



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo



CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

Relación entre la hipertermia materna y el síndrome de la vaca repetidora: empleo de embriones como opción terapéutica

Relationship between maternal hyperthermia and repeat breeding syndrome in cattle: use of embryos as a therapeutic option

Máster Universitario en Biología y Tecnología de la
Reproducción

Trabajo de Fin de Máster

Autora: **Olaia Akesolo Atutxa**

Tutor: **Alejandro Vázquez Martín**

Cotutora: **Paula Núñez Martínez**

Junio de 2022

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, me gustaría dedicar estos primeros párrafos a toda esa gente que ha estado presente a lo largo de este largo y bonito viaje y ha hecho posible que hoy esté aquí escribiendo estas palabras a punto de dar otro pequeño salto hacia mis objetivos.

Para comenzar, quería agradecer a mi tutor Alejandro Vázquez Martín por darme la oportunidad de llevar a cabo las prácticas del máster en AsturBiotech, por permitirme desarrollar este trabajo junto a él y por haber compartido conmigo todo su conocimiento y experiencia, al igual que a mi cotutora Paula Núñez Martínez.

Además, tampoco puedo dejar sin nombrar a mis compañeras del máster, ya que han conseguido que Asturias abriese un pequeño hueco en mi corazón, y en especial a Malen, por haberme ayudado en todo momento a lo largo del transcurso del máster, por estar en todo momento conmigo y por hacer tan especial esta etapa.

Quiero terminar agradeciendo a mis padres, a mi hermano, a toda mi familia y amigos por haber apostado siempre muy fuerte por mí y estar a mi lado en los momentos más difíciles. Y a mis compañeras/os Veterinarias/os, por haberme dado alas para volar muy alto y llegar hasta aquí.

RESUMEN

La zona termoneutra es el rango de temperatura ambiental en el que la producción y pérdida de calor corporal están en equilibrio. La zona termoneutra de las vacas se sitúa entre 16°C y 25°C y dentro de este rango, los animales mantienen una temperatura corporal fisiológica de 38,4°C-39,1°C. Cuando la temperatura ambiental sobrepasa los 25-26°C se produce el estrés térmico y la hipertermia materna, que se definen como el estado en el que se activan los mecanismos para mantener el equilibrio térmico corporal y el aumento de la temperatura corporal de la hembra, respectivamente. Sin embargo, se sabe que los ajustes fisiológicos frente al estrés térmico tienen consecuencias negativas en la fertilidad, dando lugar a la aparición del síndrome de las vacas repetidoras, que son hembras subfértiles, normales en el examen clínico, pero que no quedan gestantes después de ≥ 3 inseminaciones artificiales. Se ha demostrado que los principales efectos nocivos de la hipertermia materna sobre la fertilidad se producen en los ovocitos durante la foliculogénesis y en los embriones en fase de escisión. Por este motivo, el objetivo de esta revisión sistemática es esclarecer el efecto de la hipertermia materna a nivel celular/molecular en los ovocitos y embriones tempranos, además de analizar el potencial de la técnica de la transferencia embrionaria como opción terapéutica frente al síndrome de las vacas repetidoras.

Palabras clave: embriones, estrés térmico, fertilidad, hipertermia, ovocitos, síndrome de la vaca repetidora, transferencia embrionaria.

ABSTRACT

The thermoneutral zone is the environmental temperature range in which body heat production and heat loss are in equilibrium. The thermoneutral zone of cows is between 16°C and 25°C and within this range, animals maintain a physiological body temperature of 38.4°C-39.1°C. When the environmental temperature exceeds 25-26°C, heat stress and maternal hyperthermia occur, which are defined as the state in which mechanisms are activated to maintain body heat balance and the increase of female's body temperature, respectively. However, physiological adjustments against heat stress are known to have negative consequences on fertility, resulting in the occurrence of repeat breeding syndrome in cattle, which are subfertile females that are normal on clinical examination but fail to become pregnant after ≥ 3 artificial inseminations. It has been shown that the main deleterious effects of maternal hyperthermia on fertility occur in oocytes during folliculogenesis and in cleavage stage embryos. For this reason, the aim of this systematic review is to clarify the effect of maternal hyperthermia at the cellular/molecular level on oocytes and early embryos, as well as to analyze the potential of the embryo transfer technique as a therapeutic option against the repeat breeding syndrome in cattle.

Key words: embryo transfer, embryos, fertility, heat stress, hyperthermia, oocytes, repeat breeding syndrome.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN = Ácido desoxirribonucleico	CIV = Cultivo <i>in vitro</i>
ADNmt = Ácido desoxirribonucleico mitocondrial	CL = Cuerpo lúteo
AG = Ácidos grasos	CTSB = Catepsina B
AGE = Activación del genoma embrionario	CX43 = Conexina 43
AGPI = Ácidos grasos poliinsaturados	DICER = Ribonucleasa de la familia ARNasa III
AGS = Ácidos grasos saturados	DNAJB1 = Miembro 1 de la subfamilia B del homólogo DnaJ
AI = Anafase de la primera división meiótica	DNMT = ADN metiltransferasa
AKR1B1 = Familia 1 de aldo-ceto reductasa miembro B1	DROSHA = Enzima de clase 2 ribonucleasa III
AKT = Proteína quinasa B	E₂ = Estradiol
ARNm = Ácido ribonucleico mensajero	EPA = Agencia de Protección Medioambiental
ATP = Adenosín trifosfato	ET = Estrés térmico
Bax = Proteína X asociada a Bcl-2	F = Embriones frescos
Bcl-2 = Linfoma de células B-2	FIV = Fecundación <i>in vitro</i>
BH4 = Dominio de homología Bcl-2 4	FSH = Hormona foliculoestimulante
BIP = Péptido inhibidor de Bax	G6PD = Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
BSA = Albúmina sérica bovina	GC = Gránulos corticales
CAT = Catalasa	GDF9 = Factor de crecimiento / diferenciación 9
CCNB1 = Ciclina B1	GLUT1 = Transportador de glucosa 1
CDH1 = Cadherina 1	
CG = Complejo de Golgi	

GnRH = Hormona liberadora de gonadotropinas

GPX = Glutathion peroxidasa

H3K9 = Lisina 9 de la histona H3

H3K9me3 = Trimetilación de la lisina 9 de la histona H3

HP1 = Proteína de la heterocromatina 1

HSP = Proteína de choque térmico

HSPA = Proteína de choque térmico de la familia A o HSP70

HSPB = Proteína de choque térmico de la familia B

IA = Inseminación artificial

IAE = Inseminación artificial tras la detección de estro

IATF = Inseminación artificial a tiempo fijo

IFNT = Interferón- τ

IGF2R = Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 2

IGF-I = Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I

IL6 = Interleucina 6

IL6R = Receptor de la interleucina 6

IL6ST = Transductor de señal de la interleucina 6

LH = Hormona luteinizante

LIF = Factor inhibidor de leucemia

MI = Metafase de la primera división meiótica

MiARN = Micro ARN

MII = Metafase de la segunda división meiótica

MIV = Maduración *in vitro*

MnSOD = Manganese superóxido dismutasa

MOS = Proto-oncogen serina/treonina quinasa

MT-CO1 = Citocromo C oxidasa I codificada por las mitocondrias

NRF2 = Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2

Oct-4 = Factor de transcripción 4 de unión a octámeros

P₄ = Progesterona

PGF2 α = Prostaglandina F2 α

PLAC8 = Asociada a la placenta 8

POU5F1 = Factor de transcripción 1 de clase 5 de dominio POU

PPARGC1A = Coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas

PTGS2 = Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2

RE = Retículo endoplasmático

ROS = Especies reactivas de oxígeno

RVG = Rotura de la vesícula germinal

S1P = Esfingosina 1-fosfato

SOD = Superóxido dismutasa

SOF = Fluido oviductal sintético

SVR = Síndrome de la vaca repetidora

TAT-BH4 = Péptido anti-apoptótico del dominio BH4

TCI = Temperatura crítica inferior

TCS = Temperatura crítica superior

TD = Transferencia directa

TE = Transferencia embrionaria

TETF = Transferencia embrionaria a tiempo fijo

TFAM = Factor A de transcripción mitocondrial

THI = Índice temperatura-humedad

TI = Telofase de la primera división meiótica

UCHL1 = Ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1

V = Embriones vitrificados

VG = Vesícula germinal

VR = Vaca repetidora

XIAP = Proteína inhibidora de la apoptosis ligada al X

ZTN = Zona termoneutra

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CICLO ESTRAL DE LA VACA	1
1.1.1. Regulación endocrina del ciclo estral.....	1
1.1.2. Etapas del ciclo estral.....	4
1.1.3. Dinámica folicular bovina	6
1.1.4. Acontecimientos durante la maduración ovocitaria	8
1.2. DESARROLLO EMBRIONARIO EN LA VACA	10
1.3. SÍNDROME DE LA VACA REPETIDORA	12
1.3.1. Definición, incidencia y repercusiones	12
1.3.2. Causas	13
1.3.3. Estrés térmico.....	15
1.3.3.1. Zona termoneutra y estrés térmico	15
1.3.3.2. Efecto del estrés térmico en la reproducción.....	16
1.3.3.3. Opción terapéutica frente al estrés térmico: Transferencia embrionaria	17
2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	19
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
3.1. HIPÓTESIS	20
3.2. OBJETIVOS	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1. DISEÑO DE LA REVISIÓN	21
4.2. ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA.....	21
4.3. SELECCIÓN DE ESTUDIOS: CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	21
4.4. EXTRACCIÓN DE LA INFORMACIÓN.....	23
5. RESULTADOS	24
5.1. EFECTO DE LA HIPERTERMIA MATERNA EN LOS OVOCITOS Y EMBRIONES BOVINOS	24
5.2. EMPLEO DE EMBRIONES COMO OPCIÓN TERAPÉUTICA EN EL SVR	25
6. DISCUSIÓN	35
6.1. EFECTO DE LA HIPERTERMIA MATERNA EN LOS OVOCITOS Y EMBRIONES BOVINOS	35

6.1.1. <i>Efecto de la hipertermia a nivel celular</i>	36
6.1.1.1. Efecto de la hipertermia en el núcleo del ovocito	36
6.1.1.2. Efecto de la hipertermia en el citoplasma y membranas del ovocito	39
6.1.1.3. Efecto de la hipertermia en el embrión.....	43
6.1.2. <i>Efecto de la hipertermia a nivel molecular</i>	44
6.1.2.1. Efecto de la hipertermia en el ovocito	44
6.1.2.1. Efecto de la hipertermia en el embrión.....	51
6.2. EMPLEO DE EMBRIONES COMO OPCIÓN TERAPÉUTICA EN EL SVR.....	60
7. CONCLUSIONES	66
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	67
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. RETROALIMENTACIÓN ENTRE EL HIPOTÁLAMO, HIPÓFISIS Y EL OVARIO.....	2
FIGURA 2. REPRESENTACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA CONDICIÓN CORPORAL Y LA CONCENTRACIÓN DE INSULINA, IGF-I Y LEPTINA EN LA TRANSICIÓN DEL ANESTRO A LA CICLICIDAD.....	3
FIGURA 3. LAS PRINCIPALES HORMONAS Y ESTRUCTURAS IMPLICADAS EN EL CICLO ESTRAL DE LA VACA.....	6
FIGURA 4. ESQUEMA DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE FOLÍCULOS OVÁRICOS DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA VACA	7
FIGURA 5. REPRESENTACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS ORGÁNULOS CITOPASMÁTICOS DURANTE LA MADURACIÓN OVOCITARIA DESDE EL ESTADÍO INMADURO (VESÍCULA GERMINAL) HASTA EL ESTADÍO MADURO (METAFASE II) (A), LA FERTILIZACIÓN (B) Y LA FORMACIÓN DEL ZIGOTO (C).	10
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO BOVINO DESDE LA FECUNDACIÓN HASTA EL DÍA 30.....	11
FIGURA 7. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS FACTORES QUE PUEDEN ESTAR INVOLUCRADOS EN EL DESENCADENAMIENTO DEL SVR.....	14
FIGURA 8. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA VARIACIÓN DE LA TEMPERATURA CORPORAL POR EL AUMENTO O LA DISMINUCIÓN DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL.....	15
FIGURA 9. DIAGRAMA QUE ILUSTRA EL PATRÓN DE RESISTENCIA/SENSIBILIDAD AL ET DEPENDIENDO DE LA ETAPA EN LA QUE SE ENCUENTRA EL CONJUNTO DE FOLÍCULOS OVÁRICOS Y LOS OVOCITOS QUE ESTÁN DENTRO DE LOS MISMOS	17
FIGURA 10. DIAGRAMA QUE ILUSTRA LOS EFECTOS DEL ET EN LAS ETAPAS INVOLUCRADAS EN LA FORMACIÓN DE BLASTOCITOS.....	18
FIGURA 11. DIAGRAMA DE FLUJO SEGUIDO EN LA BÚSQUEDA 1 PARA LA SELECCIÓN DE LOS ESTUDIOS.....	27
FIGURA 12. DIAGRAMA DE FLUJO SEGUIDO EN LA BÚSQUEDA 2 PARA LA SELECCIÓN DE LOS ESTUDIOS.....	28
FIGURA 13. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR EL ET A NIVEL CELULAR DURANTE LA MADURACIÓN OVOCITARIA SEGÚN LOS ESTUDIOS SELECCIONADOS PARA ESTA REVISIÓN SISTEMÁTICA.....	42

FIGURA 14. RESUMEN DE LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS EN LOS OVOCITOS POR LOS EFECTOS DEL ET A NIVEL MOLECULAR DURANTE SU MADURACIÓN SEGÚN LOS ESTUDIOS SELECCIONADOS PARA ESTA REVISIÓN SISTEMÁTICA	50
FIGURA 15. RESUMEN DE LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS EN LOS EMBRIONES POR LOS EFECTOS DEL ET A NIVEL MOLECULAR DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO SEGÚN LOS ESTUDIOS SELECCIONADOS PARA ESTA REVISIÓN SISTEMÁTICA	59

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN ESTABLECIDOS PARA CADA UNA DE LAS BÚSQUEDAS REALIZADAS.	22
TABLA 2. TABLA RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS INCLUIDOS PARA ALCANZAR LOS OBJETIVOS 1 Y 2 DEL PRESENTE TRABAJO DE FIN DE MÁSTER.....	29
TABLA 3. TABLA RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS INCLUIDOS PARA ALCANZAR EL OBJETIVO 3 DEL PRESENTE TRABAJO DE FIN DE MÁSTER.....	34

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ciclo estral de la vaca

La vaca (*Bos Taurus*) es poliéstrica continua, es decir, presenta periodos de estro o celo durante todo el año. Se denomina ciclo estral al conjunto de eventos fisiológicos que tienen lugar entre un celo y el siguiente, y su inicio se produce en el momento de la pubertad. En las novillas correctamente alimentadas, la pubertad se produce a los 9-15 meses de edad, generalmente con un peso de 200-250 kg, donde las razas lecheras suelen ser más precoces que las cárnicas (1,2). Después de que la hembra presente el primer celo, ésta tiene periodos de estro, aproximadamente, cada 18-24 días (21 días en promedio), salvo los meses que esté gestando y a lo largo del postparto inmediato (1,3).

1.1.1. Regulación endocrina del ciclo estral

La función ovárica (crecimiento del folículo, ovulación, luteinización y luteolisis) está regulada por las hormonas endocrinas del hipotálamo (hormona liberadora de gonadotropina; GnRH), la hipófisis anterior (hormona foliculoestimulante; FSH y hormona luteinizante; LH), los ovarios (progesterona; P₄, estradiol; E₂ e inhibina) y el útero (prostaglandina F₂α; PGF₂α) (4). Estas hormonas funcionan mediante un sistema de retroalimentación positiva y negativa para gobernar el ciclo estral del ganado (2).

Las neuronas del área ventromedial y del área preóptica del hipotálamo liberan la GnRH, que a través del sistema porta-hipotálamo-hipofisario llega a la hipófisis, estimulando la secreción de la LH y de la FSH (**Figura 1**) (5). La LH se libera de forma paralela a la liberación de la GnRH, es decir, un suceso de liberación de GnRH corresponde con un suceso de LH, por el contrario, la FSH tiene una secreción basal alta que es inhibida por el E₂ y la inhibina, por lo que su liberación no exhibe el patrón pulsátil que se observa en la liberación de la LH (6).

La GnRH se puede secretar de dos formas diferentes. La primera forma es la secreción pulsátil o tónica, la cual se encuentra regulada por estímulos externos como el fotoperiodo o el amamantamiento y por estímulos internos como metabolitos, hormonas metabólicas u hormonas sexuales. La segunda forma es la secreción preovulatoria o cíclica, la cual se encuentra estimulada por el E₂ durante el estro (5).

Cabe destacar que el E₂ puede provocar tanto una retroalimentación positiva, como una retroalimentación negativa sobre la secreción de la GnRH, dependiendo de la etapa del ciclo reproductivo en la que se encuentre la hembra (6). Concretamente, en animales prepúberes y en anestro posparto, el E₂ inhibe la secreción de GnRH, mientras que durante el proestro y el estro la estimula (**Figura 1**) (7).

Por otro lado, la P₄ disminuye tanto la secreción de la GnRH, como la respuesta de la hipófisis a la GnRH, inhibiendo así la maduración folicular y la ovulación (**Figura 1**) (8). Por este motivo, la P₄ es una hormona muy útil para el control artificial de la reproducción en los animales domésticos (7).

