

Influencia de la predominancia racial sobre la competencia de maduración, fecundación y desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos

*Josanny Peláez-Gutiérrez**
*Yadira Urribarrí-Rodríguez**
*Amarú Pirela-Pirela**
*Francisco Báez-Contreras**
*Patricia Villamediana-Monreal**
*Hugo Hernández-Fonseca***

RESUMEN

El objeto de esta investigación estuvo basado en encontrar diferencias detectables en la competencia de maduración ovocitaria, de fecundación y de desarrollo embrionario que pueden existir en ovocitos derivados de vacas y novillas sacrificadas con diferentes predominancias raciales *Bos taurus* y *Bos indicus*. Para la obtención de los complejos cúmulus-ovocitos (COCs) se realizó la técnica de aspiración, seleccionando aquellos ovocitos que tenían dos o más capas de células del cúmulus, zona pelúcida (ZP) intacta y un citoplasma homogéneo granular. Posterior a la selección se continuó con la madu-

* Laboratorio de Citogenética, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

** Laboratorio de Fecundación *in vitro*, Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Unidad de Investigación en Biotecnología Animal (UNIBIO), Universidad del Zulia. hugo.hernandez@fcv.luz.edu.ve

ración (MIV) y fecundación *in vitro* (FIV). Se utilizó semen congelado proveniente de un toro Brahman puro (*Bos indicus*). Para la evaluación de la MIV como para la FIV, los ovocitos se fijaron 24 horas a 4°C en solución 3:1 etanol-ácido acético. Luego fueron teñidos con orceína acética al 1%. La tasa de maduración de ovocitos de vacas con predominancia fenotípica *Bos indicus* fue del 66,93% mientras que las vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* alcanzaron un 43,10% ($P < 0,001$). En cuanto a la tasa de fecundación se obtuvo para vacas con predominancia fenotípica *Bos indicus* un 43,68% de ovocitos penetrados normales, 41,74% de penetrados anormales y para vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* un 31,96% de ovocitos penetrados normales y 46,39% de ovocitos penetrados anormalmente. En cuanto a los ovocitos no penetrados el caso de los *Bos indicus* alcanzó un 6,80% y en el caso de los ovocitos *Bos taurus* un 17,52% ($P < 0,05$). En cuanto a la tasa de división embrionaria *Bos indicus* obtuvo un 36,12% mientras que para el genotipo con predominancia *Bos taurus*, un 32,30%. En conclusión, los resultados indican que los ovocitos de vacas mestizas con predominancia fenotípica *Bos indicus* son más competentes en las primeras etapas de desarrollo *in vitro* que los ovocitos de vacas mestizas con predominancia fenotípica *Bos taurus*, aún cuando esa superioridad no se evidenció en la capacidad para iniciar las primeras divisiones embrionarias.

PALABRAS CLAVE: Fecundación *in vitro*, desarrollo embrionario, *Bos taurus*, *Bos indicus*.

Influence of Racial Predominance on Maturation Competence, Fertilization and Development in Vitro of Bovine Ovocites

ABSTRACT

The purpose of this research was based on finding detectable differences in oocyte maturation, fertilization and embryonic development; in oocytes from Cattle of different genetic predominance either *Bos taurus* or *Bos indicus* crossbred cows. This was done, through the collection, selection, maturation and fertilization of oocytes from slaughtered cows and heifers. To ob-

tain cumulus-oocyte complexes (COCs) the aspiration technique and selection of oocytes with two or more layers of cumulus cells, intact zona pellucida (ZP) and a homogeneous granular cytoplasm were performed. After selection, oocyte maturation and *in vitro* fertilization were done. Frozen-thawed semen from one Brahman bull (*Bos indicus*) was used. For the evaluation of *in vitro* maturation IVM as for *in vitro* fertilization IVF, oocytes were fixed for approximately 24 hours at 4°C in a solution of ethanol-acetic acid (3:1). They were then stained with 1% acetic orcein. The rate of maturation of oocytes from cows with a predominant *Bos indicus* phenotype was 66,93% while cows with a *Bos taurus* phenotype prevalence reached a 43.10% ($P < 0.001$). As for the fertilization rate, cows with *Bos indicus* predominance had 43.68% of normally penetrated oocytes and 41.74% of abnormally penetrated oocytes. For cows with a *Bos taurus* phenotype, 31.96% normally penetrated oocytes and 46.39% were abnormally oocytes. Penetrated in terms of non penetrated oocytes 6.80% and a 17.52% ($P < 0,05$) of the *Bos indicus* and the *Bos taurus* oocytes groups reached respectively. As for the rate of cleavage, *Bos indicus* obtained a 36.12%, while a 32.30% was found in the *Bos taurus* group. In conclusion, these results indicate that oocytes from predominantly *Bos indicus* crossbred cows are more competent in the early stages of development than those oocytes obtained from predominant by crossbred *Bos taurus* cows.

KEYWORDS: *In vitro* fertilization, embryo development, dual purpose cattle, *Bos taurus* *Bos indicus*.

Introducción

En la región occidental de Venezuela se ha venido desarrollando la ganadería de doble propósito (DP) que ha dado como resultado programas de cruzamiento principalmente del tipo alterno *Bos taurus* x *Bos indicus*, con la finalidad de obtener un animal adaptable a las condiciones ambientales particulares del trópico. Estos programas se han desarrollado en vista de las actuales limitantes de la producción bovina (*Bos taurus*-*Bos indicus*), donde se observa un ganado con excelente adaptación al medio (*Bos indicus*) que muestra disminuidas tasas de crecimiento y de producción láctea, a diferencia de las especies taurinas, las cuales presentan mejor producción láctea, pero bajas tasas de crecimiento por mala adaptabilidad al ambiente tropical (Aranguren y Yáñez, 2005).

El ganado *Bos taurus* y *Bos indicus* tienen un papel vital en el desarrollo de sistemas de producción sostenible en las regiones tropicales de tie-

rras bajas. Los sistemas DP basados en el pastoreo de vacas mestizas, generan la mayor parte de la leche producida en el país y están desplazando a los sistemas intensivos basados en el alimento con granos para razas puras europeas (Isea y Aranguren, 2005). Al mismo tiempo, aumenta el número de explotaciones de carne procedentes de ganado cebú (Jarvis, 1990).

