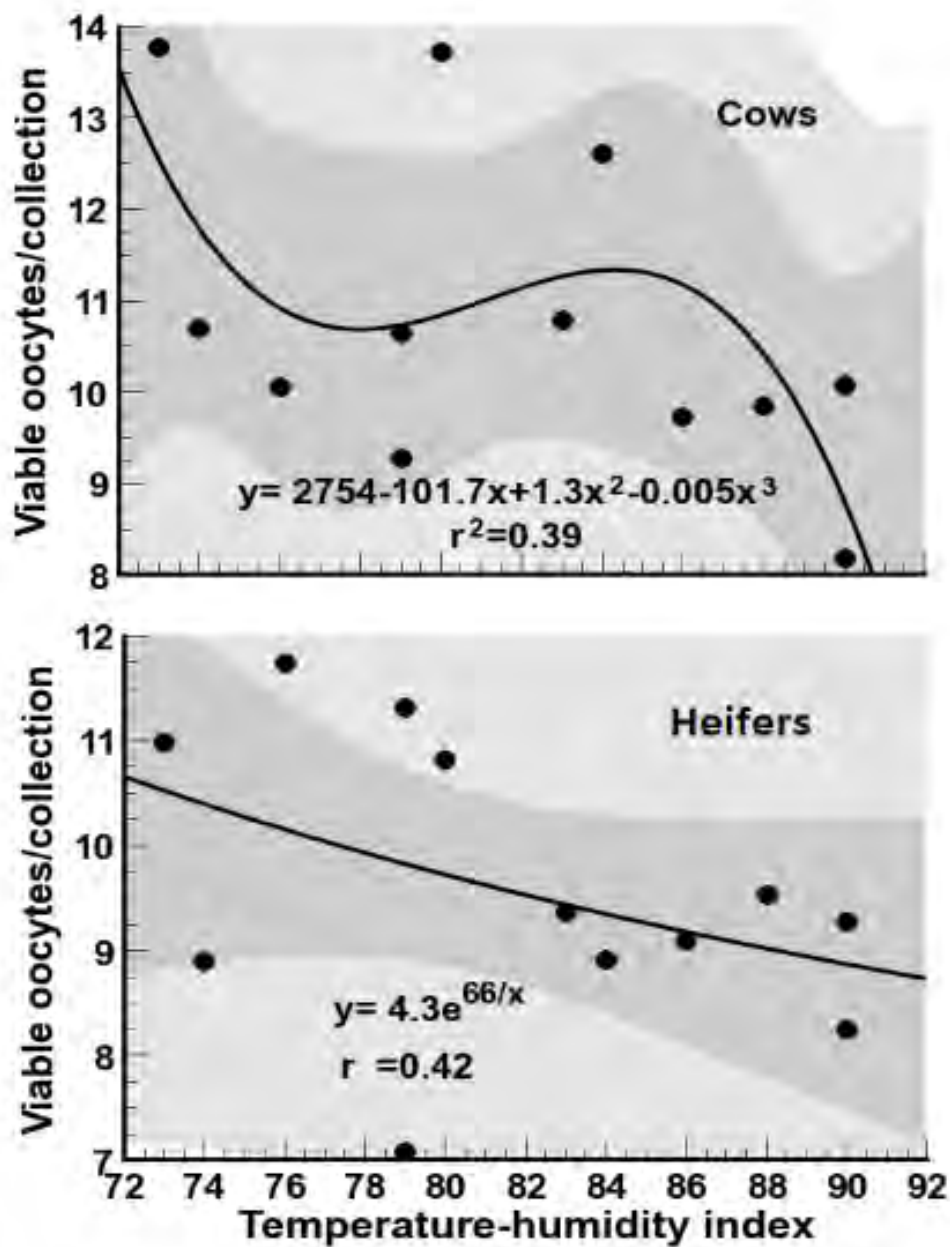
456

Months	Average	Maximum	Minimun
January	14.65 \pm 2.13	29	1
February	14.85 \pm 2.77	28	2
March	20.79 \pm 1.94	35	7
April	21.80 \pm 1.55	30	5
May	27.42 \pm 1.56	42	10
June	29.30 \pm 1.34	39	17
July	28.88 \pm 1.24	39	20
August	27.94 \pm 1.27	38	16
September	24.81 \pm 1.48	37	15
October	22.03 \pm 1.55	33	11
November	17.83 \pm 1.86	34	2
December	11.93 \pm 1.58	27	-5