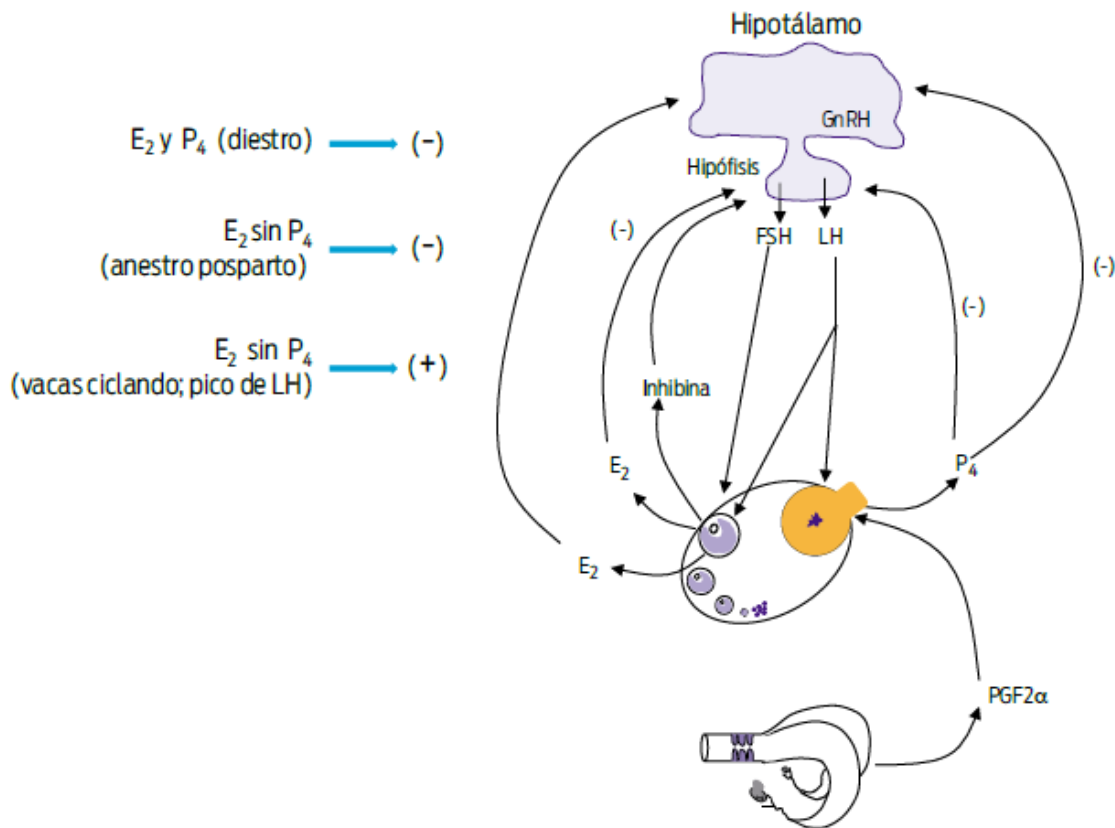


Figura 1. Retroalimentación entre el hipotálamo, hipófisis y el ovario. La GnRH estimula la síntesis y secreción de LH y FSH en la hipófisis. En la etapa prepuberal y en el anestro posparto el E₂ ejerce una retroalimentación negativa en la secreción de GnRH, mientras que en el proestro y estro, ejerce una retroalimentación positiva. La P₄ ejerce una retroalimentación negativa en la secreción de la GnRH. El E₂ y la inhibina suprimen la secreción de FSH directamente en la hipófisis. La PGF2α provoca la lisis del cuerpo lúteo. Fuente: Hernández, 2016 (7).

Sin embargo, las neuronas encargadas de secretar la GnRH no poseen receptores para el E₂ ni para la P₄, por lo que estas hormonas no tienen la capacidad de regular la liberación de la GnRH de forma directa. No obstante, existe una clase de neuronas en el hipotálamo que sí tienen receptores para el E₂ y para la P₄. En estas neuronas se expresa

el gen Kiss-1 que codifica el péptido Kisspeptina, para el que existen receptores en las neuronas secretoras de la GnRH; de esta forma, la Kisspeptina se encarga de proveer la información sobre la concentración de las hormonas sexuales a las neuronas secretoras de GnRH de forma indirecta (5).

Cabe destacar que para la correcta regulación endocrina del ciclo estral es de vital importancia que la hembra posea una correcta condición corporal, ya que los cambios en la misma tienen una correlación positiva en las concentraciones séricas de insulina, factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) y leptina (**Figura 2**). Cuando aumenta la puntuación de la condición corporal de la hembra, también incrementa la concentración sérica de estas hormonas, las cuales tienen la capacidad de modificar la frecuencia de liberación de la GnRH. Como ejemplo, cuando la hembra pasa de estar en anestro a ser cíclica, coincide con un aumento en la condición corporal y en las concentraciones de las hormonas mencionadas anteriormente (7).

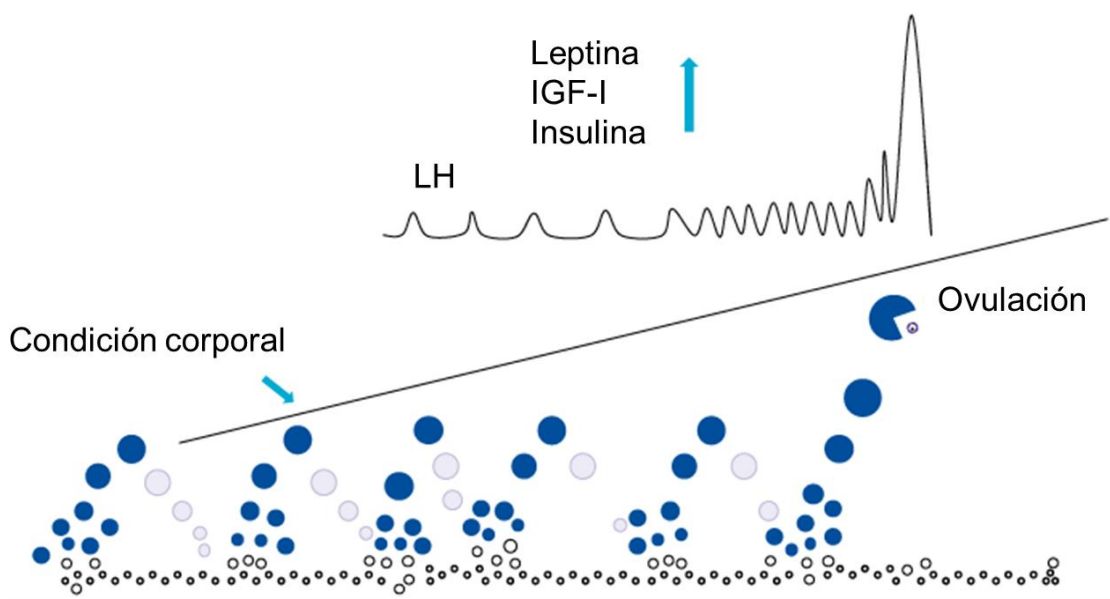


Figura 2. Representación de la influencia de la condición corporal y la concentración de insulina, IGF-I y leptina en la transición del anestro a la ciclicidad. Cuando aumenta la condición corporal de la hembra, aumenta la concentración de dichas hormonas, las cuales aumentan la frecuencia de secreción de la GnRH y con ella, de la LH. Fuente: Hernández, 2016 (7).

1.1.2. Etapas del ciclo estral

El ciclo estral en el ganado vacuno consta de una fase folicular (4-6 días) y una fase lútea (14-18 días) (2). La fase folicular es un periodo relativamente corto, aproximadamente el 20% del ciclo estral, que abarca desde el inicio de la regresión del cuerpo lúteo (CL) hasta la ovulación; esta fase incluye el proestro y el estro (9). Durante esta fase, se produce la maduración final y la ovulación del folículo ovulatorio, momento en el que el óvulo se libera en el oviducto permitiendo así su fecundación (2). Por otro lado, la fase lútea es el periodo más largo del ciclo estral, aproximadamente el 80% del ciclo, que abarca desde la ovulación hasta la regresión del CL; esta fase incluye el metaestro y el diestro (9).

A continuación, se detallan las características más relevantes de las 4 etapas que conforman el ciclo estral que, además, se encuentran representadas en la **Figura 3**.

- **Proestro:** es el periodo que precede al estro conductual y se inicia por la lisis del CL del ciclo estral anterior, por lo que se caracteriza por la ausencia de un CL funcional y bajos niveles de progesterona (10). Así mismo, en esta fase se produce un aumento de la frecuencia de pulsos de secreción de la LH, que provoca la maduración final del folículo preovulatorio y aumento del E₂ sérico, lo cual origina el estro; esta etapa dura 2-3 días (7).
- **Estro:** es el periodo en el que la hembra acepta la cópula o la monta de otra vaca (11). La continua liberación de E₂ por parte del folículo preovulatorio en desarrollo desencadena un pico en la secreción de la LH y FSH desde la hipófisis que, a su vez, estimula la máxima producción de E₂ por el folículo preovulatorio (7). Concretamente, estos altos niveles de E₂ son los que provocan el comportamiento y sintomatología propia del celo, como el aumento de contracciones del tracto reproductor de la hembra para facilitar la unión del óvulo y el espermatozoide y el aumento de la cantidad de moco en oviductos, útero, cérvix y vagina (10); esta etapa dura 8-18 horas (7).
- **Metaestro:** es la etapa posterior al estro, en la que se produce la ovulación y se desarrolla el CL. La ovulación ocurre 10-14 horas después de haber finalizado el estro (11). Este acontecimiento provoca una depresión en el lugar donde se encontraba el folículo preovulatorio. Posteriormente, esa depresión se sustituye

por el cuerpo hemorrágico, que consiste en un CL en proceso de formación, gracias a la acción de la LH (10). Así mismo, en esta etapa se produce un pico postovulatorio de la FSH, que desencadena la primera oleada de desarrollo folicular. Durante esta etapa, la concentración de la P₄ empieza a aumentar, hasta que alcanza niveles superiores a 1 ng/mL, valores propios de un CL maduro y criterio fisiológico que determina el final del metaestro y el comienzo del diestro; esta etapa dura 4-5 días (7).

- **Diestro:** es la etapa durante la cual el CL mantiene plena funcionalidad, con concentraciones séricas de progesterona superiores a 1 ng/mL. La P₄ es la hormona responsable de la preparación del útero para llevar a cabo la gestación y de inhibir el inicio un nuevo ciclo (10). En caso de no producirse la gestación, cuando el endometrio se encuentra 12-14 días expuesto a la progesterona, empieza a secretar PGF₂ α , la cual provoca la lisis del CL (progesterona < 1ng/mL) y marca el final del diestro y comienzo del proestro (7,9). Además, cabe mencionar que a lo largo de esta etapa, la LH se libera con una frecuencia muy baja, mientras que los niveles de la FSH sufren unos incrementos que son los responsables de las oleadas foliculares que se observan en el ciclo estral de la vaca, de las cuales se hablará a continuación; esta etapa dura 12-14 días (7).

Cabe destacar que la detección precisa del celo es esencial para una gestión reproductiva eficaz, especialmente cuando se practica la inseminación artificial (IA) convencional o monta natural (12). Esto se debe a que la vida media del óvulo, una vez liberado desde el folículo ovárico, es de alrededor de 10-12 horas. Así mismo, el espermatozoide es capaz de sobrevivir aproximadamente unas 24-48 horas a partir del momento en el que haya sido depositado dentro del aparato reproductor femenino. Además, el semen debe llegar al menos 6 horas antes al tracto reproductor de la hembra para que el espermatozoide pueda llevar a cabo su proceso de capacitación y ser apto para la fertilización (10).

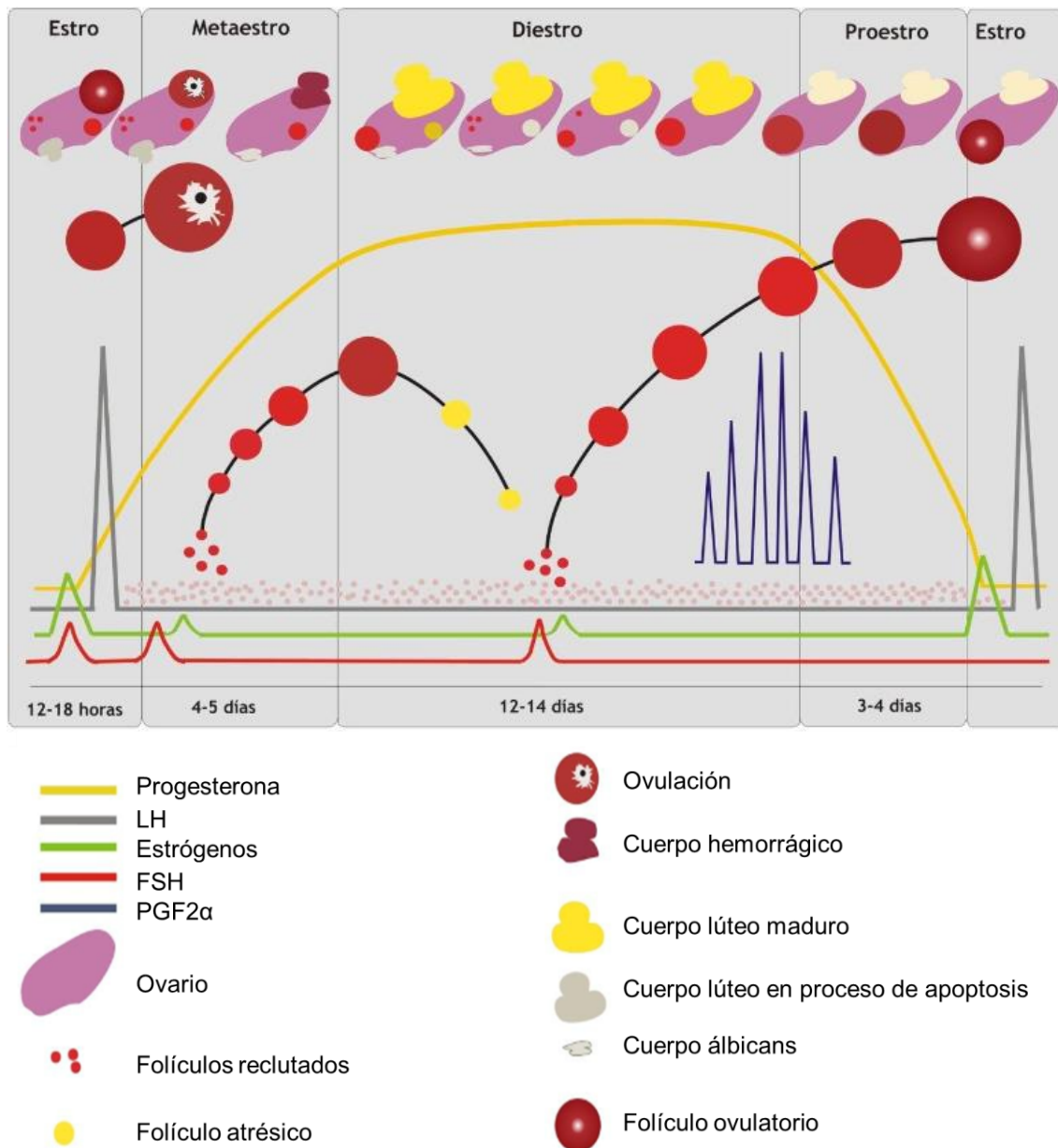


Figura 3. Las principales hormonas y estructuras implicadas en el ciclo estral de la vaca. Fuente: Zootecnia, Veterinaria, y Producción Animal, 2018.

1.1.3. Dinámica folicular bovina

Durante el desarrollo fetal se establece un número fijo de folículos en el ovario de la vaca, aproximadamente 235.000 folículos, donde muy pocos de éstos se activan y se desarrollan, ya que la mayoría de ellos se atresian en las distintas fases del desarrollo (7,13). El crecimiento de estos folículos ováricos dura entre 3 y 4 meses y se clasifica en etapas independientes y dependientes de las gonadotropinas (2).

Cuando la ternera nace, los folículos se denominan folículos primordiales, siendo esta la fase más elemental de los mismos. A continuación, estos folículos primordiales se activan y se transforman, primero, en folículos primarios y después, en folículos secundarios. Tanto los folículos primarios, como los folículos secundarios carecen de antro, por eso se denomina la etapa preantral del desarrollo folicular, siendo su desarrollo independiente a las gonadotropinas. Por el contrario, cuando estos folículos se transforman en folículos terciarios, comienza la etapa antral del desarrollo folicular, puesto que, en este estadio, los folículos poseen antro y su desarrollo es dependiente de las gonadotropinas (7).

El crecimiento folicular dependiente de las gonadotropinas se produce en oleadas en el ganado vacuno (2). Durante un ciclo estral, generalmente, ocurren 2 (vacas de leche) o 3 (novillas y vacas de carne) oleadas de crecimiento de los folículos ováricos. Cada oleada de crecimiento folicular consiste en el reclutamiento de un grupo de folículos, selección de un folículo dominante y atresia u ovulación del folículo dominante. Estas oleadas de crecimiento folicular se producen a lo largo de todo el ciclo y sólo el folículo dominante de la última oleada experimenta la maduración final y la ovulación (**Figura 4**) (14).

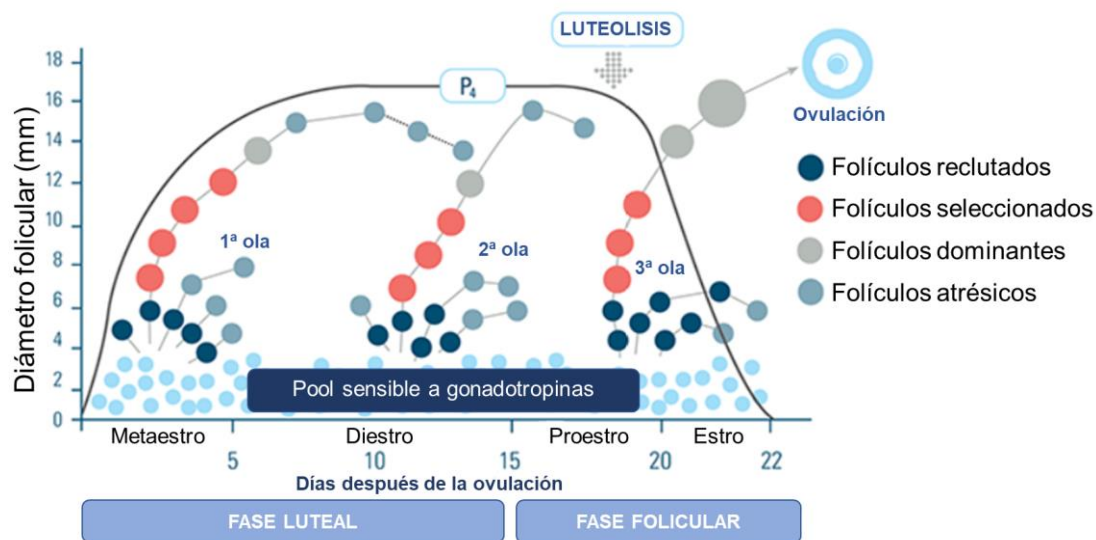


Figura 4. Esquema del crecimiento y desarrollo de folículos ováricos durante el ciclo estral de la vaca. Fuente: Imagen adaptada de ©2020 MSD Animal Health.