El ganado *Bos taurus* es muy sensible a las condiciones climáticas, experimentando grados variables de infertilidad mientras que los animales con mayor herencia cebuina (*Bos indicus*), son menos exigentes en alimentación debido a su menor producción lechera, poseen características anatómicas y funcionales que los hacen más aptos para resistir las condiciones ambientales adversas y una mayor resistencia a enfermedades, por lo cual mantienen tasas de fertilidad más elevadas a lo largo del año (Barros *et al.*, 2006).

En investigaciones previas (Chávez *et al.*, 2010) se encontró que, en vacas Holstein (*Bos taurus*), el estrés calórico parece reducir la competencia ovocitaria y las tasas de fecundación, reduciendo el desarrollo del embrión y contribuyendo a una mala fertilidad durante los meses de verano; a diferencia de ganado cebú (*Bos indicus*) que está bien adaptado a los ambientes tropicales, demostrando una máxima tolerancia al calor, mostrando mejor rendimiento reproductivo que *Bos taurus* en regiones tropicales y subtropicales, concluyendo que en ambientes tropicales el ganado *Bos indicus* presenta mejores índices de reproducción que el ganado *Bos taurus* (Camargo *et al.*, 2007).

Estudios recientes, han señalado que, el estrés calórico ejerce un efecto nocivo retrasado sobre el desarrollo folicular, los niveles de progesterona y sobre la competencia ovocitaria en vacas del género *Bos indicus*, a diferencia del *Bos taurus*, donde el estrés calórico causa un inmediato deterioro sobre el desarrollo folicular (Sun, 2003). No se conoce concretamente el mecanismo por el cual el estrés calórico puede afectar a los folículos y a los ovocitos, pero se ha descrito que se produce un daño en la comunicación intercelular entre las células de la granulosa, del cúmulus y el ovocito (Al-Katanani, 2002; Smidt y Niemann, 1999). Se afecta la competencia del ovocito para ser fecundado (Al-Katanani, 2002; Statistical Analysis Institute, 2001), la viabilidad de las células de la granulosa y de la teca interna, y se producen cambios en la esteroidogénesis (Roth *et al.*, 2001). Por tanto, algunos folículos pudiesen ser afectados aún antes de su recluta-

miento, lo que se traduce en la prolongación de los efectos del estrés térmico aún en los meses con condiciones más confortables (Lozano *et al.*, 2005).

Con la finalidad de controlar y manipular adecuadamente algunos factores relacionados con la reproducción animal, en las últimas décadas se han desarrollado técnicas que han permitido ejercer parcialmente dicho control, donde destacan entre las más utilizadas: la inseminación artificial (IA), ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOTE), fecundación *in vitro* (FIV), criopreservación de gametos, clonación, y transgénesis (Smidt y Niemann, 1999).

La Fecundación *in vitro* (FIV) es el proceso mediante el cual el espermatozoide es capaz de unirse y penetrar un ovocito para formar un nuevo individuo bajo condiciones de laboratorio (Hernández, 2005). También es definida como el sistema que permite producir embriones bovinos, colectando ovocitos de ovarios de madres donadoras de diferente edad y estado fisiológico, los cuales se maduran y fecundan en condiciones de laboratorio, posteriormente los embriones obtenidos se cultivan hasta que puedan ser transferidos a una hembra receptora o puedan ser criopreservados para su posterior utilización (Gaughan *et al.* 1999).

La capacidad de desarrollo de ovocitos mamíferos está influenciada por diversos factores; entre los cuales es posible mencionar, factores de índole endocrino, nutricional, morfológico, ambiental, entre otros. Cada vez es más evidente la influencia del componente racial sobre procesos fisiológicos del embrión y los gametos que lo originan. Dada la importancia de la ganadería mestiza como alternativa en ambientes tropicales, toma relevancia el hecho de poder caracterizar la influencia del componente racial sobre la capacidad de desarrollo del ovocito bovino (Barros *et al.*, 2006; Hashimoto *et al.*, 2002).

Las potencialidades de diferentes predomios raciales de bovinos productores de carne y leche en el país, se estudiarán con la finalidad de evaluar su potencial como donadores de ovocitos para ó la producción *in vitro* de embriones (PIV). En el presente artículo se evaluó la capacidad de desarrollo de ovocitos para ser fecundados y desarrollados *in vitro*, además de comparar estas características entre vacas mestizas predominantemente *Bos taurus* y *Bos indicus*. Esta habilidad será considerada como signo de potencial viabilidad y adaptabilidad del embrión resultante, que debe ser

tomado en cuenta al momento de estudiar los escenarios de éxito en el establecimiento de biotecnologías reproductivas como la FIV (Hernández, 2005).

1. Materiales y métodos

1.1. Selección previa de las hembras en matadero

Previo al sacrificio, toda vaca y novilla fue clasificada de acuerdo al grado de cruzamiento y proporción fenotípica según Isea-Villasmil (2005). Sólo animales con predominancias raciales por encima de 5/8 para *Bos taurus* y *Bos indicus* fueron incluidos en uno de dos grupos (*Bos taurus* y *Bos indicus*), respectivamente.

1.2. Recolección de ovarios y obtención de ovocitos

Los ovarios de vacas y novillas sacrificadas en mataderos comerciales ubicados cerca del laboratorio (Villa del Rosario, estado Zulia, Venezuela) fueron colectados y transportados al laboratorio en contenedores isotérmicos (Friótermo, Potamito®, Venezuela) a temperaturas entre 36 y 38°C, en un periodo de tiempo no mayor a cuatro horas (h). Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron dos veces en 250 mL de solución tamponada de fosfato salino (PBS), además se realizó un tercer lavado con 250 mL de PBS + 150 µg/mL de Penicilina/Estreptomicina (15140-122, Gibco; San Rafael- Costa Rica), a una concentración de 1500UI/mL de penicilina y 1500 µg/mL de estreptomicina. Los ovocitos se obtuvieron mediante la técnica de aspiración, la cual se basa en extraer los ovocitos de los folículos con un tamaño entre 2 y 10 m. de diámetro del ovario a través de una jeringa de 12 mL conectada a una aguja de 18 ó 19 gauss (G) (Sensi medical; Caracas- Venezuela) (Báez *et al.*, 2008).

1.3. Selección de complejos ovocitos-cúmulus (COCs)

Finalizada la técnica de aspiración se seleccionaron bajo microscopio estereoscópico (Olympus SZ51, Japon) los complejos Ovocitos-Cúmulus (COCs) que presentaron mayor tamaño, citoplasma granular, claro y homogéneo y al menos dos capas completas y compactas de células del cúmulus (Holyoak *et al.*, 1998).