457
458
459

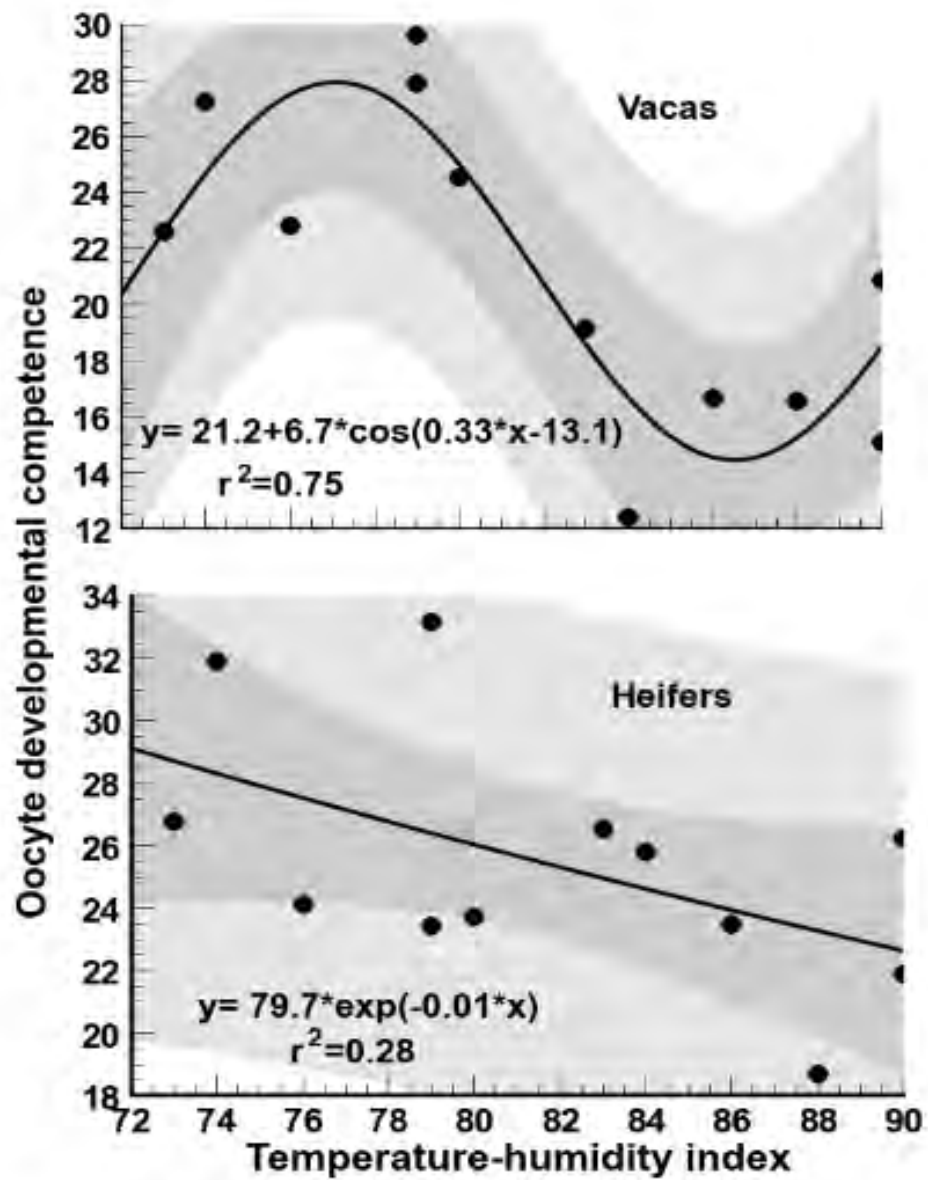
Fig. 3 Association between temperature-humidity index (THI) and total oocytes harvested following oocyte recovery procedure (OPU) from high-yielding pluriparous cows and heifers in a hot environment