Cada oleada se inicia con un aumento en los niveles de FSH, lo cual desencadena el crecimiento de un grupo de 5-20 folículos (≥ 4 mm de diámetro); este proceso se denomina reclutamiento (2). A continuación, un único folículo continúa creciendo, que se conoce como el folículo dominante. Este folículo estimula la producción de estrógenos e inhibina, provocando a su vez, una disminución en los niveles de FSH, por la existencia de la retroalimentación negativa explicada anteriormente. En este momento, ocurre la atresia de los folículos no dominantes, ya que éstos dependen de la FSH para su desarrollo, mientras que el folículo dominante es capaz de seguir desarrollándose gracias a la acción de la LH (7).

El folículo dominante alcanza la madurez suficiente para ovular, sin embargo, si en 4-6 días no logra ovular, éste también sufre atresia. Seguida de la atresia del folículo dominante, disminuyen los niveles de estrógenos e inhibina y aumentan los niveles de FSH, iniciando una nueva oleada folicular (1,7). Este proceso se repite hasta que el CL del ciclo anterior se lise y disminuyan los niveles de progesterona. En este momento, cesa la retroalimentación negativa ejercida por la progesterona en la hipófisis, que unida a la retroalimentación positiva que ejerce el E_2 producido por el folículo dominante, desencadenan el pico preovulatorio de la LH, y con ello, la ovulación (3,15).

Por este motivo, por lo general, se producen 2 o 3 oleadas de crecimiento folicular antes de que se produzca la ovulación, ya que es el tiempo que se necesita para que desaparezca el CL del ciclo anterior y disminuyan las concentraciones de progesterona (14).

1.1.4. Acontecimientos durante la maduración ovocitaria

La maduración del ovocito coincide con la expresión del celo en la vaca y es importante para preparar el ovocito para la fertilización (16). La maduración es un largo proceso durante el cual los ovocitos adquieren la capacidad para sobrellevar las etapas posteriores del desarrollo, llegando finalmente a la activación del genoma embrionario (AGE) (17).

Este proceso implica eventos complejos y distintos, aunque vinculados, de maduración nuclear y citoplasmática (**Figura 5**). Por un lado, la maduración nuclear implica la reducción del número de copias de los cromosomas maternos de 4 a 2; es decir, se produce la rotura de la vesícula germinal (RVG), el ovocito se vuelve

transcripcionalmente quiescente y se reanuda la meiosis, lo que culmina con la extrusión del primer corpúsculo polar y la detención de la cromatina materna en la metafase de la segunda división meiótica (MII) (16). Por otro lado, la maduración citoplasmática implica la reorganización de los orgánulos y el almacenamiento de ARNm, proteínas y factores de transcripción que actúan en el proceso global de maduración, fecundación y embriogénesis temprana (17).

Según los análisis ultraestructurales llevados a cabo, se ha demostrado que las mitocondrias, los ribosomas, el retículo endoplásmico (RE), los gránulos corticales (GC) y el complejo de Golgi (CG) asumen diferentes posiciones durante la transición de la fase de vesícula germinal (VG; estadio inmaduro) a la fase de MII (estadio maduro). Los microfilamentos del citoesqueleto y los microtúbulos presentes en el citoplasma promueven estos movimientos y además, actúan en la segregación de los cromosomas, en la división celular durante la citocinesis y en el tráfico de moléculas dentro de la células (17).

Así mismo, la activación de determinadas vías metabólicas implicadas en la síntesis de proteínas y la fosforilación es indispensable para completar la maduración citoplasmática. En este contexto, las mitocondrias juegan un papel muy importante ya que son las responsables del suministro de energía que se consume durante el proceso de maduración. Estudios previos han demostrado que durante el periodo de maduración, las mitocondrias sintetizan el ATP necesario para la síntesis de proteínas que, a su vez, apoya la finalización de los procesos de maduración posteriores y el desarrollo embrionario (18).

Por otro lado, los GC son orgánulos que se encuentran exclusivamente en los ovocitos y están compuestos por proteínas, moléculas estructurales, enzimas y glicosaminoglicanos. La exocitosis de estos gránulos, proceso conocido como reacción cortical, es uno de los mecanismos más comunes utilizados por el óvulo para evitar la poliespermia (19). Por este motivo, mientras que en los ovocitos en fase VG, los GC se distribuyen en grupos por todo el citoplasma, al final del proceso de maduración, cuando los ovocitos alcanzan el estadio MII, los GC se distribuyen por toda la superficie interna de la membrana plasmática (20).

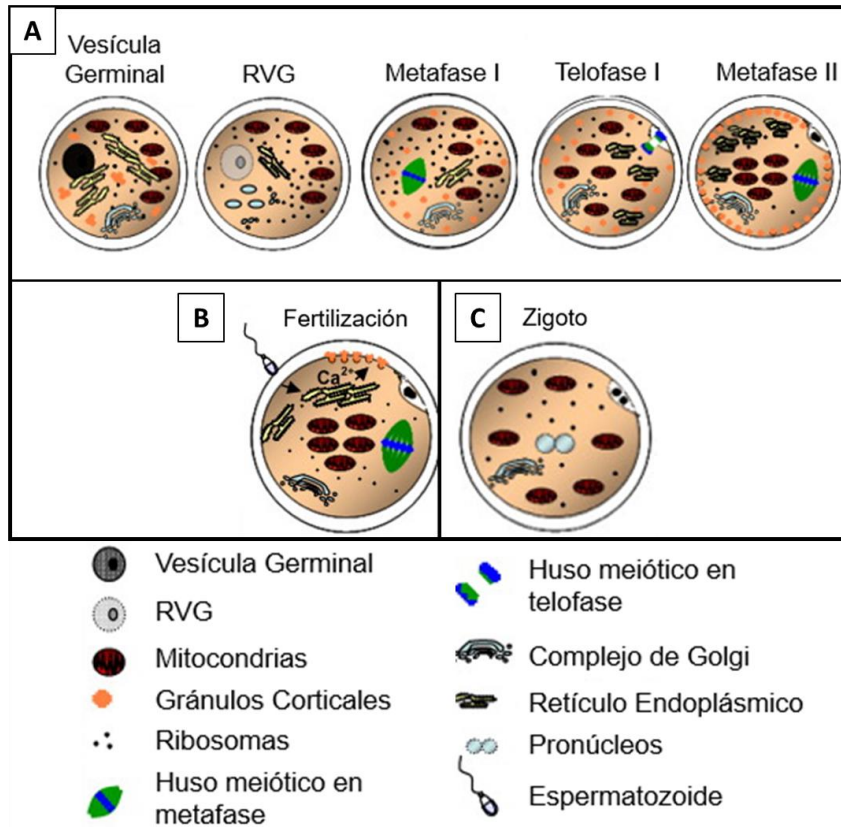


Figura 5. Representación de la distribución de los orgánulos citoplasmáticos durante la maduración ovocitaria desde el estadio inmaduro (vesícula germinal) hasta el estadio maduro (metafase II) (A), la fertilización (B) y la formación del cigoto (C). Fuente: Imagen adaptada de Ferreira y cols., 2009 (17).

Por último, la maduración molecular consiste en la transcripción, el almacenamiento y el procesamiento del ARNm materno, que se almacena en una forma estable e inactiva hasta su traducción a proteínas mediante los ribosomas. Durante esta etapa se transcriben principalmente reguladores del ciclo celular, proteínas, marcadores de maduración citoplasmática y componentes del sistema antioxidante enzimático (17). Las proteínas que derivan de estos ARNm están involucrados tanto en la maduración como en los posteriores eventos celulares como la fertilización, formación de pronúcleos y embriogénesis temprana (21), hasta el estadio de 8 células, momento en el que se activa el genoma embrionario en la especie bovina y se hace necesaria la síntesis de nuevas proteínas (18).

1.2. Desarrollo embrionario en la vaca

Tras la ovulación, la fecundación del ovocito ocurre en el oviducto, lugar donde pasa los primeros 3-4 días de vida el embrión resultante de la unión del gameto masculino y femenino. Durante este periodo, morfológicamente, el embrión sufre las primeras

divisiones celulares mitóticas y, transcripcionalmente, en el estadio de 8-16 células, se produce la AGE. Mientras tanto, el embrión se desplaza hacia el útero y entra en el mismo en la fase de 16 células, aproximadamente el día 4 tras la fecundación (22).

Una vez dentro del útero, las células que componen el embrión forman una bola, que se denomina estadio de mórula, en el que se forman las primeras uniones estrechas entre las células. El día 7, el embrión se compone por una masa celular interna que, una vez que sufra el proceso de diferenciación dará lugar al embrión/feto, y por el trofotodermo, que es la parte que conformará la placenta; en este momento, se considera que el embrión ha alcanzado el estadio de blastocisto (23). Está demostrado que hasta la fase de blastocisto, el embrión es en cierto modo autónomo y no necesita contacto con el entorno del aparato reproductor materno, puesto que éstos se pueden desarrollar con éxito y en grandes cantidades *in vitro*, mediante la tecnología de la fecundación *in vitro* (FIV) (24).

Tras la eclosión desde la zona pelúcida el día 9-10 tras la fecundación, el blastocisto esférico comienza a crecer y a cambiar su morfología (**Figura 6**) (25). La elongación del embrión implica transiciones desde un blastocisto esférico el día 7 post-fecundación, pasando por formas ovoides (días 12-13), tubulares (días 14-15) y finalmente filamentosas alrededor de los días 16-17 (24). El embrión ovoide tiene una longitud de unos 2 mm en el día 13 y alcanza una longitud de unos 60 mm en el día 16. El día 19, comienza la implantación del embrión completamente elongado con una firme aposición y adhesión del trofotodermo al epitelio luminal endometrial (26).

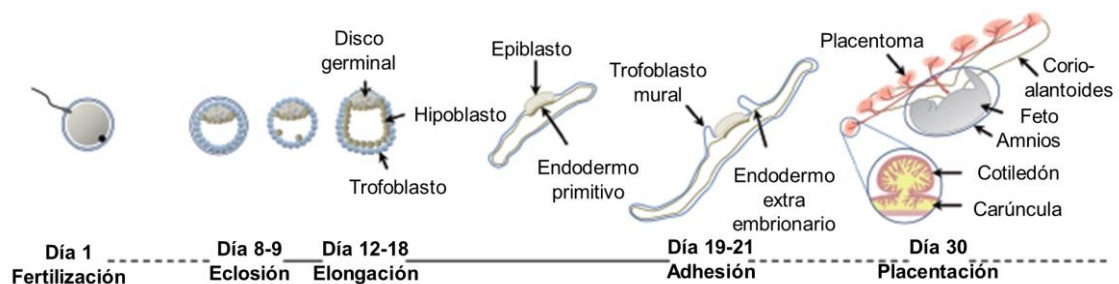


Figura 6. Representación esquemática del desarrollo embrionario bovino desde la fecundación hasta el día 30. Fuente: Imagen adaptada de Bai y cols., 2013 (25).

Cabe destacar la importancia de la P₄ en el desarrollo embrionario, puesto que se encarga de regular la función de las glándulas uterinas, cuyo deber es la secreción de distintas sustancias embriotróficas, que son necesarias para nutrir al embrión. Además, la P₄ también se encarga de regular la respuesta inmunitaria en el útero, con el fin de evitar que el embrión semi-alogénico sea rechazado y de inhibir las contracciones uterinas (27).

Sin embargo, entre los días 17 y 19 del ciclo estral, el endometrio produce PGF2 α , la cual provoca la luteolisis del CL, con la consiguiente bajada de los niveles de P₄. Por este motivo, el establecimiento de la gestación depende de la supresión por parte del embrión de la secreción de la PGF2 α desde el útero, lo cual se consigue mediante la secreción de interferón- τ (IFNT), factor de reconocimiento materno de la gestación en la especie bovina.

Concretamente en la vaca de aptitud lechera, una alta proporción de los embriones mueren previo reconocimiento materno de la gestación. Se ha visto, que una de las causas más importantes de la muerte embrionaria es el retraso del desarrollo del mismo, lo que provoca la incapacidad del embrión para producir una suficiente cantidad de IFNT, dando lugar a la secreción de PGF2 α por parte del endometrio, luteólisis del CL y la vuelta al estro de la vaca en un periodo igual a lo que dura un ciclo estral normal (7).

1.3. Síndrome de la vaca repetidora

1.3.1. Definición, incidencia y repercusiones

Las vacas repetidoras (VR) se definen como animales subfértiles que son completamente normales en el examen clínico, sin anomalías anatómicas y/o infecciosas, pero que no quedan gestantes después de ≥ 3 IAs a intervalos regulares de entre 18-24 días (28,29). La incidencia de las VRs se ha notificado que es del 9,0% en Reino Unido, del 24,0% en Estados Unidos, del 10,1% en Suecia, del 12,4% en Polonia y del 25,1% en España (30).

El Síndrome de la Vaca Repetidora (SVR) tiene una gran repercusión económica en las ganaderías bovinas, sobre todo, aquellas que son de aptitud lechera y que se encuentran gestionadas de forma intensiva (31). Las repercusiones económicas se deben al hecho de que este síndrome afecta a la eficiencia reproductiva del rebaño; se produce un aumento del número de días abiertos, aumento del número de pajuelas utilizadas para conseguir una gestación, disminución del número de hembras de reposición y de machos

para su comercialización y aumento del número de reemplazos por causas reproductivas (30,31).

Por otro lado, este síndrome también afecta a las ganancias económicas de la ganadería por la disminución de la eficiencia productiva, puesto que se produce un empeoramiento del índice de transformación de los alimentos en leche. Así mismo, se produce un incremento de la demanda de servicios veterinarios y de empleo de medicamentos (29).

1.3.2. Causas

Las causas del SVR son multifactoriales, pero el fracaso de la fecundación o la muerte embrionaria temprana parecen ser los dos principales mecanismos que conducen a este síndrome (**Figura 7**) (30).

Por un lado, la fecundación puede fallar debido a la mala calidad de los ovocitos o a problemas asociados a la IA, como por ejemplo, llevar a cabo la IA en un momento inadecuado. Así mismo, el fallo de la fecundación también puede producirse por anomalías cromosómicas, por estrés térmico (ET) o por problemas endocrinos causados por una elevada producción de leche o una nutrición desequilibrada (32,33). Además, hay un gran número de estudios que demuestran que los ovocitos de las VRs son de peor calidad que los de las vacas fértiles, sugiriendo que esta falta de calidad de los ovocitos podría ser la causa del fallo de fecundación o de la muerte embrionaria (34–37). Por otro lado, una detección inadecuada del celo, lo que lleva a un momento inadecuado de la IA o una técnica de IA incorrecta, también pueden provocar que la fecundación fracase (32,33).

Sin embargo, la mortalidad embrionaria parece ser la principal causa del SVR; la mortalidad embrionaria en los rumiantes es aproximadamente del 20-50% (38,39). Cabe destacar que en las vacas de aptitud lechera de alta producción, el mayor número de pérdidas embrionarias se produce en la primera semana después de la concepción (40,41).

Las causas de la muerte embrionaria temprana, desde la concepción hasta el día 7 de gestación, consisten en la mala calidad de los ovocitos que impiden el correcto desarrollo del embrión temprano, o la presencia de un entorno uterino inadecuado, ET y alteraciones endocrinas (33,42,43). El entorno uterino inadecuado se puede deber a un exceso de proteínas en la dieta de la hembra, ya que se aumenta el nivel de amoníaco en

la sangre y en el útero de la vaca (30). En cuanto al ET, éste produce efectos deletéreos sobre la maduración de los ovocitos y la competencia de desarrollo de los embriones preimplantacionales, por causa de la elevada temperatura corporal de la hembra (32,44). Por último, una baja concentración de progesterona, debido a su mayor metabolismo en las vacas de alto rendimiento, como es el caso de las vacas de aptitud lechera en sistemas intensivos, limita el desarrollo embrionario temprano (45,46).

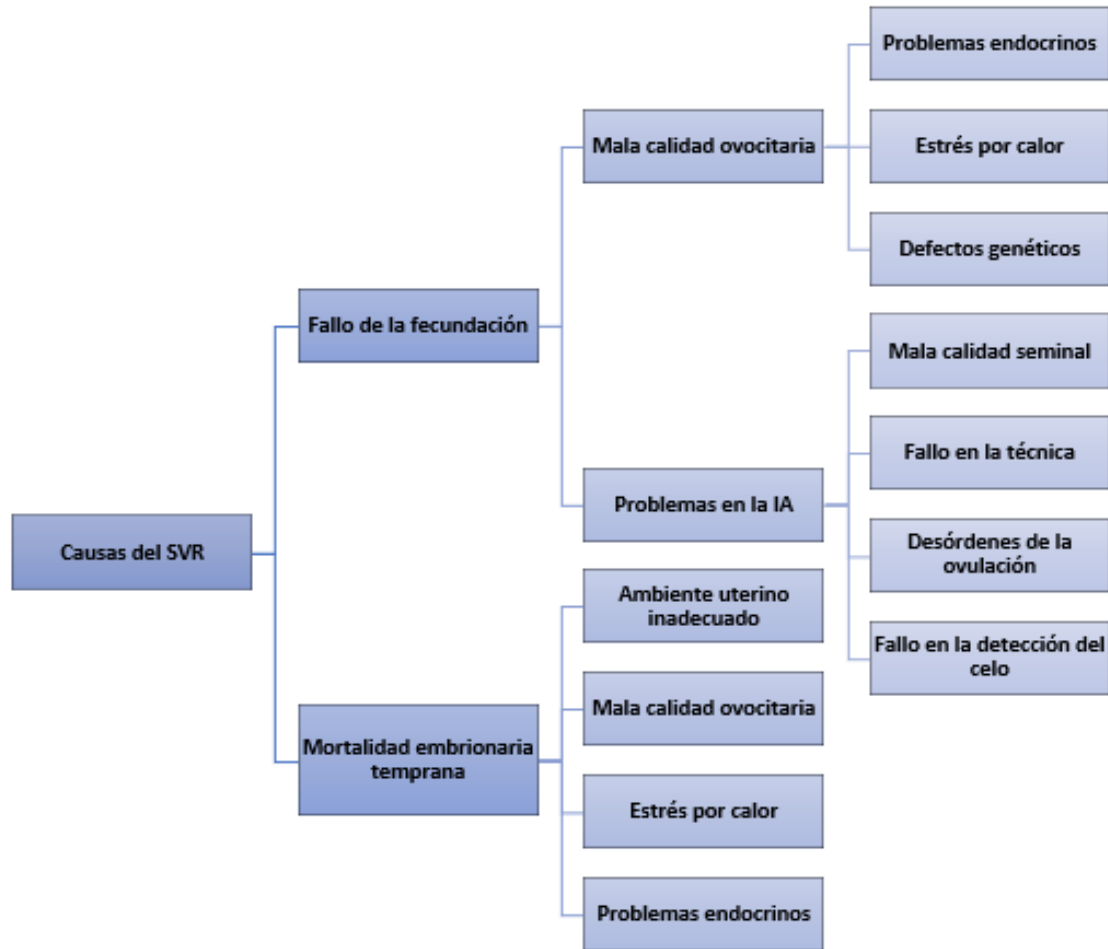


Figura 7. Representación esquemática de los factores que pueden estar involucrados en el desencadenamiento del SVR. Fuente: Imagen de elaboración propia.