1.4. Maduración *in vitro*

Los COCs seleccionados se colocaron en grupos de 20-25 en microgotas de 100 L cubiertas con 8 mL de aceite mineral (M8410, Sigma, EUA) durante 24 h a 38,5°C en una atmósfera con 5% CO₂ en aire saturado de humedad, utilizando medio de cultivo tisular TCM-199 (M7528, Sigma, EUA) suplementado con 5 µg/mL de piruvato sódico (P5280, Sigma, EUA), 5 µg/mL de 17β-estradiol (E2758, Sigma, EUA), 500 g/mL de suero fetal bovino (SFB; 26140 Gibco; San Rafael de Heredia-Costa Rica), 5 g/mL FSH (500 UI, Calier EUA), 50 µg/mL de LH (5269, Sigma, EUA), 50 µg/mL de Penicilina/Estreptomina (P/S 15140-122, Gibco; San Rafael de Heredia-Costa Rica) y 5 µg/mL de Factor de crecimiento epidermal (EGF) (13247-051, Gibco; San Rafael de Heredia-Costa Rica) (Hernández, 2005).

1.5. Fecundación *in vitro*

Finalizado el periodo de maduración (24 h) los COCs fueron lavados en medio TL-Semen, suplementado con piruvato de sodio (P5280, Sigma, EUA) y 5 µL de Penicilina/Estreptomina (P/S 15140-122, Gibco; San Rafael de Heredia-Costa Rica) para luego ser transferidos en grupos de 25 ovocitos a placas con gotas de 100 µL del mismo medio cubiertas con aceite mineral (M8410, Sigma, EUA). Para la selección de los espermatozoides se descongeló una pajueta del toro *Brahman* puro de probada fertilidad en baño María (Fisher Scientific, Isotemp 250, Buduque, Iowa, EUA) a 37°C por 30 segundos, su contenido fue colocado en tubo cónico de 15 mL en una columna de fraccionamiento en gradiente discontinuo de Percoll y medio de lavado TL-Semen (45% para la capa superior y 90% para la capa del fondo del tubo). Se procedió a centrifugar (Eppendorf, 5415D, Alemania) a 39g, por 10 min. Se tomaron 30 µL del pellet y se colocaron en un tubo eppendorff y se mantuvo en incubación (38°C, 5%CO₂ y aire saturado de humedad) mientras se realizaba la medición de la motilidad individual y la concentración espermática para realizar la respectiva dilución. Una vez ajustada la concentración de espermatozoides a 1x10⁶ espermatozoides vivos y motiles/mL, se procedió a colocar 5 µL de esta solución a las gotas de fecundación. Los gametos permanecieron en co-cultivo durante 18 horas a 38.5°C en una atmósfera con 5%CO₂ en aire saturado de humedad (Parrish *et al.*, 1988).

1.6. Cultivo *in vitro*

Finalizado el tiempo de la fecundación los presuntos cigotos fueron despojados de las células del cúmulus mediante agitación mecánica dentro de la gota de fecundación, luego se les aplicó un lavado con medio TL-Semen y uno con medio SOF (fluido oviductal sintético) suplementado con piruvato de sodio (P5280, Sigma, EUA.), antibiótico Penicilina/Estreptomina (15140-122, Gibco; San Rafael-Costa Rica), suero fetal bovino (26140, Gibco; San Rafael-Costa Rica) y 6mg/mL de BSA (Sigma A3059, EUA). Finalmente los presuntos cigotos se transfirieron a gotas de 100 μ L. de medio SOF cubiertas con aceite mineral (M8410, Sigma, EUA) (Wortzman y Evans, 2004).

1.7. Evaluación de la tasa de maduración *in vitro*

Luego del período de maduración los ovocitos se observaron bajo microscopio óptico (400X, Olympus CX31, Japón) y se seleccionaron aquellos que presentaban un citoplasma homogéneo y capas completas de células del cúmulus expandido, características mínimas de un ovocito madurado. Se consideraron ovocitos degenerados, aquellos que presentaban un citoplasma contraído y oscuro. Se contó el número de ovocitos maduros y se tomó una muestra de cada grupo (*Bos taurus* y *Bos indicus*) y se realizaron comparaciones estadísticas entre los resultados obtenidos en cada uno, expresados en porcentaje. Los ovocitos a ser fijados se desnudaron con citrato de sodio al 3%, y luego se colocaron en una solución de etanol-ácido acético en proporción 3:1 durante 24 h a 4°C. Posteriormente se procedió a teñir los ovocitos con orceína acética al 1%, para evaluar la maduración nuclear en el microscopio óptico. Se clasificaron según el estadio meiótico alcanzado en: maduros (Metafase II o Telofase I); ovocitos inmaduros (Anafase I, Metafase I, Condensación Cromosómica y Vesícula Germinal) u ovocitos degenerados (González *et al.*, 2000).

1.8. Evaluación de la fecundación *in vitro*

Para la evaluación de la fecundación se tomaron muestras de COCs a las 18 h postinseminación, éstos fueron lavados con citrato de sodio al 3% bajo microscopio estereoscópico para despojarlos completamente de las células del cúmulus. Luego se fijaron en una mezcla de etanol: ácido acéti-

co en proporción 3:1 durante 48 h. Los ovocitos fijados se montaron en láminas portaobjetos y se tiñeron con orceína acética al 1% y se evaluaron en microscopio óptico, clasificándose como:

- a. *Normalmente Fecundados (2PN+C)*: cuando en el citoplasma de los cigotos se observa 2 pronúcleos, uno femenino y otro masculino y una cola de espermatozoide, o bien una cabeza de espermatozoide descondensándose acompañada de su cola y de un pronúcleo femenino.
- b. *Anormales*: en este grupo, los ovocitos fueron penetrados por los espermatozoides pero se observó alguna alteración de la fecundación. Entre estas están:
 - *Telo II*: cigotos que presentaron un retraso marcado en la formación de los pronúcleos, permaneciendo en telofase II.
 - *Asincrónicos*: en este grupo los ovocitos son penetrados solamente por un espermatozoide, pero se observa alguna alteración o retraso marcado en la formación de los pronúcleos, cigotos que presentan una cabeza de espermatozoides sin descondensar acompañada de un pronúcleo femenino.
- c. *Poliespérmico (>2PN)*: cigotos en los que se observaron más de dos pronúcleos en su citoplasma. Dentro de este grupo se consideraron los cigotos cuando en su citoplasma se observaron más de dos pronúcleos y los dos corpúsculos polares, más de dos cabezas de espermatozoides descondensándose o más de dos colas.
- d. *No Fecundados*: ovocitos que se encontraron en estadio de metafase II o telofase I, sin presentar en su citoplasmas algunas de las características anteriormente señaladas (Izquierdo, 1996).