460

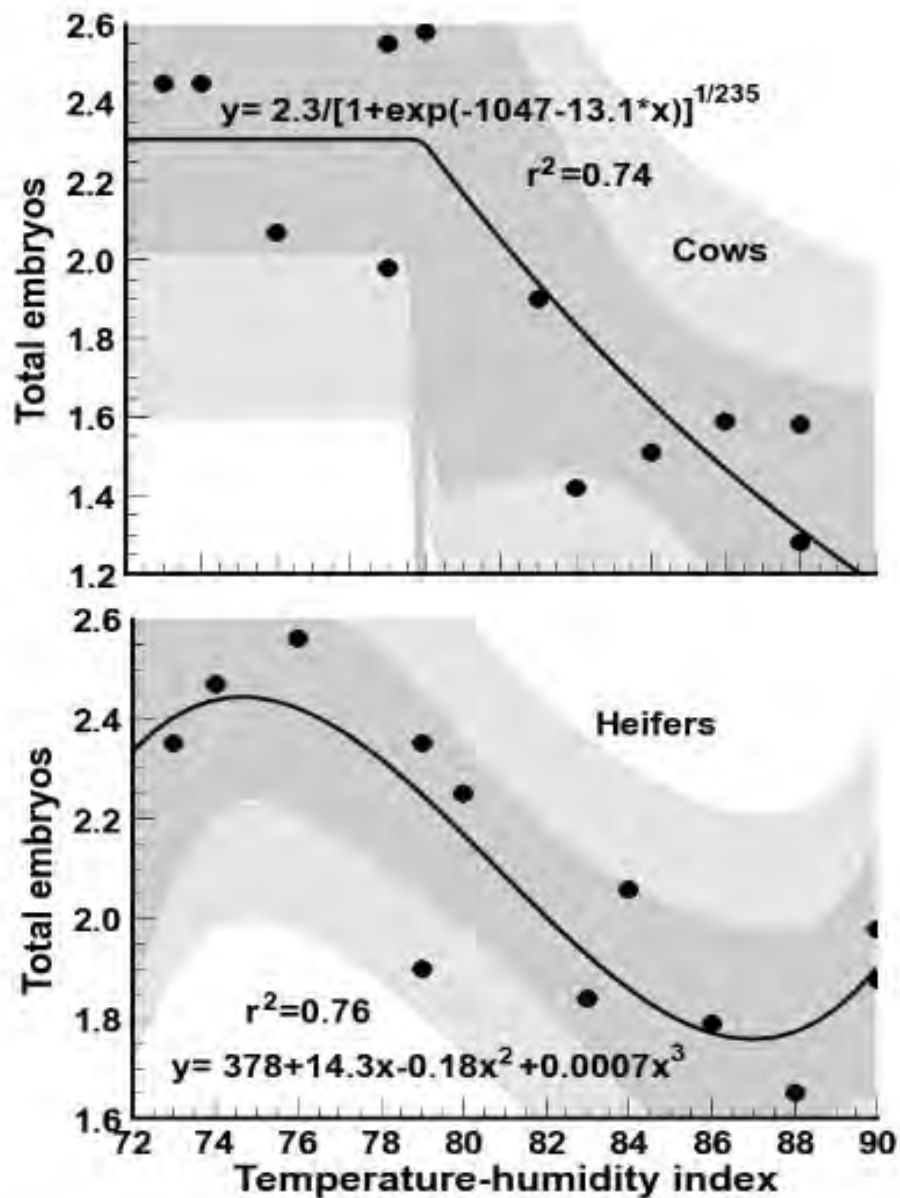
461 **Fig. 5** Association between temperature-humidity index (THI) and total viable oocytes harvested following
 462 oocyte recovery procedure (OPU) from high-yielding pluriparous cows and heifers in a hot environment

463 78



464

465 **Fig. 7** Association between temperature-humidity index (THI) and oocyte developmental competence following
 466 oocyte recovery procedure (OPU) from high-yielding pluriparous cows and heifers in a hot environment



467

468 **Fig. 9** Association between temperature-humidity index (THI) and total embryos derived from oocytes harvested
 469 following oocyte recovery procedure (OPU) from high-yielding pluriparous cows and heifers in a hot
 470 environment.

VI. CONCLUSIONES

Estos dos estudios revelaron, por un lado, que la estación del año afecta deletéreamente la producción de embriones *in vitro* y la competencia ovocitaria en las vacas Holstein Friesian, confirmándonos el fenómeno de una baja fertilidad en las estaciones del año en verano y otoño en las explotaciones lecheras de la Comarca Lagunera.