No obstante, aunque hay una gran cantidad de factores que pueden estar detrás del SVR, varios estudios han sugerido que la calidad ovocitaria es uno de los factores que mayor impacto tiene tanto en el fracaso de la fecundación, como en la mortalidad embrionaria temprana (47). Así mismo, la hipertermia materna, causada por el ET, es uno de los principales factores que deterioran la calidad ovocitaria y embrionaria, y por tanto, uno de los principales responsables de la aparición del SVR (48).

1.3.3. Estrés térmico

1.3.3.1. Zona termoneutra y estrés térmico

La zona termoneutra (ZTN) es el rango de temperatura ambiental en el que la producción y pérdida de calor corporal está en equilibrio, por lo que no se necesitan mecanismos o comportamientos adicionales de calentamiento o enfriamiento (49). La ZTN está limitada por la temperatura crítica inferior (TCI) y la temperatura crítica superior (TCS) (**Figura 8**). La ZTN de las vacas se sitúa entre 16°C y 25°C y dentro de este rango, los animales mantienen una temperatura corporal fisiológica de 38,4°C-39,1°C (50). Cuando las temperaturas ambientales sobrepasan la TCS, que en las vacas de aptitud lechera se encuentra en 25-26°C (51), se produce el ET, que se define como el estado en el que se activan los mecanismos para mantener el equilibrio térmico corporal de un animal. El ET representa uno de los problemas más importantes a los que se enfrenta la industria del ganado vacuno lechero en los climas cálidos y húmedos (51,52).

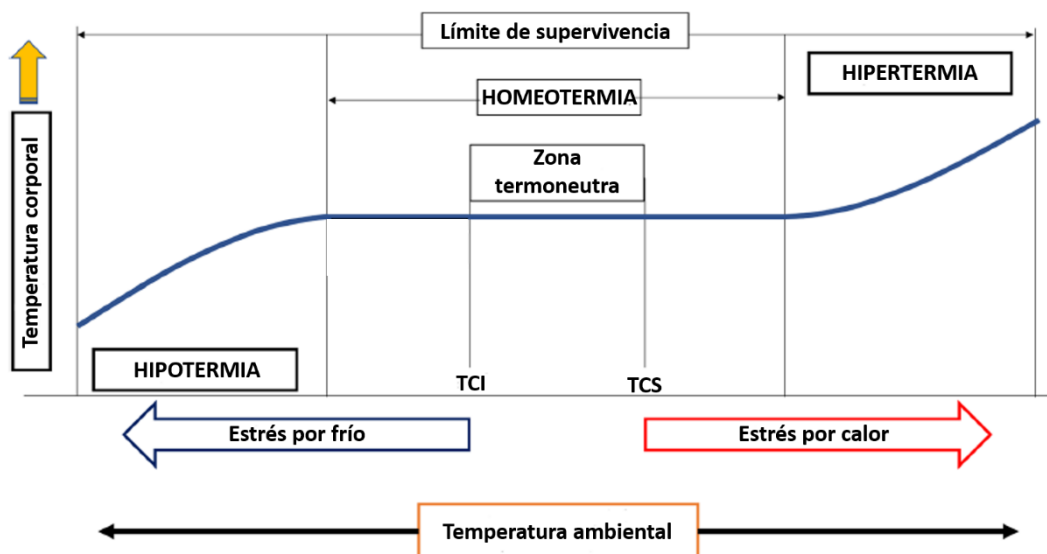


Figura 8. Representación gráfica de la variación de la temperatura corporal por el aumento o la disminución de la temperatura ambiental. Fuente: Imagen adaptada de Dash y cols., 2016 (51).

Los animales intentan restablecer el equilibrio térmico a través de mecanismos dirigidos a reducir la producción o ganancia de calor, por ejemplo, mediante la disminución de la ingesta de alimentos, metabolismo y actividad, y/o a aumentar la pérdida de calor, por ejemplo, mediante el aumento de la ingesta de agua, baño en estanques o barro, aumento de la sudoración, respiración y salivación o mediante la

redistribución del flujo sanguíneo hacia los tejidos periféricos, entre otros mecanismos (50). Además, la respuesta celular al ET implica el incremento de la producción de proteínas de choque térmico (HSP) como HSP70 y de antioxidantes para limitar el daño proteico (53).

Sin embargo, los ajustes fisiológicos frente al ET tienen consecuencias negativas tanto en la disponibilidad de energía, el equilibrio hídrico e iónico, como en la producción de leche y la fertilidad (54). Según el conocimiento actual, el ET y los cambios fisiológicos asociados tienen efectos negativos inmediatos y retardados en la reproducción, afectando especialmente, sobre: la secreción de gonadotropinas, la dinámica folicular, la ovulación, el desarrollo del CL, la esteroidogénesis, la competencia de desarrollo de los ovocitos, la supervivencia embrionaria, la función uteroplacentaria, la lactancia y el desarrollo postnatal (50).

1.3.3.2. Efecto del estrés térmico en la reproducción

La hipertermia materna, que se define como la elevación de la temperatura corporal materna, afecta negativamente a varios aspectos relacionados con la capacidad reproductiva, ya sea directamente por sus efectos sobre la calidad de los ovocitos, el éxito de la fecundación y el desarrollo del embrión, o indirectamente, por la limitación del suministro de nutrientes para apoyar la función reproductiva y por los efectos sobre la secreción y el nivel de las hormonas reproductivas (55).

Entre los componentes del aparato reproductor femenino, el conjunto de ovocitos del ovario es muy sensible a la hipertermia. Dado su largo proceso de desarrollo, aproximadamente 120-180 días, los folículos ováricos y los ovocitos que se encuentran dentro de los mismos, tienen una alta exposición al ET ambiental (**Figura 9**). Por este motivo, las alteraciones inducidas por las altas temperaturas en las primeras etapas del desarrollo folicular pueden expresarse posteriormente, comprometiendo a la maduración y competencia de desarrollo del ovocito (56,57).

Así mismo, se ha visto, que el ET interfiere con la expresión de los signos de celo y el diámetro folicular, lo que puede reducir las tasas de concepción y provocar pérdidas embrionarias. Al mismo tiempo, se ha observado, que las altas temperaturas provocan cambios en los patrones de desarrollo folicular ovárico y la expresión génica de los ovocitos, comprometiendo a su vez, la calidad de los mismos (49).

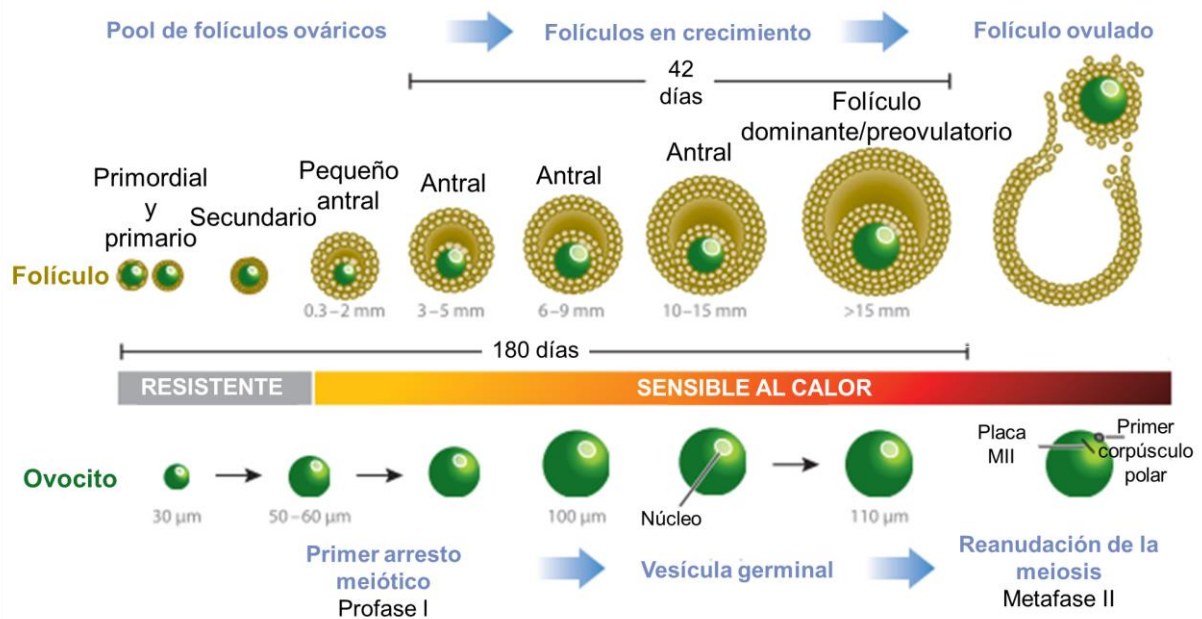


Figura 9. Diagrama que ilustra el patrón de resistencia/sensibilidad al ET dependiendo de la etapa en la que se encuentra el conjunto de folículos ováricos y los ovocitos que están dentro de los mismos. Los folículos primordiales, primarios y secundarios son resistentes al calor, mientras que los folículos antrales en desarrollo, incluidos los folículos dominantes y preovulatorios, son sensibles a las altas temperaturas ambientales, con un efecto prominente en el ovocito en fase de vesícula germinal (fase de desarrollo) y en el ovocito en fase de metafase II (maduro). Fuente: Imagen adaptada de Roth, 2017 (56).

Por otro lado, dado que el ET reduce la calidad de los ovocitos, una vez que se concluye la fertilización de los óvulos, también se obtienen embriones de baja calidad (58). Además, se ha demostrado que el efecto de las altas temperaturas ambientales es crítico durante las primeras divisiones mitóticas del embrión o estadio de escisión/clivaje embrionaria, periodo en el que la mayor parte del genoma embrionario se encuentra inactivo, mientras que el embrión bovino se hace más resistente al ET a medida que avanza en su desarrollo (58,59).

1.3.3.3. Opción terapéutica frente al estrés térmico: Transferencia embrionaria

La base para el uso de la transferencia embrionaria (TE) durante los meses en los que la hembra está sometida al ET, es que los principales efectos nocivos de la hipertermia sobre la fertilidad se producen en los ovocitos durante la foliculogénesis y en los embriones en fase de escisión/clivaje (**Figura 10**). Además, en el momento en el que los embriones son transferidos a la vaca, éstos se encuentran en estadio de mórula o blastocisto, los cuales son mucho más resistentes a las altas temperaturas (59,60).

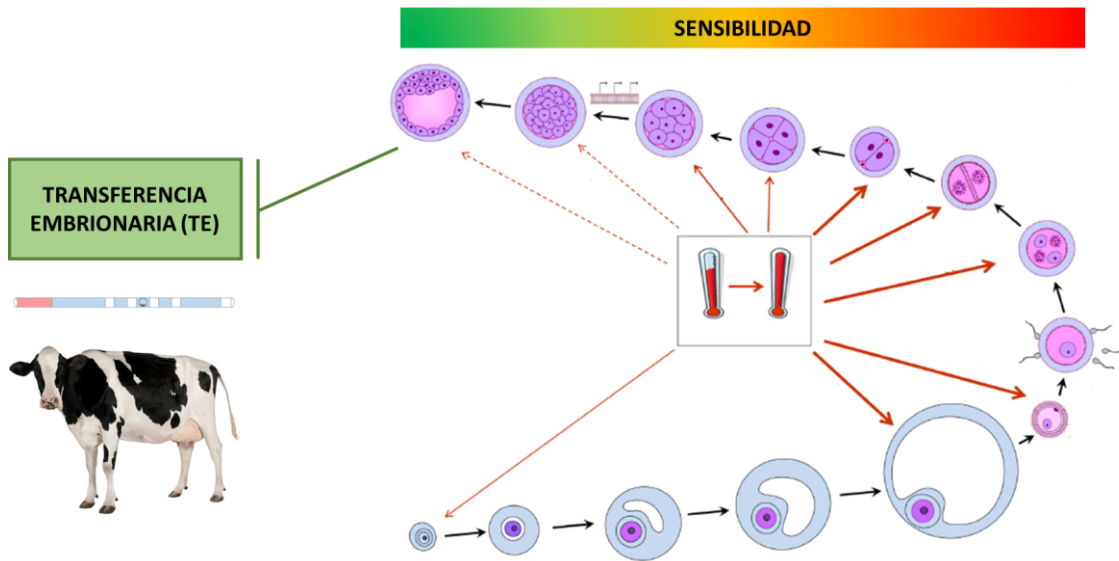


Figura 10. Diagrama que ilustra los efectos del ET en las etapas involucradas en la formación de blastocitos. Por un lado, el ET afecta a la competencia de los ovocitos para la fecundación y su desarrollo. Por otro lado, el embrión durante sus primeras divisiones mitóticas (fase de escisión/clivaje) sigue siendo susceptible a las altas temperaturas, mientras que la tolerancia térmica aumenta en la fase de mórula. Se puede ver cómo la adquisición de la termotolerancia coincide con la AGE. Por último, cuando un embrión se selecciona para la TE, normalmente en la fase de blastocisto, ya ha superado los daños que puede causar el ET en el ovocito durante la foliculogénesis o en el desarrollo embrionario temprano. El grosor de las flechas rojas indica el mayor (flecha más gruesa) o menor (flecha menos gruesa) efecto del ET sobre los ovocitos y embriones. El color rojo de la barra de sensibilidad indica una alta sensibilidad al ET, mientras que el color verde indica una baja sensibilidad. Fuente: Imagen adaptada de Hansen, 2013 (57).

2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

En las explotaciones intensivas de ganado vacuno de aptitud lechero, el SVR es uno de los principales problemas reproductivos, ya que afecta gravemente a la economía de los ganaderos productores de leche. Este síndrome tiene un mayor impacto en aquellas explotaciones lecheras de zonas tropicales y subtropicales, debido a los efectos adversos de las altas temperaturas ambientales sobre el aparato reproductivo bovino.

Según la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) de Estados Unidos, se prevé que la temperatura media mundial aumente entre 0,3°C y 4,8°C para el año 2100. Teniendo en cuenta el calentamiento global y la selección genética intensiva para la alta producción de leche, la cual disminuye la tolerancia de las vacas a las altas temperaturas, parece que la reducción de la fertilidad se convertirá en un factor limitante para la industria láctea en los próximos años.

Por este motivo, cobra gran importancia la realización de una revisión exhaustiva de los estudios realizados hasta la fecha sobre los efectos que el ET provoca tanto en los ovocitos, como en los embriones, con el fin de tener una visión general de los mecanismos y factores implicados en los mismos. De esta forma, se podría plantear la utilización de distintas moléculas en la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos o en el cultivo *in vitro* (CIV) de embriones para paliar los efectos negativos que provoca el ET en la foliculogénesis; o la utilización de técnicas como la TE para superar los efectos adversos que tiene la hipertermia en el desarrollo ovocitario y/o desarrollo embrionario temprano *in vivo*.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

La hipótesis en la que se basa esta revisión sistemática es la siguiente:

“La hipertermia materna provoca efectos deletéreos en los ovocitos y desarrollo embrionario bovino, desencadenando el SVR, el cual, se puede remediar con la técnica de la TE.”

3.2. OBJETIVOS

Considerando la hipótesis mencionada anteriormente, los objetivos del presente Trabajo de Fin de Máster son los siguientes:

- **Objetivo 1:** Identificar el efecto que la hipertermia materna produce en los ovocitos bovinos.
- **Objetivo 2:** Identificar el efecto que la hipertermia materna produce en los embriones bovinos.
- **Objetivo 3:** Analizar el potencial de la técnica de la TE como opción terapéutica en el SVR.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño de la revisión

El presente Trabajo de Fin de Máster se trata de una revisión sistemática de los estudios científicos publicados en las bases de datos Pubmed, Web Of Science y Scopus en el periodo comprendido entre el año 2000 y 2022. La fecha límite de la búsqueda fue el 30 de abril de 2022. Se decidió limitar la búsqueda a este periodo de tiempo debido al aumento de interés que se ha experimentado desde el comienzo del siglo XXI sobre los efectos que provoca la hipertermia materna en el rendimiento reproductivo de las explotaciones bovinas de alta producción.

4.2. Estrategia de búsqueda

Se realizaron 2 búsquedas distintas con el propósito de responder a los 3 objetivos planteados. Las palabras clave introducidas en las bases de datos anteriormente mencionadas para cada búsqueda son las siguientes:

- Búsqueda 1, “*Identificar el efecto que la hipertermia materna produce en los ovocitos bovinos*” e “*Identificar el efecto que la hipertermia materna produce en los embriones bovinos*”: (cow OR cattle OR bovine) AND ("heat stress" OR hyperthermia) AND (oocyte OR ovum OR egg OR embryo* OR zygote OR blastocyst).
- Búsqueda 2, “*Analizar el potencial de la técnica de la TE como opción terapéutica en el SVR*”: (cow OR cattle OR bovine) AND ("repeat breed*" OR "repeat breeding syndrome" OR hyperthermia OR "heat stress") AND "embryo transfer".

4.3. Selección de estudios: Criterios de inclusión y exclusión

En primer lugar, se volcaron todos los resultados obtenidos a partir de las 3 bases de datos en el gestor bibliográfico Mendeley y se procedió a eliminar los resultados duplicados o triplicados para cada una de las búsquedas realizadas. Posteriormente, se llevaron a cabo 2 cribados con el fin de seleccionar los estudios relevantes para el cumplimiento del presente trabajo, teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión previamente establecidos para cada una de las búsquedas, los cuales se recogen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión establecidos para cada una de las búsquedas realizadas.