1.9. Evaluación de la división embrionaria

La evaluación de la división se realizó una vez transcurridas 48 hs post-inseminación (ϕ), se procedió a observar los presuntos cigotos bajo microscopio estereoscópico en un aumento de 50X, clasificándolos en ovocitos no fecundados, embriones no divididos y embriones divididos en 2; 3; 4 y 6 células (Rocha *et al.*, 1998).

1.10. Análisis de datos

Las mediciones se realizaron a partir de los ovocitos obtenidos de animales mestizos de DP, predominantemente *Bos indicus* o *Bos taurus*. Las tasas de maduración (proporción de ovocitos totalmente madurados, con relación al total), tasa de fecundación (proporción de ovocitos penetrados normalmente, con relación al total ovocitos puestos a fecundar) y de división a las 48 h (proporción de cigotos divididos con relación al total de cigotos pasados a cultivo) de ambas especies se expresaron como frecuencias y proporciones analizadas mediante el test de χ^2 del paquete estadístico SAS. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando ($P < 0,05$).

2. Resultados y discusión

Se evaluaron un total de 243 ovocitos, de los cuales 116 pertenecieron al grupo experimental con predominancia fenotípica *Bos taurus* y 127, al grupo *Bos indicus*. Los resultados se resumen en la tabla 1, donde se muestra la progresión meiótica de los ovocitos bovinos. En el presente estudio, la tasa de maduración total obtenida fue de 55,55%, resultados similares a los observados por Báez y col. (2008) (61,36%) y Chávez y col. (2010) 59,50% en ovocitos bovinos madurados recuperados de hembras mestizas provenientes de matadero. La tasa de los ovocitos degenerados se mantuvo bastante baja con un 13%, lo que sugiere una buena calidad en el sistema de maduración *in vitro*.

Con referencia a los resultados obtenidos para el grupo experimental con predominancia fenotípica *Bos indicus*, la tasa de maduración fue superior, con 66,93% de ovocitos madurados, comparados con los *Bos taurus* con un 43,10%. Fue posible observar diferencias estadísticamente significativas con respecto a ambos grupos experimentales ($P < 0,01$), demostrando que los ovocitos con predominancia racial *Bos indicus* son más competentes para reanudar la meiosis hasta el estadio de metafase II. Los porcentajes de ovocitos inmaduros con predominancia *Bos indicus* fueron más bajos (27,56%) que los porcentajes de ovocitos inmaduros con predominancia *Bos taurus* que alcanzaron un porcentaje de 51,72%, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$). En referencia a los ovocitos madurados resultados similares fueron encontrados por Chá-

TABLA 1. Progresión meiótica de ovocitos bovinos de ambos grupos raciales con predominancias fenotípicas *Bos taurus* y *Bos indicus*

Predom inio Racial	Nº de COCs totales evalua- dos	Nº de ovocitos maduros			Nº de ovocitos inmaduros				Nº de Deg n %
		Telol n %	MII n %	Total n %	Anal n %	MI n %	CCII n %	Total n %	
<i>Bos taurus</i>	116	23 (19,83)	27 (23,27)	50 (43,10) ^b	21 (18,10)	36 (31,03)	3 (2,58)	60 (51,72) ^a	6 (5,17)
<i>Bos indicus</i>	127	31 (24,41)	54 (42,52)	85 (66,93) ^a	18 (14,17)	15 (11,85)	2 (1,57)	35 (27,56) ^b	7 (5,51)
Total	243	54 (22,22)	81 (33,33)	135 (55,55)	39 (16,05)	42 (17,28)	5 (2,06)	95 (39,09)	13 (5,35)

* a,b.: Valores en la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (P < 0,01). Telol: telofase I. MII: metafase II. Anal: anafase I. MI: metafase I. CCII: condensación cromosómica II. N° de Deg: Ovocitos degenerados. COCs: Complejos cùmulus-ovocitos.

vez y col. (2010) con un 50,94% de ovocitos maduros para *Bos taurus* y un 66,17% para *Bos indicus*. Con diferencias estadísticas significativas (P < 0,05), con respecto a la tasa de ovocitos inmaduros obtuvo un 29,25% para *Bos taurus* y un 23,53% para *Bos indicus*.

Para la fecundación se evaluaron un total de 200 presuntos cigotos, de los cuales 97 pertenecieron al grupo con predominancia fenotípica *Bos taurus* y 103 a *Bos indicus*. En la tabla 2 se especifican los porcentajes que presentaron ambos grupos raciales para el número de ovocitos no penetrados, penetrados normales, penetrados anormales y degenerados. En los resultados obtenidos en FIV, el porcentaje total de ovocitos penetrados fue de 38%. Chávez y col. (2010) obtuvieron un 12,21%, mientras que otros autores obtuvieron mayores tasas de penetración como Hashimoto y col. (2002) con 75%; Méo y col. (2007) con un 69,6%; Chohan y Hunter (2004) y González y col. (2000) con 49,4 y 41,17%, respectivamente. En cuanto a los ovocitos penetrados normalmente, las diferencias entre ambos grupos experimentales fueron sutiles, pero a pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas, se observó que en el grupo *Bos indicus* con un 43,68%, mantuvo el mayor porcentaje de ovocitos penetrados normalmente con respecto a un 31,96% del grupo *Bos taurus*. Esta

TABLA 2. Evaluación de fecundación de ovocitos bovinos de ambos grupos raciales con predominancias fenotípicas *Bos taurus* y *Bos indicus*

Predominio Racial	Nº de Ovoc. Totales evaluados	No Penet. n (%)	Ovoc. Penet. Normales		Ovoc. Penet. Anormales			Deg. n (%)
			2 PN+CP n (%)	Teloll n %	Asin. n %	2PN n %	Total n %	
<i>Bos taurus</i>	97	17 (17,52) ^b	31 (31,96)	10 (10,31)	22 (22,68)	13 (13,40)	45 (46,39)	4 (4,12)
<i>Bos indicus</i>	103	7 (6,80) ^a	45 (43,68)	10 (9,71)	18 (17,47)	15 (14,56)	43 (41,74)	8 (7,77)
Total	200	24 (12)	76 (38)	20 (10)	40 (20)	28 (14)	88 (44)	12 (6)