El segundo estudio encontramos, se observó que tanto vacas como novillas se encuentran con rango de ITH que corresponde a un EC leve. Además, se encontró que cuando las vacas y novillas están bajo un rango de ITH alto que corresponde a un EC severo y muy severo, afecta el porcentaje de competencia ovocitaria y total de embriones. Y tales respuestas al EC son más visibles en el grupo de las vacas en lactancia.

VII. RECOMENDACIONES

Como recomendaciones se deben utilizar el ITH como un indicador confiable para estimar si las vacas en explotaciones están bajo condiciones de estrés térmico. Por otro lado, con los resultados que se encontraron en este estudio nos planteamos proponer estrategias para solucionar o mitigar los efectos del estrés térmico en las vacas Holstein Friesian, tales alternativas van desde mejorar la zona de confort del animal con el uso de sistemas de enfriamiento y ventilación, el uso de programas hormonales como lo es el Ovsynch y el uso progesterona exogena. Otra estrategia novedosa o relevante, es la transferencia de embriones producidos *in vitro* durante la época de verano y otoño cuando existe condiciones de EC en las vacas Holstein Friesian y los resultados en la IA no son favorables.

VIII. LITERATURA CITADA

- Alemu, WT., Pandey, OH., Wondim, SD., 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.
- Al-Katanani, YM., Drost M., Monson RL., Rutledge JJ., Krininger 3rd CE., Block J., Thatcher WW., and Hansen PJ. 2002. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* 58;171–182.
- Amamou, H., Beckers, Y., Mahouachi, M., Hammami, H. 2019. Thermotolerance indicators related to production and physiological responses to heat stress of holstein cows, *Journal of Thermal Biology*. 82; 90-98
- Anzures, F., Gaytán, L., Macías-Cruz, U., Avendaño-Reyes, L., García, J.E., and Mellado, M. 2019. Milk yield and hair coat characteristics of Holstein cows in a hot environment. *Tropical Animal Health and Production*. 81; 82-88.
- Armstrong, D. 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. *Journal of dairy science*. 77(7): 2044-2050.
- Badinga, L., Thatcher, WW., Diaz, T., Drost, M., and Wolfenson, D. 1993. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*. 39; 797–810. doi:10.1016/0093-691x(93)90419-6
- Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., Nardone, A. 2002. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *Journal of Dairy Science*. 85; 2173–2179.
- Chang, HM, Qiao, J, Leung, PC. 2016. Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary-novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Hum Reprod Update*. 23;1-18.

- Collier, R.J., and Gebremedhin, K.G. 2015. Thermal biology of domestic animals. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 3; 513–532. doi:10.1146/annurev-animal-022114-110659
- Das, R., Sailo, L., Verma, N., Bharti, P., Saikia, J., Imtiwati, and Kumar R. 2016. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary World.* 9; 260-269.
- De Aguiar, H.L., Hyde, A.H., Pedrosa, H.G., Denicol, C.A. 2020. Heat stress of impairs in vitro development of preantral follicles of cattle. *Animal Reproduction Science.* 213.
- De Rensis, F., García-Ispuerto, I., and López-Gatiús, F. 2015. Seasonal Heat Stress: Clinical Implications and Hormone Treatments for the Fertility of Dairy Cows. *Theriogenology.* 84(5); 659-666
- Del Collado, M., Mamede, A.G., Vieira, M.F., Juliano da Silveira, C.J., Perecin, F. 2018. Contributions from the ovarian follicular environment to oocyte function. Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Florianópolis, SC, Brazil, August 16th to 18th, 2018.
- Edwards, J.L., Bogart, A.N., Rispoli, L.A., Saxton, M.A., and Schrick, F.N. 2009. Developmental competence of bovine embryos from heat-stressed ova. *J. Dairy Sci.* 92; 563-570.
- El-Hayek, S., Yang, Q., Abbassi, L., FitzHarris, G., Clarke, H.J. 2018. Mammalian Oocytes Locally Remodel Follicular Architecture to Provide the Foundation for Germline-Soma Communication. *Curr Biol.* 28;1124-1131.
- Elinos-Báez, C.M., Maldonado, V., Meléndez-Zajgla, J. 2003. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta Médica de México.* 139(5); 493- 499.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology.* 35; 495-516.
- Friedman, E., Voet, H., Reznikov, D., Wolfenson, D., & Roth, Z. 2014. Hormonal treatment before and after artificial insemination differentially improves fertility in subpopulations of dairy cows during the summer and autumn. *Journal of Dairy Science.* 97; 7465–7475. [https:// doi.org/10.3168/jds.2014-7900](https://doi.org/10.3168/jds.2014-7900)