	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
<p>BÚSQUEDA 1: (cow OR cattle OR bovine) AND ("heat stress" OR hyperthermia) AND (oocyte OR ovum OR egg OR embryo* OR zygote OR blastocyst)</p> <p style="text-align: center;">Objetivo 1 <i>"Identificar el efecto que la hipertermia materna produce en los ovocitos bovinos"</i></p> <p style="text-align: center;">Objetivo 2 <i>"Identificar el efecto que la hipertermia materna produce en los embriones bovinos"</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Estudios que analizan el efecto del ET a nivel celular/molecular en los ovocitos y/o embriones de la especie bovina, concretamente, de la subespecie <i>Bos taurus</i>, tanto <i>in vivo</i>, es decir, en vacas sometidas a altas temperaturas ambientales, como <i>in vitro</i>, cuando estas células son sometidas a altas temperaturas en el laboratorio. - Estudios que analizan el impacto del ET experimentado por los ovocitos en el desarrollo embrionario posterior a nivel celular/molecular. 	<ul style="list-style-type: none"> - Estudios referidos a cualquier otra especie diferente a la especie bovina. - Estudios referidos a la subespecie <i>Bos indicus</i>, o a la comparación de resultados entre <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i>. - Estudios que analizan otro tipo de estrés diferente al ET (malnutrición, estrés oxidativo, estrés metabólico, etc.). - Estudios que analizan el efecto del ET en otras células distintas a los ovocitos y embriones (por ejemplo, espermatozoides, células endometriales, etc.). - Estudios que analizan el efecto del ET a nivel de resultados clínicos, pero no a nivel celular/molecular. - Estudios que analizan factores relacionados con la resistencia de los ovocitos y/o embriones frente al ET. - Estudios que analizan el efecto del ET en ovocitos y/o embriones cultivados <i>in vitro</i>, pero que cuyo objetivo principal sea determinar el potencial de distintos factores añadidos al medio de cultivo para mitigar el daño producido.
<p>BÚSQUEDA 2: (cow OR cattle OR bovine) AND ("repeat breed*" OR "repeat breeding syndrome" OR hyperthermia OR "heat stress") AND "embryo transfer"</p> <p style="text-align: center;">Objetivo 3 <i>"Analizar el potencial de la técnica de la TE, como opción terapéutica en el SVR"</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Estudios que analizan el efecto de la técnica de la TE en los resultados reproductivos de vacas con el SVR. - Estudios que analizan el efecto de la técnica de la TE en los resultados reproductivos de vacas sometidas a ET. 	<ul style="list-style-type: none"> - Estudios referidos a cualquier otra especie diferente a la especie bovina. - Estudios que analizan el efecto de la técnica de la TE en los resultados reproductivos de vacas con infertilidad por causas conocidas, como infecciones, malnutrición, patologías anatómicas en el tracto reproductor, etc. - Estudios que analizan el efecto combinado de la IA y la TE en los resultados reproductivos de VRs.

IA: Inseminación Artificial; ET: Estrés Térmico; SVR: Síndrome de la Vaca Repetidora; TE: Transferencia Embrionaria; VR: Vaca Repetidora.

Así mismo, se excluyeron los artículos que estaban redactados en un idioma diferente al inglés y español, revisiones y/o meta-análisis, libros completos o capítulos de los mismos y estudios presentados a congresos de los cuales solo se encuentra el resumen publicado.

El primer cribado se basó en la revisión de títulos y resúmenes. A partir de los artículos seleccionados, se realizó un segundo cribado mediante la lectura completa de los artículos. Los estudios seleccionados para este trabajo fueron aquellos que pasaron ambos cribados.

4.4. Extracción de la información

Una vez completados los dos cribados anteriormente mencionados, se extrajo en un *excel* la información más relevante de los estudios seleccionados para cumplir con los 3 objetivos planteados. La información que se tuvo en cuenta para cada búsqueda es la siguiente:

- Búsqueda 1: Autor, año, tipo de estudio, células estudiadas, objetivos del estudio, condiciones y etapas sometidas al ET y resultados del estudio.
- Búsqueda 2: Autor, año, objetivos del estudio, número de vacas empleadas en el estudio y resultados del estudio.

5. RESULTADOS

5.1. Efecto de la hipertermia materna en los ovocitos y embriones bovinos

El primer y segundo objetivo del presente trabajo fue mostrar el efecto que la hipertermia materna produce en los ovocitos y en los embriones bovinos, respectivamente. Para alcanzar esos dos objetivos, se realizó una primera búsqueda en las bases de datos y con las palabras clave previamente mencionadas (**Apartado 4.2**). A partir de esta búsqueda y una vez eliminados los artículos duplicados o triplicados (n= 394), se obtuvieron 543 artículos. Después de realizar el primer cribado, basado en la revisión del título y el resumen teniendo en cuenta los criterios de exclusión previamente establecidos, se aceptaron 63 artículos, mientras que los 480 restantes fueron descartados. Finalmente, una vez realizado el segundo cribado, basado en la revisión del texto completo, se seleccionaron para el presente trabajo 25 artículos, mientras que los 38 restantes fueron descartados (**Figura 10**).

En cuanto a las características de los estudios seleccionados (**Tabla 2**), cabe destacar que, aunque la búsqueda se centrara en los últimos 22 años (2000-2022), casi la mitad de ellos (44%) se han publicado en los últimos 5 años (2017-2022), indicando el creciente interés sobre este tema en los últimos años. En referencia al tipo de estudio, 17 son estudios *in vitro*, mientras que 5 son *in vivo* y 3 la combinación de ambos. Siguiendo en esta línea, en los estudios *in vitro*, en la mayoría de ellas (n = 15), el ET se aplica en la fase de MIV, mientras que los estudios centrados en observar el efecto del ET en la fase de FIV (n= 1), CIV (n= 2) o en varias fases (n= 2) es muy inferior. Por otro lado, 9 de ellos estudian el efecto de la hipertermia materna a nivel celular, mientras que 15 estudian dicho efecto a nivel molecular y 1 a ambos niveles. Así mismo, 14 de ellos estudian el efecto del ET en los ovocitos, 8 en los embriones y 3 tanto en ovocitos, como en embriones.

A modo de resumen, los estudios seleccionados se concentran en los últimos 5 años y la mayoría de ellos son estudios *in vitro*, en los que, mayoritariamente, los efectos de la hipertermia son estudiados en la fase de la MIV de ovocitos, lo cual puede señalar a esta fase, como una de las fases más susceptibles a los efectos del ET en la producción embrionaria. Además, destacan los estudios a nivel molecular frente a los estudios a nivel celular, y los estudios en ovocitos, frente a los estudios en embriones.

En cuanto a los resultados obtenidos a partir de los estudios seleccionados (**Tabla 2**), a nivel celular, 4 de ellos muestran que el ET provoca cambios en distintas estructuras celulares tanto de ovocitos, como de embriones tempranos (61–64). 1 estudio determina que el ET altera la composición de ácidos grasos de los ovocitos (65), mientras que otro estudio señala que dicho estrés no provoca cambios en el contenido de triglicéridos y fosfolípidos del ovocito (66). Así mismo, 2 estudios determinan que el ET altera la maduración meiótica de los ovocitos (67,68), por el contrario, hay 1 estudio que muestra que el ET no provoca diferencias en dicho proceso (16).

A nivel molecular, 13 estudios observan que el ET provoca diferencias en la expresión génica y/o proteica de genes y proteínas que son fundamentales para el correcto desarrollo de ovocitos y/o embriones (69–81), mientras que son 6 los estudios que demuestran la diferencia de expresión de genes asociados al ET (71,72,77,78,80,82). Así mismo, hay un único estudio que se centra en los posibles cambios epigenéticos que puede causar el ET en ovocitos, sin embargo, no encontraron ningún efecto al respecto (76). Por otro lado, 2 estudios muestran que el ET aumenta la incidencia de apoptosis en los ovocitos (74,83), y uno de ellos señala que dicho proceso se produce por vías dependientes de los dominios Bax y BH4 (83). Por último, son 4 los estudios que investigan el efecto del ET en el desencadenamiento del estrés oxidativo y todos ellos observaron que el ET provoca un aumento de este tipo de estrés (77,79,80,84). Sin embargo, uno de ellos señala que, aunque las ROS mitocondriales aumentan, las ROS citoplasmáticas disminuyen, insinuando que el ET podría tener un efecto local en las mitocondrias (79).

5.2. Empleo de embriones como opción terapéutica en el SVR

El tercer objetivo del presente trabajo fue analizar el potencial de la técnica de la TE como opción terapéutica en el SVR. Para alcanzar este objetivo, se realizó una segunda búsqueda en las bases de datos y con las palabras clave previamente mencionadas (**Apartado 4.2**). A partir de esta búsqueda y una vez eliminados los artículos duplicados o triplicados (n= 87), se obtuvieron 149 artículos. Después de realizar el primer cribado, basado en la revisión del título y el resumen teniendo en cuenta los criterios de exclusión previamente establecidos, se aceptaron 13 artículos, mientras que los 136 restantes fueron descartados. Finalmente, una vez realizado el segundo cribado, basado en la revisión del

texto completo, se seleccionaron para el presente trabajo 4 artículos, mientras que los 9 restantes fueron descartados (**Figura 11**).

En cuanto a las características generales de los estudios seleccionados (**Tabla 3**), 3 de ellos determinan la tasa de éxito de la técnica de la TE una única vez a lo largo de la gestación de la vaca, que difiere entre los estudios, día 35 (85), 45 (86) o 60 (87) mientras que uno de ellos evalúa el potencial de la técnica en 2 momentos diferentes de la gestación, día 40 y 97 e incluso en el momento del nacimiento de los terneros (88).

En referencia a las características concretas de cada estudio (**Tabla 3**), uno de ellos compara la técnica de la TE en VRs y vacas control, donde observaron que la realización de la técnica de la TE no logra alcanzar el mismo éxito en VRs que en vacas control (85). Sin embargo, otro estudio compara la tasa de preñez que se obtiene con la técnica de la TE y la IA, y vieron que la TE mejora significativamente la tasa de preñez en comparación con la IA (87). Por último, los otros 2 estudios se enfocaron en determinar el potencial de la técnica de la TE, tanto con embriones frescos, como con embriones vitrificados, en vacas sometidas al ET en comparación con la IA. En ambos estudios observaron que la técnica de la TE mejora la tasa de preñez, sobre todo, cuando estos embriones son frescos (86,88).

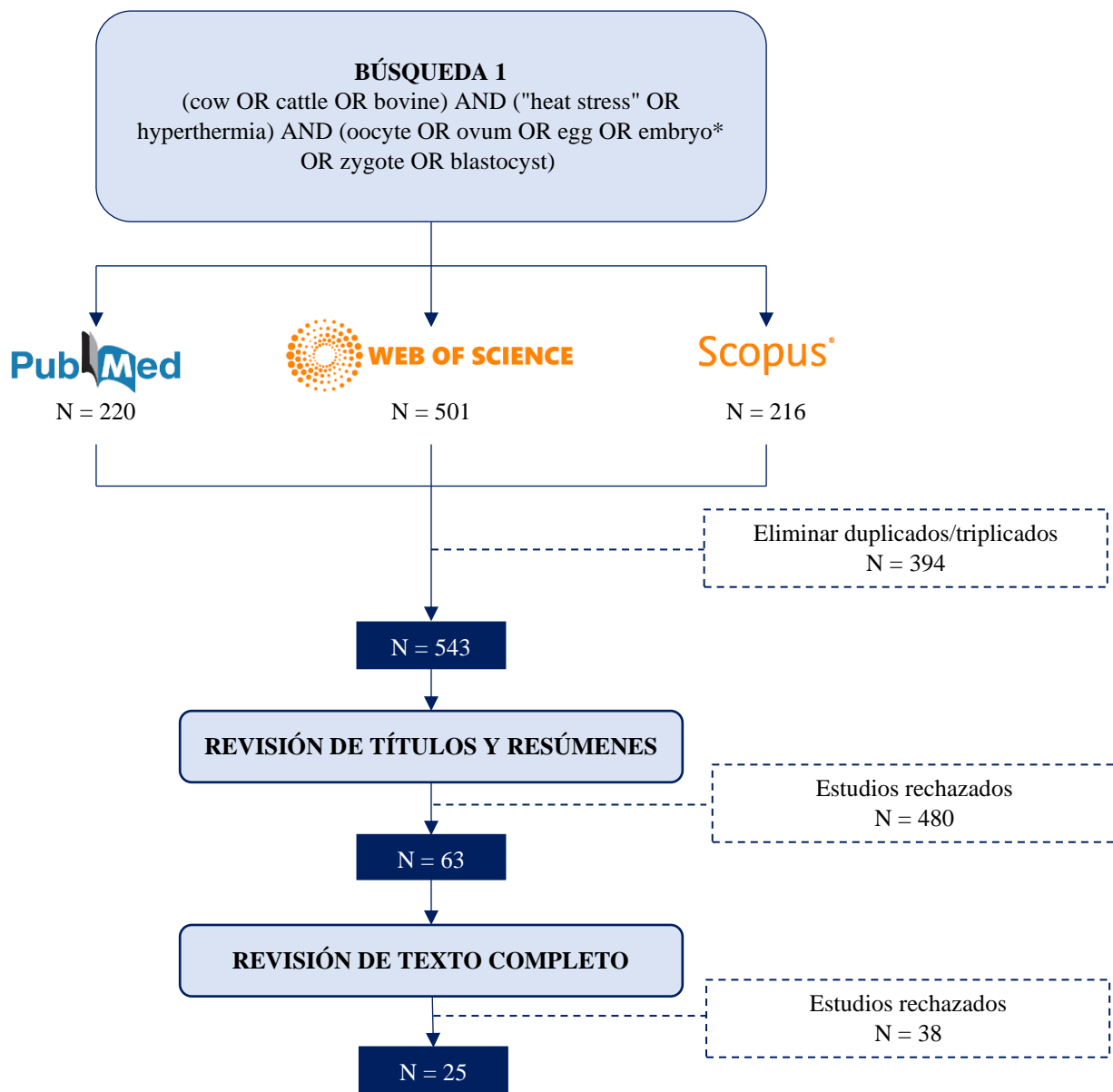


Figura 11. Diagrama de flujo seguido en la búsqueda 1 para la selección de los estudios.

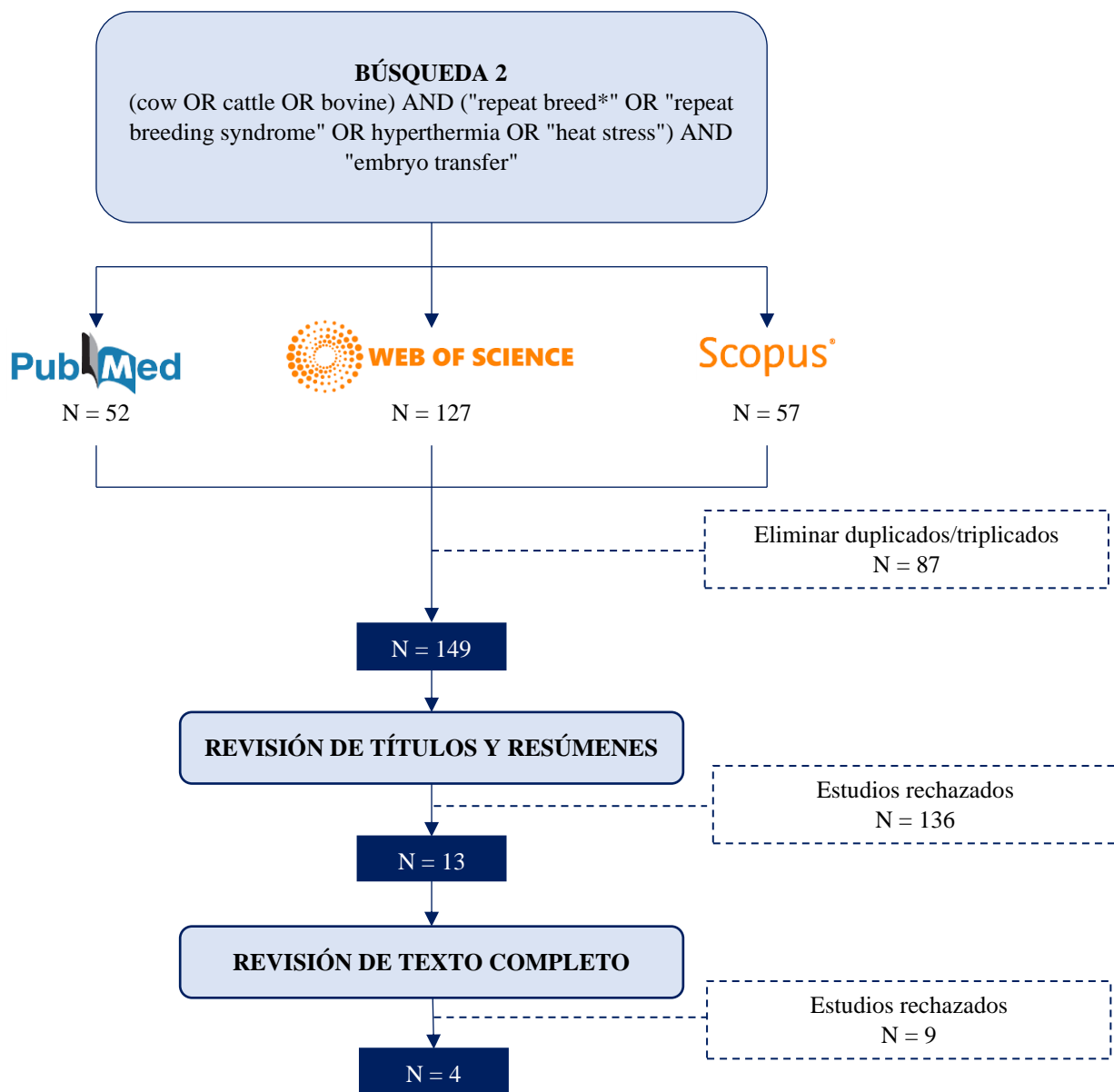


Figura 12. Diagrama de flujo seguido en la búsqueda 2 para la selección de los estudios.

Tabla 2. Tabla resumen de las características de los estudios incluidos para alcanzar los objetivos 1 y 2 del presente Trabajo de Fin de Máster.