* a,b.: Valores en la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (P < 0,05). Ovoc. No Penet.: Ovocitos no penetrados. 2PN+CP: ovocitos penetrados presentando 2 pronúcleos y un corpúsculo polar. Telo II: ovocitos en telofase II. Asin: ovocitos asincrónicos. > 2 PN: ovocitos poliespérmicos. Deg.: Degenerados.

tendencia se mantuvo para los ovocitos penetrados anormalmente donde el grupo *Bos indicus* estuvo por debajo en cuanto a la tasa de penetración anormal con un 41,74% con respecto al grupo *Bos taurus* con 46,39%. Estas anomalías podrían ser causadas por ciertos acontecimientos, tales como: la penetración del espermatozoide, la descondensación del espermatozoide, los defectos asociados a la maduración nuclear, los defectos asociados con la maduración citoplasmática, la falta de activación del ovocito (Edirisinghe et al., 1997). La tasa de los ovocitos no penetrados para el grupo con predominancia *Bos indicus* fue de 6,80%, mientras que para *Bos taurus* fue de 17,52%, encontrándose diferencias estadísticamente significativas (P < 0,05).

Para la división embrionaria se evaluaron un total de 816 embriones que fueron a cultivo, 517 pertenecieron al grupo con predominancia fenotípica *Bos taurus* y 299 al grupo *Bos indicus*. Transcurridas 48 h phi se encontró que, se dividieron 167 embriones para *Bos taurus* y 108 para *Bos indicus*. En la tabla 3 se especifican los números y porcentajes que presentaron ambos grupos raciales para la división de los embriones de dos y de más de dos células. En cuanto a la tasa de división total a las 48 h phi fue de

TABLA 3. Evaluación de división 48 horas post-inseminación de embriones bovinos de ambos grupos raciales con predominancias fenotípicas *Bos taurus* y *Bos indicus*

Predominio Racial	Total Cig. a CIV n %	Total Embr. div. a las 48 h pi n %	2 Cél n %	>2 Cél n %
<i>Bos taurus</i>	517	167 (32,30)	47 (28,14)	120 (71,86)
<i>Bos indicus</i>	299	108 (36,12)	28 (25,93)	80 (74,07)
Total	816	275 (33,70)	75 (27,27)	200 (72,73)

un 33.70%. En otros estudios se encontraron tasas de división mayores. Entre ellos Torres-Junior y col. (2008) con un 74,6%, Paula-Lopes y col. (2003) con un 75,5% y Rivera y Hansen (2001) con un 85%.

Es evidente la diferencia que existe entre la tasa de división alcanzada en este estudio y la observada en otros trabajos, esto puede deberse a factores relacionados con las condiciones en el cultivo. Rivera y Hansen (2001) observaron que, con medio condicionado (medio de cultivo celular que contiene los productos secretados por un cultivo celular en un tiempo dado) se obtuvieron mayores porcentajes de división en embriones de estadios tempranos (de 4 a 8 células) a diferencia de las tasas de división alcanzada por embriones cultivados con células oviductales. Otra razón por la cual se obtiene una baja tasa de desarrollo podría deberse a la selección de los COCs previo a la maduración, etapa en la cual se debería ejercer una estricta evaluación sobre la calidad morfológica, tanto de las células del cúmulus como del ovoplasma (Sirad *et al.*, 2006).

El estrés calórico, es una situación que afecta la producción de leche en las regiones tropicales (Ávila *et al.*, 2002). Las altas temperaturas y elevada humedad relativa del ambiente son comunes en el verano del trópico y con frecuencia rebasan la capacidad de los mecanismos homeostáticos termorreguladores de los animales para la disipación del calor, provocando condiciones de estrés que afectan su fisiología (Stainer *et al.*, 1986). Esto se refleja en la disminución del consumo voluntario de alimentos (Hafez, 2002), una baja producción de leche (Wets *et al.*, 2003) y la disminución en la eficiencia reproductiva de las vacas en producción (Talbot *et al.*, 2003).

La capacidad que tiene el ovocito para mantener el desarrollo embrionario y resistir a los daños que causa el estrés calórico, la mala alimentación, entre otros, es adquirida en el ovario durante las etapas de desarrollo que preceden a la ovulación o en el caso de la maduración *in vitro*, que preceden a la recuperación del ovocito a partir del folículo. Según Hyttel y col. (1997), el desarrollo del ovocito consta de las fases de crecimiento, capacitación durante la dominancia folicular y maduración final, que juega un papel clave en la adquisición de la competencia total para el desarrollo. Se ha observado que durante este proceso, el ovocito se prepara para mantener el posterior desarrollo embrionario, mientras que durante la maduración se le proporciona una señal apropiada para desencadenar el desarrollo (Moor y Trounson, 1997).

La exposición a estrés por calor tiene un efecto menos nocivo en la fertilidad de las razas de ganado adaptadas a los climas cálidos que en la de razas de climas templados (Roth *et al.*, 2001). Esta diferencia se ha atribuido a la capacidad superior de bovinos tolerantes al calor para regular la temperatura corporal en presencia de estrés calórico (Adeyemo *et al.*, 1979; Bennet *et al.*, 1985; Block *et al.*, 2002; González *et al.*, 2000; Hansen y Arechiga, 1999).

Allworth y Albertini (1992, 1993) describen que existe evidencia consistente de que la maduración meiótica involucra vías de interacción entre las células del cúmulus y el ovocito bovino. Ambos afirman que, la maduración *in vitro* del ovocito bovino involucra modificaciones en el citoesqueleto de las células del cúmulus que podrían regular el inicio, la progresión y termino de la maduración del ovocito.

Teniendo en consideración que la colecta de los ovarios para la realización de este estudio, se llevó a cabo durante el verano (abril-mayo), es posible encontrar una explicación para la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de fecundación de ambos grupos experimentales. Hansen y col. (1999) informan que, el éxito de la FIV se reduce durante los periodos cálidos del año en los Estados Unidos de Norteamérica (EUA) (area sub tropical), esto se ha demostrado en ovarios de matadero obtenidos de vacas mestizas Angus y Holstein. Es precisamente por ello que se esperaba encontrar que el genotipo tuviese efectos importantes sobre la magnitud del estrés calórico en todo animal y en respuesta al choque térmico en los tejidos.