- Gendelman, MA. Aroyo, S., Yavin, and Roth Z. 2010. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*. 140;73–82. doi:10.1530/REP-10-0055
- Gendelman, M., and Roth, Z. 2012. In vivo vs. in vitro models for studying the effects of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. *Animal Reproduction Science*. 134; 125-134.
- Gendelman, M., and Z. Roth. 2012. Incorporation of coenzyme Q10 into bovine oocytes improves mitochondrial features and alleviates the effects of summer thermal stress on developmental competence. *Biol. Reprod.* 87; 1–12. doi:10.1095/biolreprod.112.101881
- 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. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.008
- Hansen, PJ. 2019. Reproductive physiology of the heat-stressed dairy cow: implications for fertility and assisted reproduction. *Animal Reproduction*. **16**(3): 497-507.
- Hansen, PJ. 2009. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1534), 3341–3350. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0131>
- Hung, WT., Hong, XA., Christenson, LK., McGinnis, LK. 2015. Extracellular Vesicles from Bovine Follicular Fluid Support Cumulus Expansion. *Biol Reprod.* 93. doi: 10.1095/biolreprod.115.132977.
- Jaffe, AL., and Egbert RJ. 2016. Regulation of Mammalian Oocyte Meiosis by Intercellular Communication Within the Ovarian Follicle. *Annu. Rev. Physiol.* 79(10); 1–10.
- 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.
- Ju, JC., Parks, JE., Yang, X. 1999. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after shortterm heat shock. *Mol Reprod Dev*. 53; 336-340.

- Kaji, K., and Kudo, A. 2004. The mechanism of sperm–oocyte fusion in mammals. *Reproduction*. 127; 423–429
- Kumar, A., Singh, G., Sunil Kumar, BV., Meur, SK. 2011. Modulation of antioxidant status and lipid peroxidation in erythrocyte by dietary supplementation during heat stress in buffaloes. *Livestock Science*. 138; 299–303.
- Lamming, GE., & Royal, MD. 2001. Ovarian hormone patterns and subfertility in dairy cows. *BSAP Occasional Publication*. 26(1); 105–118. <https://doi.org/10.1017/S0263967X00033620>
- 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. *Journal of Dairy Science*. 87; 2449–2454. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73368-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73368-8)
- Lees, AM., Mader, TL., Sejian, V., Wallage, AL., Steel, CC., Lees, JC., and Gaughan, JB. 2019. The Impact of Heat Load on Cattle. *Animals*. 9; 322. doi:10.3390/ani9060322
- Li, H., Zhang, Y., Li, R., Wu, Y., Zhang, D., Xu, H., Zhang, Y., Qi, Z. 2021. Effect of seasonal thermal stress on oxidative status, immune response and stress hormones of lactating dairy cows. *Anim Nutr*. 7(1); 216-223. doi: 10.1016/j.aninu.2020.07.006
- Li, HJ., Sutton-McDowall, ML., Wang, X., Sugimura, S., Thompson, JG., Gilchrist, RB. 2016. Extending prematuration with cAMP modulators enhances the cumulus contribution to oocyte antioxidant defence and oocyte quality via gap junctions. *Hum Reprod*, 31; 810-821.
- Lonergan, P., Fair, T., Forde, N., Rizos D. 2016. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*.
- Loo, DT. 2011. In Situ Detection of Apoptosis by the TUNEL Assay: An Overview of Techniques. *Methods in Molecular Biology*. 682; 3-13.
- Lopes, FFP., Lima, RS., Risolia, PHB., Ispada, J., Assumpcao, MEOA., Visintin, JA. 2012. Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. *Anim Reprod*. 9(3); 395-403.