Tipo estudio	Estudio	Célula estudio	Objetivos	Etapas y Condiciones ET	Resultados
Celular	Ahmed y cols. 2017 (61)	Ovocito	Registrar los cambios ultraestructurales que produce el ET en los ovocitos.	<u>MIV</u> Control: 38.5°C/24h ET: 41°C/12h y 38.5°C/12h	El ET provocó en los ovocitos una reducción de la tasa y menor expansión de las células del cúmulo, reducción de la migración de los GC, hinchamiento de las mitocondrias con cristolisis, alteración de los ribosomas y abundancia de ribosomas libres.
Celular	Báez y cols. 2022 (64)	Ovocito	Determinar el efecto del ET sobre el grado de compactación de la cromatina de los ovocitos.	<u>In vivo</u> Control: 13.5 ± 2.3°C ET: 23.8 ± 3.4°C	El ET provocó una disminución del porcentaje de ovocitos en estadio de VG3 (cromatina totalmente compacta) (p < 0,05).
Celular	Edwards, y cols. 2005 (16)	Ovocito	Evaluar el efecto del ET en la maduración nuclear y citoplasmática de ovocitos.	<u>MIV</u> Control: 38,5°C/24h ET: 41,0°C/12h y 38,5°C/12h	El ET no provocó diferencias en el porcentaje de ovocitos que progresaron al estadio MII (maduración nuclear) (p > 0.9). Sin embargo, el ET provocó una aceleración de la maduración nuclear (p < 0.01). Así mismo, el ET provocó un aumento de porcentaje de ovocitos con una distribución de GC de tipo III (maduración citoplasmática) (p < 0.01).
Celular	Ju y cols. 2005 (63)	Ovocito	Investigar el efecto del ET en las estructuras citoesqueléticas de los ovocitos.	<u>MIV</u> Control: 38.5°C/24h ET: 38.5°C/20h, 42°C/1-2-4h y 38.5°C/3-2-0h, respectivamente.	El ET hizo que el huso metafásico se volviese alargado, aberrante y más pequeño (p < 0.05).
Celular	Pavani y cols. 2015 (67)	Ovocito	Evaluar el efecto del ET en la tasa de maduración nuclear de los ovocitos.	<u>MIV</u> Control: 38.5°C/24h ET1: 39.5°C/24h ET2: 40.5°C/24h <u>In vivo</u> Control: 6±1.2°C-18.5±1.1°C ET: 12.5±1.1°C-25±1.0°C	El ET <i>in vivo</i> provocó una disminución en la maduración meiótica de los ovocitos (p < 0,001). Además, el ET <i>in vitro</i> también provocó una disminución en la maduración meiótica de los ovocitos (p < 0,05)
Celular	Rivera y cols. 2003 (62)	Embrión	Caracterizar los cambios ultraestructurales que el ET produce en los embriones tempranos.	<u>CIV</u> Control: 38.5°C/6h ET1: 41°C/6h ET2: 43°C/6h	Ambas condiciones de ET provocaron el desplazamiento de los orgánulos hacia el centro de la blastómera (p < 0.01). Además, aumentaron el porcentaje de mitocondrias que presentaban una morfología hinchada. Así mismo, en el caso de ET2, éste provocó el incremento de la distancia entre las membranas que componen la envoltura nuclear (p < 0.001).

Celular	Roth y cols. 2005 (68)	Ovocito	Determinar si el ET afecta a la progresión meiótica, a la organización del huso meiótico y a la fragmentación del ADN del ovocito.	<u>MIV</u> Control: 38.5°C/22h ET1: 40/12h y 38.5°C/10h ET2: 41°C/12h y 38.5°C/10h	El ET provocó un aumento del porcentaje de ovocitos con bloqueo de la progresión meiótica en el estadio de MI, AI o TI ($p < 0.001$). Así mismo, los ovocitos bloqueados en MI, presentaban husos deformados con microtúbulos desorganizados y cromosomas desalineados. Además, el ET aumentó la fragmentación de ADN en los ovocitos ($p < 0.001$).
Celular	Zeron y cols. 2001 (65)	Ovocito	Determinar el efecto del ET en la composición de AG de los ovocitos.	<u>In vivo</u> Control: THI=22 ET: THI= 39	En los ovocitos sometidos a ET se encontró un mayor porcentaje de AGS ($p < 0.05$). En cambio, el porcentaje de AGPI fue menor ($p < 0.05$).
Celular y Molecular	Almeida y cols. 2019 (82)	Embrión	Evaluar el efecto de someter a los ovocitos al ET en la organización y remodelación de la cromatina y la expresión génica del embrión temprano.	<u>MIV</u> Control: 38.5°C/24h ET: 41.5°C/12h y 38.5°C/12h	Los embriones tempranos resultantes de ovocitos sometidos al ET, presentaron compactación anormal de la cromatina. Además, se observó una acumulación de H3K9me3 y HP1 en los núcleos de embriones de 4 células y una presencia anormal de H3K9me3 en embriones de 8 células derivados de ovocitos sometidos a ET ($p < 0.01$). Por otro lado, hallaron menores niveles relativos del transcrito HSP40 en el grupo ET ($p < 0.05$).
Celular y Molecular	Hooper y cols. 2015 (66)	Ovocito	Evaluar si el ET provoca cambios en el contenido de triglicéridos y fosfolípidos del ovocito y determinar si esos cambios lipolíticos están involucrados en el momento en el que se produce la RVG.	<u>MIV</u> Control: 38.5°C/24h ET: 41°C/12h y 38.5°C/12h	El ET no provocó cambios en el contenido de triglicéridos y fosfolípidos. Sin embargo, la RVG se produjo antes en los ovocitos sometidos a ET ($p < 0.0001$). Además, el contenido de ATP fue mayor en ovocitos sometidos a ET que en ovocitos control ($p = 0.0082$).
Molecular	Amaral y cols. 2020 (77)	Embrión	Evaluar el efecto del ET antes de la AGE en la expresión génica y proteica de IFNT, la producción de ROS, la expresión génica de enzimas antioxidantes, genes relacionados con la supervivencia celular y genes relacionados con el estrés celular.	<u>MIV, FIV, CIV y MIV+FIV+CIV</u> Control: 38.5°C/6h HS: 40.5°C/6h La temperatura se elevó y se redujo gradualmente 0.0017°C/min de 38,5°C a 40,5°C.	Todos los embriones, independientemente a la fase de la producción embrionaria en la que fueron sometidos al ET, mostraron una disminución de la expresión génica y proteica de IFNT ($p < 0.05$). Por el contrario, estos embriones mostraron un aumento de producción de ROS ($p < 0.05$), siendo los embriones que sufrieron el ET en todas las etapas (MIV+FIV+CIV), los que más ROS produjeron. Sin embargo, la expresión génica de enzimas antioxidantes, como SOD1, GPX4 y NRF2 no se vio afectada por el ET ($p > 0.05$), mientras que la expresión de SOD2 y CAT disminuyó en todos los grupos ($p < 0.05$) y la expresión de GPX1 aumentó en todos los grupos sometidos a ET ($p < 0.05$), excepto la MIV. Por otro lado, la expresión de genes relacionados con la supervivencia celular (AKT y XIAP) no se vio afectada por el ET ($p > 0.05$). En cuanto a la expresión de genes relacionados con el estrés celular, el HSP90AA1 no se vio afectado por el ET ($p > 0.05$), mientras que el HSPA1A estaba aumentado en todos los grupos de embriones sometidos al ET ($p < 0.05$).

Molecular	Diaz y cols. 2021 (76)	Ovocito	Investigar el efecto del ET sobre los perfiles transcriptómicos de los ovocitos.	<u>In vivo</u> Control: 9,4-25°C ET: 21-28,3°C	Un total de 211 y 92 genes se expresaron de forma diferencial como resultado del ET en los ovocitos VG y MII, respectivamente. El ET influyó en una serie de vías, como la biosíntesis de glucocorticoides, la señalización de la apoptosis y la señalización de HIPPO en los ovocitos GV, y la pluripotencia de Oct-4, la señalización de Wnt/beta-catenina y la degradación de la melatonina I en los ovocitos MII.
Molecular	Ferreira y cols. 2013 (72)	Ovocito	Investigar el efecto del ET en la expresión de genes diana relacionados con la replicación/transcripción del ADNmt (PPARGC1A, TFAM y MT-CO1), la apoptosis (BAX y BCL2) y el ET (HSP90AA1 y HSPA1AB) en los ovocitos.	<u>In vivo</u> Control: invierno ET: verano	El ET provocó la reducción de la expresión de PPARGC1A, TFAM, MT-CO1, BAX, BCL2, HSP90AA1 y HSPA1AB en los ovocitos ($p < 0.05$).
Molecular	Gendelman y cols. 2012 (69)	Ovocito y embrión	Examinar el efecto del ET en la expresión génica (MOS, GDF9 y POU5F1) de los ovocitos en estadio de VG y MII y en embriones.	<u>In vivo</u> Control: 16°C ET: 33°C y THI= 78	El ET no interfirió en los niveles de expresión de los genes MOS, GDF9 y POU5F1 de los ovocitos en estadio de VG ($p > 0.05$). Sin embargo, tras la maduración, estos niveles fueron mayores en los ovocitos recogidos bajo condiciones de ET ($p < 0.05$). Así mismo, en embriones de 4 células, el ET provocó el aumento de GDF9 y disminución de POU5F1 ($p < 0.05$). Además, tanto en los embriones de 8 células como en los blastocistos, la expresión de POU5F1 fue menor cuando los ovocitos fueron recogidos bajo condiciones de ET ($p < 0.05$).
Molecular	Pavani y cols. 2016 (71)	Embrión	Comprobar el impacto del ET en la expresión génica de distintos genes (Cx43, CDH1, DNMT1 y HSPA14) en los ovocitos y embriones resultantes.	<u>MIV</u> Control: 38.5°C/24h ET1: 39.5°C/6-12-18-24h y 38.5°C/18-12-6-0h, respectivamente. ET2: 40.5°C/6-12-18-24h y 38.5°C/18-12-6-0h, respectivamente. <u>In vivo</u> Control: 6-12°C ET: 23-25°C	El ET <i>in vitro</i> provocó el aumento de DNMT1 (excepto en el estadio de mórula), mientras que disminuyó la expresión de HSPA14 y CDH1 (excepto en el estadio de blastocisto, en el que aumentó). Además, la expresión de Cx43 difirió dependiendo del estadio embrionario y la magnitud del ET ($p < 0.05$). Por otro lado, el ET <i>in vivo</i> provocó la disminución de la expresión de DNMT1, Cx43 y HSPA14 en los embriones ($p < 0.05$).

Molecular	Pavani y cols. 2017 (73)	Ovocito	Investigar la influencia del ET en la regulación génica (Cx43, CDH1, DNMT1 y HSPA14) de los ovocitos.	<u>MIV</u> Control: 38.5°C/24h ET: 39.5°C/6-12-18-24h y 38.5°C/18-12-6-0h, respectivamente. <u>In vivo</u> Control: THI= 62.8 ± 0.2 ET: THI= 71.7 ± 0.7	El ET <i>in vivo</i> no provocó alteraciones en la transcripción de genes como Cx43, CDH1, DNMT1 ($p > 0.05$) en los ovocitos, mientras que si disminuyó la transcripción de HSPA14 ($p < 0.05$). Por el contrario, el ET <i>in vitro</i> provocó el aumento de CDH1 en los grupos de exposición al ET de 12 h, 18 h y 24 h, además del aumento de DNMT1 en el grupo de 24 h ($p < 0.05$).
Molecular	Payton y cols. 2018 (79)	Ovocito y embrión	Examinar el efecto del ET en el transcriptoma, en los procesos mitocondriales y citoplasmáticos y en los niveles de ATP del ovocito; y evaluar si las consecuencias del ET en los niveles de ATP del ovocito se trasladan a los embriones resultantes.	<u>MIV</u> Control: 38.5°C/24h ET: 41°C/12h y 38.5°C/12h	El ET alteró la abundancia de varios transcritos importantes para la función mitocondrial y provocó el aumento de los niveles de ROS mitocondriales, mientras que redujo los niveles de ROS citoplasmáticos ($p < 0.0001$). Por otro lado, el contenido de ATP fue mayor en los ovocitos sometidos a ET, persistiendo en los embriones tempranos (8-16 células) ($p < 0.05$), pero no en los blastocistos ($p > 0.05$).
Molecular	Roth y cols. 2004 (74)	Ovocito	Examinar si el ET induce apoptosis en los ovocitos y si la apoptosis está mediada por las caspasas de tipo II y si la inhibición de estas caspasas previene la pérdida de potencial de desarrollo del ovocito causada por el ET.	<u>MIV</u> Control: 38.5°C/22h ET1: 40/12h y 38.5°C/10h ET2: 41°C/12h y 38.5°C/10h	El ET provocó un aumento de porcentaje de ovocitos con el ADN fragmentado ($p < 0.05$). Además, el ET provocó una mayor proporción de ovocitos con actividad media o alta de caspasas de tipo II ($p < 0.05$). Así mismo, la inhibición de las caspasas de tipo II previno la pérdida de potencial de desarrollo del ovocito ($p < 0.05$).
Molecular	Rowinski y cols. 2020 (81)	Ovocito	Examinar el efecto del ET en la abundancia del transcrito de IL6, IL6R, IL6ST y LIF.	<u>MIV</u> Control: 38.5°C/24h ET: 41°C/12h y 38.5°C/12h	Los niveles de transcrito de la IL6, IL6R y IL6ST, aumentaron y disminuyeron dependiendo de la temperatura en la que se realizó la MIV (ET o no) y la hora de la MIV, mientras que los niveles de LIF no se vieron afectados por el ET.
Molecular	Sakatani y cols. 2004 (84)	Embrión	Determinar si el ET causa estrés oxidativo en los embriones tempranos.	<u>CIV</u> Control: 38.5°C/8 días ET: 41°C/6h (día 0,2,4 o 6)	El ET en los días 0 y 2 provocó un mayor estrés oxidativo intracelular ($p < 0.05$).

Molecular	Sakatani y cols. 2014 (80)	Embrión	Investigar el efecto de someter a ovocitos al ET en los niveles de peróxido de hidrógeno y transcritos de HSPA1A y UCHL1 en los embriones tempranos.	<u>FIV</u> Control: 38.5°C/6 h ET: 41°C/6 h	Los embriones tempranos resultantes de ovocitos sometidos al ET, presentaron mayores niveles de peróxido de hidrógeno y de transcritos HSPA1A, y una menor abundancia de transcritos UCHL1 ($p < 0.05$).
Molecular	Soto y cols. 2009 (83)	Ovocito	Determinar si los péptidos TAT-BH4 y BIP suprimen la lesión por ET en los ovocitos mediante la reducción de los eventos de tipo apoptótico.	<u>MIV</u> Control: 39°C/21h ET: 41°C/21h	La apoptosis inducida por el ET en los ovocitos implicó vías dependientes de los dominios Bax y BH4.
Molecular	Souza y cols. 2021 (70)	Embrión	Evaluar si el ET en los ovocitos altera la abundancia de miARNs y expresión génica de DICER1 y DROSHA en los embriones derivados.	<u>MIV</u> Control: 38.8°C/24h ET: 41°C/12h y 38.8°C/12h	El ET en los ovocitos provocó el aumento de bta-miR-19b en los embriones resultantes, mientras que la abundancia de los transcritos DROSHA disminuyó ($p < 0.05$).
Molecular	Stamperna y cols. 2020 (78)	Ovocito y embrión	Evaluar los efectos del ET en la expresión génica de ovocitos (HSPB11, HSP90AA1, HSPA1A, MnSOD, GPX1, G6PD y CCNB1) y embriones (HSPA1A, HSP90AA1, GPX1, MnSOD, AKR1B1, GLUT1, PTGS2, IGF2R, DNMT3A, BAX y PLAC8).	<u>MIV</u> Control: 39°C/24h ET: 39°C/2h, 41°C/6h y 39°C/16h	El ET no provocó diferencias significativas en la expresión de genes, sin embargo, la expresión de GPX1, MnSOD y G6PD tendió a diferir ($0.05 < p < 0.07$). Así mismo, el ET provocó diferencias significativas en la expresión de tres genes en los blastocitos (DNMT3A, PLAC8, GPX1) ($p < 0.05$). Además, la expresión de PTGS2 también tendió a diferir ($0.05 < p < 0.08$).
Molecular	Yamanaka y cols. 2018 (75)	Embrión	Investigar el efecto del ET sobre la actividad de la CTSB en los embriones y analizar si la inhibición de este enzima mejora la competencia de desarrollo de los embriones.	<u>FIV</u> Control: 38.5°C/6h ET: 40°C/6h <u>CIV</u> Control: 38.5°C ET: 40°C/20h y 38.5°C/hasta día 8	El ET provocó un aumento de la actividad de CTSB en los embriones ($p < 0.01$), siendo este aumento mayor cuando se aplicó el ET en la etapa de CIV ($p < 0.05$). Así mismo, la suplementación del medio con un inhibidor de CTSB mejoró la competencia de desarrollo de los embriones del grupo ET ($p < 0.05$).

ADN: Ácido desoxirribonucleico; ADNmt: ADN mitocondrial; AGE: Activación Genoma Embrionario; AGS: Ácidos Grasos Saturados; AGS: Ácidos Grasos Poliinsaturados AI: Anafase I; ARN: Ácido Ribonucleico; ATP: Adenosin Trifosfato; CIV: Cultivo *In Vitro*; CTSB Catepsina B; ET: Estrés Térmico; FIV: Fecundación *In Vitro*; GC: Gránulos Corticales; IFNT: Interferón- τ ; MI: Metafase I; MiARN: Micro ARN; MII: Metafase II; MIV: Maduración *In Vitro*; ROS: Especies Reactivas de Oxígeno; TI: Telofase I; VG: Vesícula Germinal.

Tabla 3. Tabla resumen de las características de los estudios incluidos para alcanzar el objetivo 3 del presente Trabajo de Fin de Máster.

Estudio	Objetivos	Nº de vacas	Resultados
Al-Katanani y cols., 2002 (86)	Evaluar la tasa de preñez de vacas lecheras sometidas a ET tras un protocolo de TETF con embriones frescos o vitrificados producidos <i>in vitro</i> , en comparación con la IATF en condiciones de ET.	IATF: n = 68 TETF-F: n = 33 TETF-V: n = 54	La tasa de preñez en el día 45 de gestación fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el grupo de TETF-F ($19 \pm 5,0\%$) que en los grupos de IATF-F ($6,2 \pm 3,6\%$) y TETF-V ($6,5 \pm 4,1\%$).
Say y cols., 2021 (85)	Comparar las tasas de preñez entre las vacas control y VRs después de haberles realizado la técnica de la TE con embriones frescos producidos <i>in vivo</i> .	Control: n = 42 VR: n = 45	La tasa de preñez el día 35 de gestación tras haberles transferido un embrión fue significativamente mayor ($p < 0,05$) para el grupo control (50%) en comparación con el grupo de VRs (35,6%) tras la TE.
Son y cols., 2007 (87)	Evaluar la tasa de preñez tras un protocolo de IATF o TETF con embriones congelados producidos <i>in vivo</i> , en comparación con la tasa de preñez tras una IAE en VRs lactantes.	IAE: n = 27 IATF: n = 13 TETF: n = 13	La tasa de preñez el día 60 de gestación fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el grupo TETF (53,8%) que en los grupos IAE (18,5%) o IATF (7,7%).
Stewart y cols., 2011 (88)	Determinar si la técnica de TE con embriones frescos o vitrificados producidos <i>in vitro</i> mejora las tasas de preñez y de parto de las vacas lecheras lactantes en condiciones de ET, en comparación con la técnica de IA.	IA: n= 227 TE-F: n= 216 TE-V: n= 279	El día 40 ± 7 de gestación, el porcentaje de vacas preñadas fue significativamente mayor ($p < 0,01$) en el grupo TE-F (42,1%) que en la TE-V (29,3%) y en el de IA (18,3%). Así mismo, el día 97 ± 7 de gestación, el porcentaje de vacas preñadas fue significativamente mayor ($p < 0,05$) para los grupos TE-F (36,4%) y TE-V (25,7 %) que para el grupo de IA (17,0%) y el porcentaje para el grupo TE-F fue mayor que para el grupo TE-V. Además, el porcentaje de vacas con nacidos vivos fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el grupo TE-F (27,5 %) que en el del TE-V (17,1%) y en el de la IA (14,6%).