En el presente estudio, el grupo experimental con predominancia fenotípica *Bos indicus* se observó un 17,47% de ovocitos asincrónicos y un 14,56% de ovocitos polispérmicos. Similares porcentajes se observaron en el grupo experimental con predominancia fenotípica *Bos taurus* donde se obtuvieron un 22,68 y 13,40%, respectivamente. Estos porcentajes se corresponden con otros estudios realizados, en donde se observó de forma frecuente porcentajes entre el 10 y el 25% de asincronía en ovocitos bovinos (Coy *et al.*, 2005; Wortzman y Evans, 2004).

Si bien los ovocitos asincrónicos no se consideran una anomalía de la fecundación, se conoce que son producto de un fallo en el proceso de fecundación, apareciendo en algunos de los casos el desarrollo del segundo pronúcleo pocas h posteriores, formando un cigoto diploide (Rivera y Hansen, 2001). La presencia de un único pronúcleo indica la activación del ovocito y la formación del pronúcleo femenino (Edirisinghe *et al.*, 1997), que generalmente contiene la cabeza del espermatozoide condensada o parcialmente descondensada y pueden permanecer en este estado o activarse partenogénicamente (Thatcher y Hansen, 1993). Según Ijaz y Hunter (1989), la asincronía es un error que puede estar causado por la ausencia del factor de crecimiento del pronúcleo masculino (MPGF), debido a una maduración citoplasmática deficiente o la omisión de hormona luteinizante (LH) o de la gonadotropina coriónica humana (hCG) en el medio utilizado para maduración.

Las causas de la poliespermia aún no están muy claras (Jarvis, 1990; Tournaye *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 2008). Entre las causas del fallo en el bloqueo de la poliespermia se pueden mencionar las siguientes: una inadecuada maduración *in vitro* de los ovocitos, lo que provoca una exocitosis defectuosa de los gránulos corticales (Sun, 2003), excesivo tiempo de vida de los ovocitos utilizados (Wortzman y Evans, 2004), el uso de un alto número de espermatozoides capacitados por ovocito, defectos a nivel de la zona pelúcida o inadecuada composición de los medios de cultivo con excesiva presencia de proteínas. Este bloqueo que funciona adecuadamente en condiciones fisiológicas, demuestra una baja eficacia *in vitro* (Thatcher y Hansen, 1993). Cualquiera de estas observaciones o combinación de ellas podría explicar nuestros elevados niveles de poliespermia en ambos grupos.

Otros trabajos como el de Eberhardt y col. (2008), quienes estudiaron los efectos del estrés térmico sobre el desarrollo embrionario evaluando el ganado Nelore (*B. indicus*) Angus y Holstein (*B. taurus*), y mestizos (*Bos indicus* frente *Bos taurus*); concluyeron que los embriones fecundados con semen Nelore son más capaces de sobrevivir al calor en las primeras etapas de desarrollo que los ovocitos Holstein fecundados con Angus, siendo esto resultado de la contribución genética de los ovocitos y los espermatozoides. Estos resultados indican que, al igual que el ovocito, el espermatozoide influye en la capacidad termotolerante de los embriones producidos *in vitro*, sin embargo en este estudio solo se utilizó una raza de toros.

En particular, los embriones de ganado Brahman son más capaces de sobrevivir al aumento de la temperatura que los embriones de Angus y Holstein, dos razas termosensibles. Además, los linfocitos de Brahman y Senepol (*Bos indicus*) experimentan menos apoptosis después del choque térmico que los linfocitos de otras razas. Por lo tanto, los ganados Brahman y Senepol no sólo regulan la temperatura corporal en la respuesta al estrés por calor con mayor eficacia que las razas de climas templados (González *et al.*, 2000; Hansen y Arechiga, 1999), sino que también la hipertermia que resulta de la tensión de calor tiene menos efectos negativos sobre la función celular.

La exposición de los embriones hasta 41°C inhibe su desarrollo. La identificación de los genes que controlan la termotolerancia celular en el ganado Brahman (*Bos indicus*) puede, por lo tanto, dar lugar a estrategias genéticas para mejorar la supervivencia embrionaria durante el estrés calórico en las razas que no son termotolerantes. Es importante determinar la etapa del desarrollo embrionario en la que las diferencias genéticas de resistencia al choque térmico se hacen evidentes. Los embriones bovinos son más sensibles al choque térmico en las primeras fases de división (previas a la implantación) (Edwards y Hansen, 1997). Este período es también uno de los más limitados en cuanto a expresión génica (Roth *et al.*, 2001). En algunas ocasiones es posible que las diferencias genéticas en cuanto a la termotolerancia no se manifiesten, ya que es hasta después de la activación del genoma embrionario cuando está completamente desarrollado, que se inicia la actividad transcripcional, es decir, cuando el embrión bovino está en la fase de ocho a 16 células (Paula-Lopes *et al.*, 2003).

Otro estudio que refleja la adaptación que presenta el ganado *Bos indicus* a ambientes tropicales es el realizado por Camargo y col. (2007), quienes demostraron que existen diferencias reproductivas entre hembras *Bos indicus* y *Bos taurus*, debido a que existen diferencias significativas y evidentes en la transcripción de la expresión de la proteína de choque térmico Hsp 70.1, que promueve la protección contra el daño por calor, y su transcripción se asocia al estrés. Estos autores concluyen que esta diferencia podría estar asociada con el desarrollo de la competencia y la adaptación para el ambiente tropical de las vacas *Bos indicus* a diferencia de las *Bos taurus*, ya que la transcripción de Hsp 70.1 se incrementa en condiciones estresantes (Camargo *et al.*, 2007).

Los procesos reproductivos masculino y femenino en los mamíferos son muy sensibles a perturbaciones por hipertermia, reduciendo la cantidad y la calidad de la producción de semen y la disminución en la calidad del ovocito, respectivamente (Hansen *et al.*, 2001; Statistical Analysis Institute, 2001), disminuyendo la fecundidad (Tournaye *et al.*, 1996). Además, la baja fertilidad en temporadas cálidas se ha atribuido a efectos retardados del estrés por calor en el verano obteniendo ovocitos de mala calidad y un bajo desarrollo de embriones (Rocha *et al.*, 1998).