- López, G., Brizuela, AB., Rondán, G., Lissaso, CM., Alejandra C., Kemerer, AC., 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
- Mader, TL., Davis, MS., Brown-Brandl, T. 2006. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 84(3); 712-719.
- Matzuk, MM., Burns, KH., and Viveiros, MM. 2002. "Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation." *Science*. 296(5576); 2178–2180.
- Meirelles, FV., Caetano, AR., Watanabe, YF., Ripamonte, P., Carambula, SF., Merighe, GK., and Garcia, SM. 2004. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim Reprod Sci*. 82(83); 13-20.
- Nabenishi, H., Ohta, H., Nishimoto, T., Morita, T., Ashizawa, K., Tsuzuki, Y. 2012. 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); 249-59. doi: 10.1017/S0967199411000220.
- Navakanitworakul, R., Hung, WT., Gunewardena, S., Davis, JS., Chotigeat, W., Christenson, LK. 2016. Characterization and Small RNA Content of Extracellular Vesicles in Follicular Fluid of Developing Bovine Antral Follicles. *Sci Rep*. 6; 25486. doi: 10.1038/srep25486.
- Negrón-Pérez, VM., Fausnacht, DW., and Rhoads, ML. 2019. Invited review: Management strategies capable of improving the reproductive performance of heat-stressed dairy cattle. *J. Dairy Sci*. 102; 12.
- Ortiz, XA., Smith, JF., Bradford, BJ., Harner, JP., and Oddy, A. 2010a. A comparison of the effects of 2 cattle-cooling systems on dairy cows in a desert environment. *J. Dairy Sci*. 3; 4955–4960.
- Ortiz, XA., Smith, JF., Bradford, BJ., Harner, JP., and Oddy, A. 2010b. Effects of running time of a cattle-cooling system on core body temperature of cows on dairy farms in an arid environment. *J. Dairy Sci*. 93; 4949–4954.
- 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 pre- antral follicles and on in vitro maturation of cumulus-oocyte complex. *Theriogenology*. 86; 994-1003.
- Palma, GA., Argañaraz, ME., Barrera, AD., Rodler, D., Mutto, AA., and Sinowatz, F. 2012. Biology and Biotechnology of Follicle Development. *The scientific World Journal*. 14
- Parrish, JJ. 2014. Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*. 81; 67–73
- Paula-Lopes, FF. 2018. Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. *Reprod Fertil Dev*. 30; 1169-1179.
- Paula-Lopes, FF., Milazzotto, M., Assumpcao, MEOA., Visintin, JA. 2008. Heat shock-induced damage in bovine oocytes. *Reprod Fertil Dev*. 43; 208.
- Paula-Lopes, FF., Lima, RS., Risolia, PHB., Ispada, J., Assumpção, MEOA., and Visintin, JA. 2012. Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. *Animal Reproduction*. 9(3); 395-403.
- Picada, EI., Bortoliero, CC., Simões, RML., Marcondes, SM., Vieira, MF. 2019. Cumulus-oocyte interactions and programmed cell death in bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*. 126; 81-87.
- Polsky, LB., Augusto, ML., Madureira, EL., Drago, F., Soriano, S., Sica, F., Vasconcelos, ML., and Cerri, LAR. 2017. Association between ambient temperature and humidity, vaginal temperature, and automatic activity monitoring on induced estrus in lactating cows. *J. Dairy Sci*. 100;1–12.
- Polsky, L., and Von-Keyserlingk, AGM. 2017. Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *J. Dairy Sci*. 100; 8645 – 8657.
- Pursley JR., Mee MO., Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology* 44; 915-923.
- Richards, SJ. 2005. Ovulation: New factors that prepare the oocyte for fertilization. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 234; 75–79.
- Robert, C, and Gilbert, I. 2018. Cell-to-Cell Communication in the Ovarian Follicle. *Encyclopedia of Reproduction*, 2nd edition, Volume 2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64391-X>

- Roth, Z., and Hansen, P.J. 2005. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*. 129; 235-244.
- Roth, Z. 2017. Effect of heat stress on reproduction in dairy cows: insights into the cellular and molecular responses of the oocyte. *Annu Rev Anim Biosci*. 5; 151-70. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022849>.
- Roth, Z. 2021. Heat stress reduces maturation and developmental capacity in bovine oocytes. *Reproduction. Fertility and Development*. 33; 66-75.
- Roth, Z. 2008. Heat Stress, the Follicle, and Its Enclosed Oocyte: Mechanisms and Potential Strategies to Improve Fertility in Dairy Cows. *Reprod Dom Anim*. 43; 238–244.
- 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. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13389>.
- Roth, Z. 2020a. Reproductive physiology and endocrinology responses of cows exposed to environmental heat stress - Experiences from the past and lessons for the present. *Theriogenology*. 155; 150-156
- Roth, Z. 2020b. Influence of heat stress on reproduction in dairy cows—physiological and practical aspects, *Journal of Animal Science*. 98; S80–S87, <https://doi.org/10.1093/jas/skaa139>
- Roth, Z., Arav, A., Bor, A., Zeron, Y., Braw-Tal, R., and Wolfenson D. 2001a. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction*. 122; 737–744.
- Roth, Z., Meidan, R., Braw-Tal, R., and Wolfenson, D. 2000. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J. Reprod. Fertil*. 120; 83–90.