ET: Estrés Térmico; F: Embriones Frescos; IAE: Inseminación Artificial tras detección de Estro; IATF: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo; TE: Transferencia Embrionaria; TETF: Transferencia Embrionaria a Tiempo Fijo; V: Embriones Vitrificados; VR: Vaca Repetidora.

6. DISCUSIÓN

6.1. Efecto de la hipertermia materna en los ovocitos y embriones bovinos

La ZTN de las vacas se sitúa entre 16°C (TCI) y 25°C (TCS) y dentro de este rango, los animales mantienen una temperatura corporal fisiológica de 38,4-39,1°C (50). Cuando las temperaturas ambientales sobrepasan la TCS, que en las vacas de aptitud lechera se encuentra en 25-26°C (51), se produce el ET, que se define como el estado en el que se activan los mecanismos para mantener el equilibrio térmico corporal del animal (51,52). Además, también se produce la hipertermia materna, que se define como la elevación de la temperatura corporal de la hembra (55).

Entre los componentes del aparato reproductor femenino, el conjunto de ovocitos del ovario es muy sensible a la hipertermia materna, ya que, debido a su largo proceso de desarrollo dentro de los folículos ováricos, tienen una alta exposición al ET. De esta forma, las alteraciones inducidas por las altas temperaturas en las primeras etapas del desarrollo folicular pueden expresarse posteriormente, comprometiendo a la maduración y competencia de desarrollo del ovocito (56,57). Así mismo, el efecto de las altas temperaturas ambientales es crítico durante las primeras divisiones mitóticas del embrión o estadio de escisión/clivaje embrionaria, periodo en el que la mayor parte del genoma embrionario se encuentra inactivo. Sin embargo, el embrión bovino se hace más resistente al ET a medida que avanza en su desarrollo (58,59).

Siguiendo en esta línea, son muchos los estudios que demuestran que la hipertermia materna disminuye la tasa de ovocitos y embriones competentes para su posterior desarrollo y dar lugar a un ternero nacido vivo (89-94). Así mismo, son cada vez más los estudios que profundizan en los efectos producidos por la hipertermia materna en los ovocitos y embriones bovinos, los cuales, analizan dicho efecto a nivel celular y/o molecular.

Todos los estudios llevados a cabo *in vitro* toman como control a aquellos ovocitos y embriones madurados/fecundados/cultivados a 38,5-39°C, tal y como ocurren estos procesos *in vivo* cuando la vaca se encuentra en situación de homeotermia. Sin embargo, la simulación del ET varía en función del estudio, en el que la temperatura aplicada se encuentra en el rango de 39,5-43°C, representando aquellas temperaturas rectales que se dan en las vacas cuando éstas se encuentran en condiciones de ET menos o más intensas,

respectivamente (67). Cabe destacar que conocer la condición en la que se ha llevado a cabo la aplicación del ET en los ovocitos y embriones es fundamental, ya que los efectos del ET son temperatura y duración dependientes (89,95).

Por el contrario, los estudios llevados a cabo *in vivo* son mucho más heterogéneos, ya que dependen de la temperatura y humedad del lugar donde se haya realizado el estudio, además de las posibles variaciones ambientales que se hayan podido producir durante ese año en concreto. Sin embargo, en todas ellas se observa una clara diferencia en la temperatura y/o humedad ambiental entre los meses más cálidos o de verano, periodo en el que la vaca tiene una mayor presión de ET y los meses más fríos o de invierno, en los que la vaca se encuentra en unas condiciones ambientales más adecuadas para su producción y reproducción.

6.1.1. Efecto de la hipertermia a nivel celular

El ovocito es muy sensible al ET durante el proceso de maduración (57), por lo que el análisis de los cambios producidos durante este periodo de tiempo en los distintos compartimentos celulares, cobra un gran interés. La maduración del ovocito implica una serie de acontecimientos nucleares y citoplásmicos que dan lugar a la adquisición de la capacidad de fecundación y al posterior desarrollo embrionario (16). La reorganización nuclear implica la RVG, la condensación y segregación de los cromosomas, la finalización de la meiosis I, la extrusión del primer cuerpo polar y la detención en MII (68), mientras que la reorganización citoplasmática implica alteraciones en el citoesqueleto, redistribución de los orgánulos, alteración del metabolismo, alteración de los niveles de ARNm y cambios en los perfiles de síntesis de proteínas (16).

6.1.1.1. Efecto de la hipertermia en el núcleo del ovocito

Roth y cols. (2005) evaluaron la progresión de la meiosis en ovocitos bovinos bajo el efecto del ET (40 y 41°C/12 h) y observaron que había una menor proporción de ovocitos en estadio MII en comparación con los ovocitos control, y una mayor proporción de los mismos en otros estadios como metafase (MI), anafase (AI) o telofase (TI) de la primera división meiótica, los cuales, presentaban generalmente, husos meióticos anormales tras la MIV. Además, determinaron que el ET aumentaba los procesos apoptóticos en los ovocitos y que este efecto era revertido al añadir al medio una molécula anti-apoptótica, como es la esfingosina 1-fosfato (S1P) (68).

Igualmente, otros autores como Pavani y cols. (2015), que también evaluaron el efecto del ET (39,5 y 40,5°C/24 h) en la tasa de MIV de los ovocitos, observaron que el porcentaje de ovocitos que llegaban a alcanzar el estadio MII era menor en aquellos ovocitos que habían sufrido ET, los cuales quedaban detenidos en estadios entre la RVG y TI (67).

Además, en este mismo estudio, también evaluaron el efecto del ET en el desarrollo folicular *in vivo* en la posterior MIV de los ovocitos y observaron que había una menor proporción de ovocitos recogidos en meses más cálidos que alcanzaban el estadio MII que ovocitos recogidos en meses más fríos. En este caso, la mayoría de los ovocitos recogidos bajo el efecto del ET que no llegaban al estadio MII se encontraban detenidos en el estadio TI (67). De la misma forma, en el estudio realizado por Báez y cols. (2022) también observaron una menor proporción de ovocitos en MII cuando éstos eran recogidos en verano en comparación con los recogidos en invierno (64).

Así mismo, en este último estudio de Báez y cols. (2022), evaluaron el efecto del ET en el desarrollo folicular *in vivo* en el grado de compactación de la cromatina en ovocitos en estadio VG. Para ello, distinguieron 3 grados de compactación, de menor a mayor compactación: VG1, VG2 y VG3 (64). Según lo descrito por otros autores, los ovocitos en estadio VG2 y VG3 presentan una mayor competencia de desarrollo en comparación con los ovocitos en estadio VG1 (96,97). Sin embargo, en este estudio de Báez y cols. (2022) vieron que el porcentaje de ovocitos en estadio VG3 era significativamente inferior en ovocitos recogidos durante el verano que durante el invierno. Eso significa que el retraso de la transición nuclear hacia el estadio VG3 provocado por el ET podría ser otro factor perjudicial para el correcto desarrollo ovocitario (64).

Por otro lado, Ju y cols. (2005), evaluaron el efecto del ET (42°C/1, 2 y 4 h) en la morfología del huso meiótico y observaron un mayor porcentaje de ovocitos sometidos al ET con morfología del huso alterada en comparación con los ovocitos control. Además, vieron que el tamaño del huso disminuía a medida que aumentaba la duración del ET de 1 a 4 h (63). Este hecho sugiere que el ET afecta a la polimerización o despolimerización de los microtúbulos del huso meiótico, lo cual reafirma lo observado en estudios previos, los cuales describen que los microtúbulos del huso son susceptibles a los cambios de

temperatura (98). Cabe destacar que estas alteraciones en los microtúbulos del huso pueden contribuir a alterar el proceso de separación de los cromosomas durante la fecundación y la posterior división embrionaria (63).

Todos estos hallazgos previamente descritos sugieren que el ET tanto en el desarrollo folicular *in vivo*, como a lo largo de la maduración de los ovocitos puede perjudicar la reanudación de la meiosis y, por tanto, comprometer la capacidad de los ovocitos para ser fecundados (63,64,67,68). Además, uno de los estudios también indica que la inducción de la apoptosis por el ET está funcionalmente relacionada con la inhibición de la progresión meiótica (68).

Sin embargo, cuando Edwards y cols. (2005) evaluaron el efecto del ET (41°C/12 h) en la RVG/condensación de la cromatina y en la progresión al estadio MI, y en la progresión de MI a MII, obtuvieron resultados que diferían con los resultados obtenidos por los autores previamente mencionados. Mientras que a las 4 h había una proporción similar de ovocitos sometidos y no sometidos al ET que tenían la VG intacta, a las 8 h, había una mayor proporción de ovocitos sometidos a ET que ya habían experimentado la RVG y que habían llegado al estadio MI en comparación con los controles. Cabe destacar que esta diferencia dejó de ser evidente a las 12 h, ya que para este momento, la mayoría de los ovocitos control también habían alcanzado este estadio (16). De la misma forma, en el estudio llevado a cabo por Hooper y cols. (2015), en el que también evaluaron el efecto del ET (41°C/12 h) en el momento en el que se producía la RVG, vieron que la proporción de ovocitos con VG intacta era similar a las 2 h de maduración, mientras que la proporción de ovocitos que habían experimentado la RVG a las 4 era mayor bajo el efecto del ET y este efecto era aún más pronunciado a las 6 h (66).

Además, en este estudio de Hooper y cols. (2015), también evaluaron el contenido de triglicéridos y fosfolípidos de los ovocitos durante su maduración y observaron que el contenido de triglicéridos y fosfolípidos era alto al inicio del proceso de maduración, cuando la incidencia de RVG era baja, mientras que dicho contenido era bajo a las 24 h de maduración, cuando dicha incidencia era alta. De esta forma, demostraron que los cambios lipolíticos en el contenido de triglicéridos y fosfolípidos estaban asociados con la RVG en los ovocitos bovinos (66). Sin embargo, el contenido de triglicéridos y fosfolípidos disminuyó de forma similar en los ovocitos madurados en condiciones

termoneutrales y de ET, por lo que, aunque los mecanismos subyacentes de la aceleración de la RVG por el ET siguen sin estar claros, los cambios en la actividad lipolítica previamente descritos no parecen ser problemáticos (66).

Por otro lado, en cuanto a la progresión del estadio MI a MII, Edwards y cols. (2005) observaron una fuerte tendencia a las 16 h y una diferencia significativa a las 18 h entre el grupo sometido al ET y grupo control, ya que el ET provocó un aumento de la proporción de ovocitos que alcanzaron el estadio MII en comparación con los controles. Sin embargo, a las 21 h estas diferencias ya no eran apreciables, debido a que es el momento en el que la mayoría de ovocitos control también alcanzan este estadio (16). Al mismo tiempo, Hooper y cols. (2015) observaron que a las 24 h de maduración, había una proporción similar de ovocitos sometidos y no sometidos al ET que progresaron al estadio MII (66).

Por tanto, tanto el estudio realizado por Edwards y cols. (2005), como el de Hooper y cols. (2015) llegaron a la conclusión de que el ET no afecta a la capacidad del ovocito para experimentar la maduración nuclear, sino que disminuye el tiempo necesario para que se produzca la RVG y que culmine la maduración de los ovocitos (16,66). Estos resultados contradicen a lo observado por los autores anteriormente mencionados, los cuales indican que el ET afecta negativamente y detiene la progresión de la meiosis (64,67,68), por lo que existe cierta controversia sobre este tema.

6.1.1.2. Efecto de la hipertermia en el citoplasma y membranas del ovocito

Con el fin de determinar el efecto producido por el ET en la maduración citoplasmática, Ahmed y cols. (2017) evaluaron el estado de los GC en los ovocitos sometidos a ET (41°C/12 h) a lo largo de su maduración. En este estudio observaron que en los ovocitos sometidos al ET los GC eran escasos o estaban ausentes y no era evidente su migración hacia la corteza, a diferencia de los ovocitos madurados a una temperatura fisiológica, en los que los GC migraban hacia la corteza y ocupaban la zona situada justo debajo del oolema (61). Algunos estudios realizados en ovocitos porcinos y embriones bovinos de dos células, han indicado que la disminución de la migración de los GC durante el ET podría atribuirse a la pérdida estructural y organizativa de los microfilamentos por causa del ET (99,100), mientras que otros estudios como el de Edwards y cols. (2005) atribuyen a una translocación prematura de los GC (16).

En este estudio de Edwards y cols. (2005), evaluaron el tipo de GC (tipo I: grandes agregados; tipo II: agregados con algo de dispersión; tipo III: completa dispersión) que predominaba bajo el efecto del ET (41°C/6, 12 y 24 h) (16). En este estudio observaron que mientras que la maduración de los ovocitos a 41°C durante 6 h no alteraba el tipo de GC, cuando la duración del ET ascendía a las 12 h, se producía una disminución de la proporción de ovocitos con GC de tipo II y aumentaba el de los que tenían GC de tipo III, siendo este acontecimiento aún más prominente cuando el ET se prolongaba hasta las 24 h. En cambio, los ovocitos no sometidos al ET, presentaban mayoritariamente GCs de tipo I y II (16). Estos resultados sugieren que el ET no compromete la habilidad de los ovocitos para llevar a cabo la maduración citoplasmática, sino que reduce el tiempo necesario para que se lleve a cabo este proceso crítico (16,101,102).

Siguiendo con los cambios citoplasmáticos producidos por el ET, en el estudio llevado a cabo por Ahmed y cols. (2017) observaron una hinchazón generalizada de todos los orgánulos, incluidas las mitocondrias, el RE y el CG (61). Otros estudios realizados en especies diferentes a la bovina, como en roedores, han revelado que la hinchazón mitocondrial producido por el ET a una intensidad baja se revierte cuando se vuelve a temperaturas fisiológicas, mientras que dicha reparación no se logra cuando el ET se produce a mayor intensidad (103). Cabe destacar que la alteración de estos orgánulos en un grado irreversible es letal para los ovocitos. No obstante, el hecho de que haya posibilidad de revertir el efecto del ET sugiere la existencia de cierta plasticidad de algunos orgánulos como las mitocondrias para hacer frente a la hipertermia materna, aunque dicha capacidad de reparación parece tener una temperatura umbral, a partir de la cual, el proceso se vuelve irreversible. Por otro lado, aunque la afección de las mitocondrias pueda ser reversible, la alteración de su funcionamiento durante el ET podría estar asociada a una disminución de la generación de ATP dentro del ovocito, lo que comprometería el correcto desarrollo del mismo (61).

Además de los hallazgos anteriormente descritos, Ahmed y cols. (2017) también observaron un gran número de lisosomas y ribosomas libres en ovocitos sometidos a ET, lo que puede estar asociado a una disminución de la síntesis proteica (61). Este hecho coincide con estudios previos en embriones bovinos de 2 células, donde vieron que la síntesis de proteínas disminuía en un 30-50% durante el ET (95).

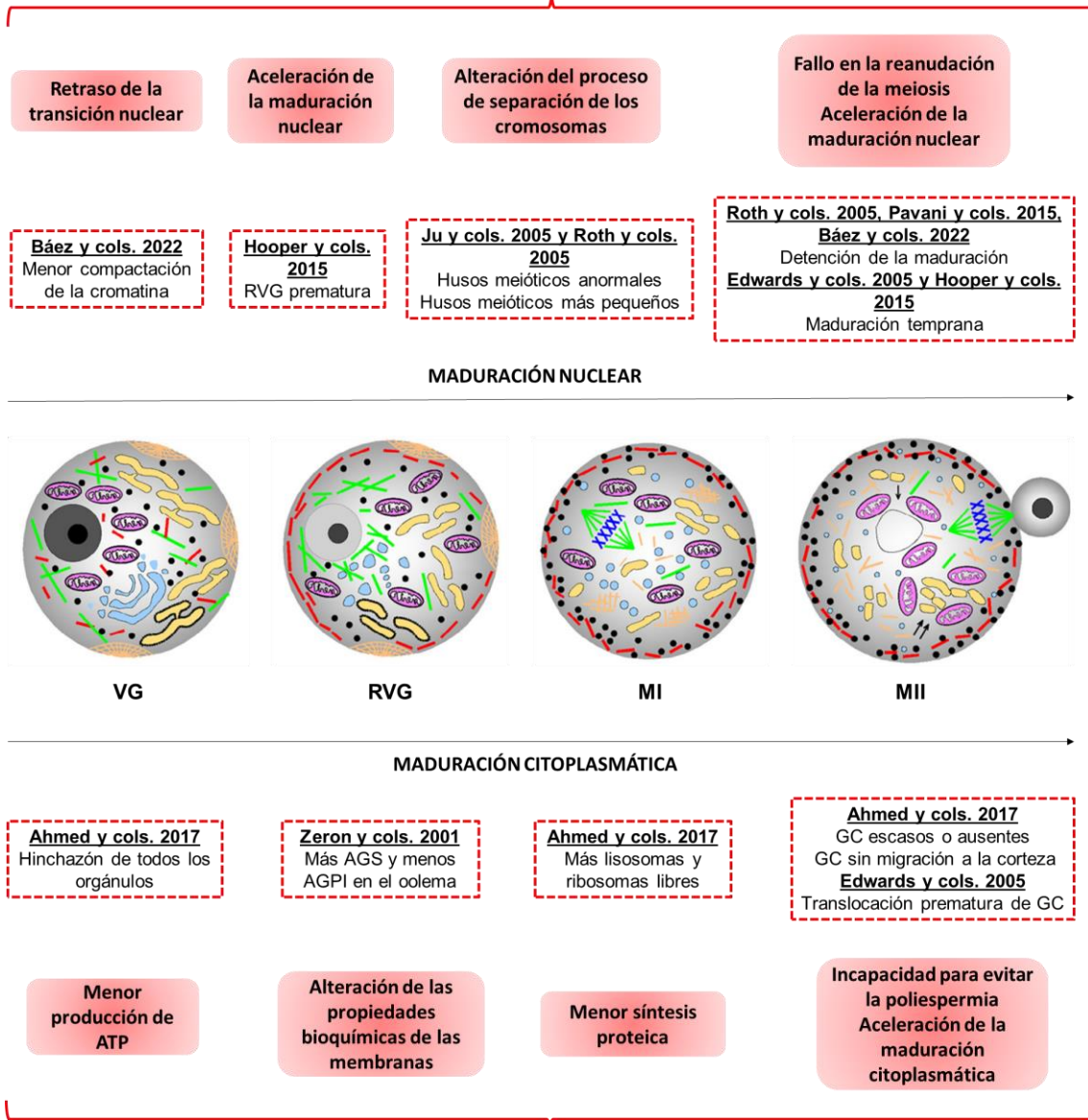
En cuanto a los efectos de la hipertermia a nivel de las membranas del ovocito, Zeron y cols. (2001), a la hora de investigar si el ET *in vivo* provocaba alteraciones en la composición de ácidos grasos, observaron una mayor cantidad de ácidos grasos saturados (AGS) y una menor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en ovocitos sometidos al ET. Estos resultados sugieren que los cambios de temperatura provocan alteraciones en las propiedades bioquímicas de las membranas, influyendo al mismo tiempo en la fertilidad y funcionalidad del ovocito (65).