Los resultados derivados de este estudio señalan que, el ganado con predominancias racial *Bos indicus* presenta mejores porcentajes de maduración y FIV, que el ganado predominantemente *Bos taurus*, debido a que presentan ovocitos más competentes que pudieran corresponderse con mejor adaptabilidad a ambientes tropicales, como resultado de la selección de genes que controlan la termotolerancia, y que pueden llegar a desarrollarse hasta blastocisto en mayor porcentaje que el ganado *Bos taurus*, demostrando mayor habilidad reproductiva.

Conclusiones

La capacidad de maduración *in vitro* de los ovocitos provenientes de vacas mestizas con predominancia racial *Bos indicus* mostraron ser más competentes para reiniciar la meiosis en comparación con los ovocitos provenientes de vacas mestizas con predominancia racial *Bos taurus*. La competencia para ser fecundados que presentaron los ovocitos con predominancia racial *Bos indicus* superó a la de los ovocitos procedentes de hembras mestizas *Bos taurus*, sin embargo no se alcanzaron diferencias sig-

nificativas en este renglón. Mas sin embargo, se logró detectar una diferencia significativa en el porcentaje de ovocitos no penetrados, donde el porcentaje fue significativamente menor en el grupo de los *Bos indicus*. La tasa de división embrionaria a las 48 hpi para ovocitos *Bos indicus* y *Bos taurus* madurados y fecundados fueron similares.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia y a la empresa GENICA por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo. Asimismo a la Universidad Estatal Paulista, Jaboticabal, Sao Paulo, Brasil (FCAV-UNESP) por el apoyo y asesoría técnica facilitada para llevar a cabo esta investigación.

Referencias

- Al-Katanani, Y.; Paula-Lopes, F.; Hansen, P. (2002). Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in holstein cows. *J. Dairy Sci.* 85: 390-396. 2002.
- Allworth, A.; Albertini, D. (1992). Cytoskeletal reorganization in bovine cumulus oocyte complexes in maturation associated. *Biol. Reprod.* 46. (Suppl.1): 139. (Abs.353). 1992.
- Allworth, A.; Albertini, D. (1993). Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cells cytoskeleton. *Develop. Biol.* 158: 101-112. 1993.
- Adeyemo, O.; Heath, E.; Adadevoh, B. K.; Steinbach, J.; Olaloku, E. (1979). Some physiological and behavioral responses in *Bos indicus* and *Bos taurus* heifers acclimatized to the hot humid seasonal equatorial climate. *Int. J. Biometeorol.* 23:231-41. 1979.
- Aranguren-Méndez, J.; Yáñez-Cuellar, L.F. (2005). *Planifique cruzamientos. Manual de ganadería doble propósito*. González-Stagnaro C., Soto-Belloso E. (Eds). Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo-Venezuela. Cap. II 8: 119-124. 2005.
- Ávila, P. M. F.; Torres De C, A.; Pato, L. N. (2002). Razas lecheras: ambiente y comportamiento animal en los trópicos. *EMBRAPA gado de leite. FEPALE*. Brasil. Pp 1-19. 2002.

- Báez, F.; Hernández, L.; Villamediana, P. (2008). Estudio Estructural del Huso Meiótico de Ovocitos Bovinos Vitricados, *SciELO Venez.* 18(3):4. 2008.
- Barros, C.; Pegorer, M.; Moraes, J.; Eberhardt, B.; Monteiro, F. (2006). Importance of sperm genotype (*indicus* versus *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. *Theriogenol.* 65: 210-218. 2006.
- Bennett, I. L.; Finch, V. A.; Holmes, C. R. (1985). Time spent in shade and its relationship with physiological factors of thermoregulation in three breeds of cattle. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 13:227-36. 1985.
- Block, J.; Chase, J. R.; Hansen, P. J. (2002). Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal vs. paternal contribution. *Mol. Reprod. Develop.* 63:32-37. 2002.
- Camargo, L.; Viana, J.; Ramos, A.; Serapiao, R.; De Sa, W.; Ferreira, A.; Guimaraes, M.; Vale-Filho, V. (2007). Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenol.* 68: 626-632. 2007.
- Chávez, A.; Baez, F.; Hernandez, H.; Villamediana, P. (2010). Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancias fenotípicas de las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Rev. Cientif. de Vet.* 20(3): 259-267. 2010.
- Chohan, K. R.; Hunter, A. G. (2004). *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. *Theriogenol.* 61: 373-380. 2004.
- Coy, P.; Romar, R.; Payton, R. R.; Mccann, L.; Saxton, A. M.; Edwards, J. L. (2005). Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Anim. Reprod.* 129:19-26. 2005.
- Eberhardt, B., Satrapa, R., Capinzaiki, C., Trinca, L., Barros, C. (2008). Influence of the breed of bull (*bos taurus indicus* vs. *bos taurus taurus*) and the breed of cow (*bos taurus indicus*, *bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. *Anim. Reprod. Sci.* 114(1-3):54-61 2008.
- Edirisinghe, W. R.; Murch, A.; Junk, S.; Yovich, J. L. (1997). Cytogenetic abnormalities of unfertilized oocytes generated from *in-vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a double-blind study. *Hum. Reprod.* 12 (12): 2784-2791. 1997.
- Edwards, J. L.; Hansen, P. J. (1997). Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cells embryos and compromises function of maturing oocyte. *Biol. Reprod.* 55: 340-346. 1997.
- Gaughan, J. B.; Mader, T. L.; Holt, S.; Josey, M. J.; Rowan, K. J. (1999). Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. *J. Anim. Sci.* 77. 2398-2405. 1999.