- Rubinstein, E., Ziyat, A., Philippe, EW., Le Naour, FO., Boucheix, F. 2006. The molecular players of sperm–egg fusion in mammals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 17; 254–263.
- Sakatani, M. 2017. Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced in vitro. *J. Reprod. Dev.* 63; 347–352.
- Sakatani, M., Kobayashi, S., and Takahashi M. 2004. Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 67; 77–82. doi:10.1002/mrd.20014
- Sammad, A., Umer, S., Shi, R., Zhu, H., Zhao, X., Wang, Y. 2019. Dairy cow reproduction under the influence of heat stress. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. doi: 10.1111/jpn.13257. Epub 2019 Nov 29. PMID: 31782564.
- Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, SA., Guenther, JN., Parrish, JJ., Wiltbank, MC. 2002. Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. *Journal of Dairy Science*. 85 (11); 2803-2812.
- Scenna, FN. 2006. "Inhibition of Direct Prostaglandin F2 α Effects on Pre-attachment Embryos Improves Reproductive Efficiency in Cattle". PhD diss., University of Tennessee
- Shimizu, TM., Kawahara, Y., Abe, M., Yokoo, H., Sasada, and Sato, E. 2003. Follicular microvasculature and angiogenic factors in the ovaries of domestic animals. *J. Reprod. Dev.* 49; 181–192.
- Shu, H., Wang, W., Guo, L., Bindelle, J. 2021. Recent Advances on Early Detection of Heat Strain in Dairy Cows Using Animal-Based Indicators: A Review. *Animals*. 11(4); 980. <https://doi.org/10.3390/ani11040980>
- Slimen, Bl., Najar, T., Ghram, A., Abdrrabba, M. 2016. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 100(3); 401-12. doi: 10.1111/jpn.12379.
- Thom, EC. 1959. The discomfort index. *Weatherwise*. 12; 57–59.
- Wang, J., Li, J., Wang, F., Xiao, J., Wang, Y., Yang, H., Li, S., and Cao, Z. 2020. Heat stress on calves and heifers: a review. *J Animal Sci Biotechnol*. 11; 79. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00485-8>

- West, JW. 2003. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 86; 2131–2144. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73803-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X).
- Wolfenson, D., and Roth, Z. 2019. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility, *Animal Frontiers*. 9(1); 32–38. <https://doi.org/10.1093/af/vfy027>
- Wolfenson, D., Roth, Z., and Meidan, R. 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61; 535–547. doi:10.1016/s0378-4320(00)00102-0
- Wolfenson, D., Thatcher, WW., Badinga, LJ. Savio, DR. Meidan, BJ. Lew, R. Braw-Tal, and Berman A. 1995. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol. Reprod.* 52; 1106–1113. doi:10.1095/biolreprod52.5.1106
- Young, DC. 2004. Reproductive Efficiency following Administration of an Inhibitor of Prostaglandin F2 α during Early Embryonic Development in Dairy Cattle. Masters Theses. University of Tennessee, Knoxville Trace: Tennessee Research and Creative Exchange.
- Rodrigues TA., Tuna KM., Alli AA., Tribulo P., Hansen PJ., Koh J., Paula-Lopes FF. 2019. Follicular fluid exosomes act on the bovine oocyte to improve oocyte competence to support development and survival to heat shock. *Reprod Fertil Dev.* 31(5): 888-897. doi: 10.1071/RD18450.
- Reinen, PS., Coria SM., Barrionuevo GM., Hernández O., Callejas S., Palma GA. 2018. "Expresión génica del factor de crecimiento BMP15, GDF9, FGF2 y sus receptores en células foliculares bovinas / Expresion genica del factor de crecimiento BMP15, GDF9, FGF2 y sus receptores en celulas foliculares bovinas." *Revista MVZ [Medicina Veterinaria y Zootecnia]*. 23(3): 6778.
- Tarazona A., López A., Olivera-Angel M. 2010. La competencia del ovocito: qué, cómo y cuándo. *Acta biol. Colomb.* 15(3).