- González, N.; Echegaray, A.; Gil, L.; Falceto, M.V. (2000). Efecto de 17 β -estradiol en la maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos de novillas sacrificadas en el matadero. *Med. Vet.* 17: 173-180. 2000.
- Hafez, E. S. E.; Hafez, B. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Interamericana McGraw-Hill. 7ma Ed. Pp. 301-315. 2002.
- Hammond, A. C.; Olson, T. A.; Chase, J. R.; Bowers, C. C.; Randel, E. J.; Murphy, C. N. (1996). Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. *J. Anim. Sci.* 74:295-303. 1996.
- Hansen, P. J.; Arechiga, C. F. (1999). Strategies for managing the heat-stressed dairy cow. *J. Anim. Sci.* 77:36-50. 1999.
- Hansen, P. J.; Drost, M.; Rivera, R.; Paula-Lopes, M.; Al-Katanani, F. F.; Krininger, Y. M., Chase, J. R. (2001). Adverse impact of the heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenol.* 55: 91-103. 2001.
- Hashimoto, S.; Minami, N.; Takakura, R.; Imai, H. (2002). Bovine immature oocytes developmental competence during meiotic arrest *in vitro*. *Biol. Reprod.* 66:1696-1701. 2002.
- Hyttel, P.; Fair, T.; Callesen, H.; Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenol.* 47 (1): 23-32. 1997.
- Hernández, H. (2005). Fecundación *in vitro*. En: *Manual de Ganadería Doble Propósito*. C. González-Stagnaro, E. Soto Belloso (Eds). Ediciones Astro Data S.A. Fundación Girarz. Cap. VIII. Pp 615-619. 2005.
- Holyoak, G.; Wang, S.; Liu, G.; Bunch, T.; Evans, R. C. (1998). The effect of ceftiofur sodium (Naxcel) of bovine oocyte and preimplantation embryonic development production technique. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 21: 92-98. 1998
- Ijaz, A.; Hunter, A. G. (1989). Evaluation of calcium-free Tyrode's sperm capacitation medium for use in bovine *in vitro* fertilization. *J. Dairy Sci.* 72:3280-3285. 1989.
- Isea-Villasmil, W.; Aranguren-Méndez, J. A. (2005). *Clasificación fenotípica en vacas mestizas*. *Manual de Ganado Doble Propósito*. Ediciones Astro Data S.A. Fundación Girarz. Cap. II Pp.76-81. 2005.
- Izquierdo, D. (1996). *Cultivo de embriones caprinos producidos in vitro*. Doctoral en Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona, España. Tesis de Grado. Pp 277. 1996.
- Jarvis, L.S. (1990). Latin American beef and Milk Policies: Lessons for the 90s from Experiences in the 70s and 80s. *Anais da 12a Reunião da Associação Latino-*

- Americana de Produção Animal*, Campinas, SP. Brasil 1990. Pp 335-350. 1990.
- Lozano, R. R.; Vásquez, C. G.; González-Padilla, E. (2005). Effect of heat stress and its interaction with other management and productive variables on pregnancy rate in dairy cows in aguascalientes, mexico. *Vet. Méx.* 36 (3): 245-260. 2005.
- Méo, S. C.; Ferreira, C. R.; Perecin, F.; Yamazaki, W.; Leal, L. V.; Meirelles, F. V.; Garcia, J. M. (2007). Desenvolvimento embrionário, visualização de pronúcleos e transferência pronuclear após centrifugação de zigotos bovinos em meio com citocalasina. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Pecuária Sudeste.* 11: 1-34. 2007.
- Moor, R.M.; Trounson, A.O. (1997). Hormonal and follicular factors affecting maturation on sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod Fertil.* 49: 101-109. 1997.
- Parrish, J.; Susko-Parrish, J.; Winer, M.; First, N. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. and Reprod.* 38: 1171-1180. 1988.
- Paula-Lopes, F. F.; Chase, C. C., Al-Katanani, Y. M.; Kringer, C. E 3RD.; Rivera, R. M.; Tekin, S.; Majewski, A. C.; Ocon, O. M.; Alson, T. A; Hansen, P. J. (2003). Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperature versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reprod.* 125(2): 285-294. 2003.
- Rivera, R. M.; Hansen, P. J. (2001). Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reprod.* 121: 107-115. 2001.
- Rocha, A.; Randel, R. D.; Broussard, J. R.; Lim, J. M.; Blair, R. M.; Roussel, J. D. (1998). High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenol.* 49:657-65. 1998.
- Roth, Z.; Arav, A.; Bor, A.; Zeron, Y.; Braw-Tal, R.; Wolfenson, D. (2001). Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reprod.* 122:737-744. 2001.
- Roth, Z.; Meidan, R.; Shaham-Albalancy, A.; Braw-Tal, R.; Wolfenson, D. (2001). Delayed effect of heat stress on steroid production in medium sized and preovulatory bovine follicles. *Reprod.* 121: 745-751. 2001.

- Sirard, M. C.; Richard, F.; Blondin, P.; Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenol.* 65: 126-136. 2006.
- Smidt, D.; Niemann, H. (1999). Biotechnology in genetics and reproduction. *Livest. Prod. Sci.* 59: 207-221. 1999.
- Stainer, M. W. Mount, L. E.; Light, J. (1986). Energy balance and temperature regulation. Molecular Medical Biochemistry. *Cambridge University Press.* Pp. 10-22. 1986.
- Statistical Analysis Institute (SAS). SAS/STAT User's Guide. 8.2 Cary, NC. (2001).
- Sun, Q.Y. (2003). Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microsc. Res. Tech.* 61:342-348. 2003.
- Talbot, P.; Shur, B. D.; Myles, D. G. (2003). Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol. Reprod.* 68:1-9. 2003.
- Thatcher, W.W.; Hansen P.J. (1993). Environment and reproduction. Reproduction in domesticated animals. *World Anim. Sci.* 9: Pp 433-57. 1993.
- Tournaye, H.; Liu, J.; Nagy, P.Z.; Camus, M.; Goossens, A.; Silber, S.; Van Steirteghem, A. C.; Devroey, P. (1996). Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.* 11 (l) 127-132. 1996.
- Torres-Junior, J. R.; Pires, M.; De Sa, W. F.; Ferreira, A.; Viana, J. H. M.; Camargo, L.; Ramos, A.; Folhadella, I.; Polisseni, J.; Freitas, C.; Clemente, C. A. A.; Filho, M. F.; Paula-Lopez, F. F.; Baruselli, P. S. (2008). Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *bos indicus* cattle. *Theriogenol.* 69: 155-166. 2008.
- Wets, J. W.; Mullinix, B. G.; Bernard, J. K. (2003). Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86: 232-242. 2003.
- Wolfenson, D.; Roth, Z.; Meidan, R. (2000). Impaired reproduction in heat-stressed cattle:basic and applied aspects. *Anim. Reprod Sci.* 60-61:535-547. 2000.
- Wortzman, G. B.; Evans, J. P. (2004). Membrane and cortical abnormalities in post-ovulatory aged eggs: analysis of fertilizability and establishment of the membrane block to polyspermy. *Mol. Hum. Reprod.* 11:1-9. 2004.