Por último, Ahmed y cols. (2017) también observaron que los ovocitos sometidos a ET presentaban cambios degenerativos y de apoptosis en células del cúmulo (61). Así mismo, Báez y cols. (2022), cuando evaluaron el efecto del ET durante el desarrollo folicular *in vivo* en las células del cúmulo, obtuvieron resultados similares, ya que el índice apoptótico de estas células en ovocitos recogidos en verano fue 4 veces mayor que en ovocitos recogidos en invierno y 3 veces mayor después de llevar a cabo su MIV (64). Dado que el papel de las células del cúmulo es vital para nutrir al ovocito durante su maduración hasta el estadio MII y facilitar el intercambio de señales nutritivas y químicas, su degeneración compromete indudablemente la viabilidad del ovocito (104).

En conjunto, todos estos resultados sugieren que las perturbaciones inducidas por las altas temperaturas ambientales en el núcleo, ooplasma, oolema o las células del cúmulo pueden comprometer el desarrollo del ovocito bovino.

En la **Figura 13** se recogen de forma esquemática todas las alteraciones producidas por el ET a nivel celular en los ovocitos durante su proceso de maduración según lo descrito por los autores anteriormente mencionados y las implicaciones que pueden tener dichas alteraciones en la competencia ovocitaria.

DISMINUCIÓN DE LA COMPETENCIA OVOCITARIA



DISMINUCIÓN DE LA COMPETENCIA OVOCITARIA

Figura 13. Representación esquemática de los efectos producidos por el ET a nivel celular durante la maduración ovocitaria según los estudios seleccionados para esta revisión sistemática. En la parte superior se recogen las alteraciones inducidas por el ET en la maduración nuclear y sus implicaciones. En la parte inferior se recogen las alteraciones inducidas por el ET en la maduración citoplasmática y sus implicaciones. El conjunto de todas estas alteraciones provoca una disminución de la competencia ovocitaria. Fuente: Imagen adaptada de Mao y cols., 2014 (164).

6.1.1.3. Efecto de la hipertermia en el embrión

Almeida y cols. (2019) evaluaron el efecto del ET durante la maduración del ovocito en la posterior organización de la cromatina en el embrión y observaron que el ET (41 y 43°C/6 h) provocaba alteraciones en dicha organización, sobre todo, en embriones de 4 células. Este resultado sugiere que el ET durante la maduración del ovocito podría afectar posteriormente, a la AGE, lo que comprometería a su desarrollo (82).

Por otro lado, Rivera y cols. (2003) evaluaron el efecto del ET durante el CIV de los embriones en sus características estructurales y observaron que el ET (41,5°C/12 h) provocaba el desplazamiento de los orgánulos hacia el centro de la blastómera (62). Este hecho sugiere que el ET afecta al citoesqueleto, ya que este sistema está implicado en el transporte activo de los orgánulos y otros componentes de la célula (105). Además, también vieron que el ET aumentaba el porcentaje de embriones con mitocondrias hinchadas (62), al igual de lo que observaron Ahmed y cols. (2017) en las mitocondrias de los ovocitos sometidos a ET (61). Se ha planteado la hipótesis de que la hinchazón de la matriz mitocondrial se produce por la apertura del poro de transición de permeabilidad de alta conductancia en la membrana mitocondrial interna y que da lugar a un flujo no selectivo de solutos (106). De esta forma, las mitocondrias no son capaces de mantener un gradiente de protones, se detiene la síntesis aeróbica de ATP, se produce un desdoblamiento progresivo de la cresta mitocondrial interna y se liberan varios componentes iniciadores de la apoptosis, como el citocromo c y el factor inductor de la apoptosis, todo lo cual afecta negativamente al desarrollo embrionario (107). Así mismo, cuando el ET aplicado era muy intenso (43°C), se observó un aumento de distancia entre las membranas de la envoltura nuclear, una membrana plasmática con aspecto rugoso, que indica la pérdida de microvellosidades, aparición de material denso en el núcleo y el citoplasma, que indica una desnaturalización de proteínas, y aumento del número de lisosomas, que indica el comienzo del proceso de autodigestión de las blastómeras (62).

El conjunto de estos resultados indica que las altas temperaturas ambientales durante el desarrollo embrionario temprano pueden interrumpir dicho desarrollo al provocar alteraciones en el núcleo, citoplasma, mitocondrias y otros orgánulos.

6.1.2. Efecto de la hipertermia a nivel molecular

Durante el crecimiento folicular desde el estadio primordial hasta el antral, la transcripción y la traducción dentro del ovocito son intensas (56). El ARNm materno almacenado en el ovocito es fundamental durante el periodo de maduración del mismo, la fecundación y las primeras divisiones embrionarias, hasta que el genoma embrionario se vuelve completamente funcional (108), que en los bovinos, se produce en el estadio embrionario de 8-16 células (109).

Así mismo, la expresión génica, que se encuentra altamente regulada durante la maduración del ovocito y el desarrollo del embrión, requiere la regulación mediante factores de transcripción y mediante mecanismos epigenéticos (110). Sin embargo, el ET puede alterar la expresión de genes que son fundamentales para el correcto desarrollo de los ovocitos y embriones (76), por lo que el análisis de los cambios producidos durante este periodo de tiempo en la expresión de genes relevantes para la competencia ovocitaria y embrionaria cobra un gran interés.

Además, las mitocondrias participan en el metabolismo celular, la homeostasis y la apoptosis, y también están asociadas a la competencia de los ovocitos y embriones (111). Por este motivo, el estudio del efecto del ET en los niveles de distintas moléculas asociadas a la funcionalidad mitocondrial o el estudio de las vías que podrían estar implicadas en la disminución de la calidad ovocitaria y embrionaria también proporcionaría información sobre la forma en la que el ET afecta a estas estructuras.

6.1.2.1. Efecto de la hipertermia en el ovocito

Díaz y cols. (2021) evaluaron el efecto del ET en el desarrollo folicular *in vivo* en los perfiles transcriptómicos de los ovocitos. Un total de 211 y 92 genes se expresaron de forma diferencial como resultado del ET en ovocitos en estadio de VG y MII, respectivamente. En los ovocitos en estadio de VG, dichos genes están implicados en procesos de biosíntesis de esteroides, reducción de la oxidación y mitofagia en respuesta a la despolarización mitocondrial, mientras que las vías influenciadas por el ET están relacionadas con la biosíntesis de glucocorticoides, la señalización de la apoptosis y la señalización de HIPPO. Por otro lado, en los ovocitos en MII, los genes expresados diferencialmente están implicados en la regulación de la cascada MAPK, la organización del melanosoma y la regulación negativa de la transcripción, mientras que las vías

influenciadas por el ET están relacionadas con la señalización de pluripotencia Oct-4, la señalización Wnt/beta-catenina y la degradación de la melatonina (76). Este estudio reciente muestra una visión general del efecto que el ET produce en la expresión génica de los ovocitos, además de destacar los principales procesos y vías que podrían verse afectados por dicho estrés y que afectan a la competencia ovocitaria.

Así mismo, Pavani y cols. (2017) observaron que el ET en el desarrollo folicular *in vivo* provocaba alteraciones en la expresión de HSPA14, ya que, en los ovocitos recogidos durante el verano su expresión era significativamente menor en comparación con aquellos recogidos durante el invierno (73). Esto podría explicar en parte, la menor proporción de ovocitos que alcanzan el estadio MII cuando son recogidos en verano (67), teniendo en cuenta que la alta expresión de HSPA14 resulta en un aumento de la síntesis de esta proteína que está implicada en la supervivencia de los ovocitos (112).

Estos mismos autores evaluaron la expresión génica de CDH1 y DNMT1 en ovocitos sometidos a un ET cinético (39,5°C/6, 12, 18 y 24 h) durante la MIV. En este caso, no se observó ninguna diferencia de expresión génica cuando el ET se aplicó con 6 h de duración. Los autores sugieren que los ovocitos son resistentes a un aumento de 1°C respecto a la temperatura fisiológica de la vaca (38,5°C) durante un período de 6 h (73), ya que una vez sobrepasadas estas 6 h bajo el ET, se producía una regulación al alza de CDH1 (73). CDH1 funciona como regulador de la proliferación celular al participar en la detención de G1 y G2 (113). Esta función puede explicar la constante regulación al alza de CDH1 como un intento de proteger a los ovocitos de la apoptosis, ya que CDH1 se regula al alza cuando hay signos de daño en el ADN debido al ET y se asocia con la protección de las células bajo diferentes condiciones de estrés (73). Además, cuando los ovocitos se sometieron al ET durante 24 h de MIV, también se producía una regulación al alza de DNMT1 (73). Según lo descrito por otros autores, la mayor expresión de CDH1 junto con DNMT1 es también un indicador de apoptosis (114).

Así mismo, Gendelman y cols. (2012) evaluaron si el ET en el desarrollo folicular *in vivo* afectaba a la expresión génica de genes involucrados en el crecimiento y maduración ovocitaria (MOS, GDF9 y POU5F1). Mientras que no observaron ninguna diferencia de expresión en ovocitos en estadio VG recogidos en la estación cálida en comparación con los recogidos en la estación fría, los ovocitos en estadio MII recogidos

en la estación cálida mostraron una disminución de la expresión de los 3 genes (69). Como se ha comentado anteriormente, durante el desarrollo ovocitario y folicular, el ovocito acumula ARNm y proteínas maternas. El ARNm almacenado es fundamental durante el periodo de maduración, la fecundación y las primeras divisiones embrionarias, hasta que el genoma embrionario se vuelve completamente funcional (115). El hecho de que en este estudio se encontrara una disminución de expresión de dichos genes una vez que los ovocitos estaban maduros, sugiere que existe un efecto estacional deletéreo en el almacenamiento del ARNm materno de los ovocitos (69).

Rowinski y cols. (2020), en cambio, evaluaron el efecto del ET en la abundancia del transcrito de la citoquina IL6, su receptor (IL6R) y su transductor de señal (IL6ST). Estos autores observaron que el ET (41°C/12 h) provocaba un aumento y disminución de IL6, IL6R e IL6ST dependiendo del momento de la MIV (81). En concreto, los niveles máximos de IL6 en los ovocitos expuestos al ET se producían ~2 horas antes que en los controles. En cuanto al impacto en la expresión de la IL6ST, los niveles máximos en los ovocitos expuestos al ET ocurrían ~1,5 horas antes que en los controles (81). Cabe mencionar que en un estudio llevado a cabo en roedores, en el que añadieron hipoxantina para inhibir la RVG, la adición de IL6 y IL6R indujo su rotura (116). Así mismo, en otro estudio previo realizado en otros tipos celulares, la IL6 redujo la permeabilidad de las uniones gap, requisito para que pueda producirse la RVG (117). Aunque los factores que desencadenan la aceleración de dicha rotura por causa del ET siguen sin estar claros, el cambio inducido por el ET en el momento de la expresión de la IL6 y la IL6ST en ~2 y 1,5 h antes que el control, respectivamente, apoya la noción de que la IL6 es un factor que contribuye a la aceleración de la RVG inducida por el ET, como se ha descrito por otros autores como Edwards y cols. (2005) y Hooper y cols. (2015) anteriormente mencionados (16,66).

Por otro lado, teniendo en cuenta que las mitocondrias participan en el metabolismo celular, la homeostasis y la apoptosis, Ferreira y cols. (2013) evaluaron el efecto del ET en el desarrollo folicular *in vivo* en la expresión génica de genes relacionados con la mitocondria (PPARGC1A, TFAM y MT-CO1), apoptosis (BCL-2 y BAX) y ET (HSP90AA1 y HSPA1AB) y observaron que en verano se producía una disminución significativa de la expresión de todos ellos. Este hecho sugiere que las funciones biológicas como la transcripción y replicación mitocondrial, la apoptosis y la producción

de chaperonas pueden verse alteradas durante el ET, perturbando la calidad de los ovocitos (72).

De la misma forma, Roth y cols. (2004) también evaluaron si el ET provocaba la activación de vías apoptóticas y si dicha apoptosis estaba mediada por las caspasas de tipo II. Al igual que los anteriores autores, éstos observaron que el ET (40 y 41°C/12 h) activaba procesos apoptóticos y que dichos procesos se llevaban a cabo mediante caspasas de tipo II, ya que al inhibir este tipo de caspasas se revertía la pérdida de potencial de desarrollo del ovocito. Esto sugiere que ésta es una vía crítica implicada en deteriorar la competencia ovocitaria (74).

En cambio, Soto y cols. (2009) evaluaron si la apoptosis inducida por el ET implicaba las vías dependientes de los dominios Bax y BH4 mediante la observación de cambios producidos en la fragmentación de DNA, potencial de la membrana mitocondrial y número de copias de DNA mitocondrial al añadir péptidos anti-apoptóticos (BIP y TAT-BH4) en el medio de MIV bajo condiciones de ET (41°C/21 h). Estos péptidos anti-apoptóticos están implicados en la inhibición de esos 2 dominios. Estos autores observaron un efecto protector de dichos péptidos anti-apoptóticos, lo que muestra la implicación de los dominios Bax y BH4 en la apoptosis inducida por el ET en ovocitos bovinos (83).

Por otro lado, Payton y cols. (2018) evaluaron el efecto del ET en el transcriptoma del ovocito y observaron que el ET (41°C/12 h) provocaba numerosas alteraciones en los transcritos durante la maduración del ovocito, de los cuales se podían destacar los transcritos que forman parte de la cadena de transporte de electrones y de las reacciones de fosforilación oxidativa, relativos a la translocación de proteínas a las mitocondrias y a la síntesis de proteínas dentro de las mitocondrias (79). En conjunto, estas perturbaciones del transcriptoma inducidas por el ET podrían indicar cambios estructurales y funcionales en las mitocondrias de los ovocitos, como ya han confirmado otros autores como Ahmed y cols. (2017), previamente mencionados (61).

Siguiendo en esta línea, Payton y cols. (2018), también evaluaron si el ET provocaba cambios en el potencial de reducción/oxidación (mediante la medición de ROS y glutatión) y niveles de energía (mediante la medición de ATP). En este caso vieron que las ROS mitocondriales estaban aumentadas, producto de la disfunción de la fosforilación

oxidativa, mientras que las ROS citoplasmáticas se mantenían normales, lo que sugiere que el impacto del ET podría ser local (79). Además, los niveles de glutatión a las 12 h se vieron aumentadas, mientras que a las 24 h de maduración los niveles de glutatión total y reducido se vieron disminuidas (79). Dado que los ovocitos dependen de las células del cúmulo para la síntesis de glutatión (118), el aumento de los niveles a las 12 h sugiere que el cúmulo circundante puede estar actuando de forma termoprotectora (95), posiblemente proporcionando más glutatión al ovocito. En cambio, los niveles reducidos de glutatión total y reducido en los ovocitos sometidos a ET a las 24 h sugiere el consumo de este antioxidante intracelular, posiblemente debido a una mayor neutralización de las ROS (79).

Así mismo, cuando Payton y cols. (2018), midieron los niveles de ATP en los ovocitos sometidos a ET vieron que el contenido de ATP tras 24 h de maduración era mayor en ovocitos sometidos al ET que en ovocitos control (79). Hooper y cols. (2015) también midieron los niveles de ATP en los ovocitos a lo largo del proceso de maduración y en este caso, observaron que el contenido de ATP de los ovocitos dependía tanto de la temperatura como del tiempo en el que los ovocitos habían transcurrido en maduración. Esta afirmación se basa en que no se observaban diferencias en su contenido en ovocitos control en comparación con los ovocitos sometidos a ET durante las primeras 6 h de maduración, mientras que a las 24 h, el contenido de ATP fue mayor en estos últimos (66). Sin embargo, no está claro si este hallazgo es un indicador de cambios lipolíticos que implican un aumento de la β -oxidación de los ácidos grasos, o si es representativo de un exceso de ATP por disfunción mitocondrial, cambios en la capacidad de síntesis de proteínas u otras alteraciones aún no identificadas (66).

No obstante, el aumento del contenido de ATP de los ovocitos sometidos a ET a las 24 h de MIV concuerda con los cambios que se producen una vez completada la maduración en ovocitos envejecidos, puesto que algunos autores han visto que los ovocitos bovinos madurados entre 30 y 40 h tienen más contenido de ATP que los ovocitos madurados durante 20 h (119). Esto sugiere que los ovocitos sometidos a ET durante la MIV podrían estar envejecidos en el momento de la fertilización, lo cual explicaría la disminución de la competencia ovocitaria observada en ovocitos sometidos al ET (66).

Por último, Stamperna y cols. (2020) evaluaron el efecto del ET durante la MIV en la expresión génica de GPX1, MnSOD y G6PD. Estos autores observaron que aunque el ET (41°C/6 h) no producía diferencias significativas en la expresión de ninguno de los genes, sí que se detectó una fuerte tendencia a la regulación al alza de GPX1, MnSOD y G6PD (78). Los genes GPX1, MnSOD y G6PD son partes esenciales de la defensa antioxidante de la célula (78) y además, la actividad de la G6PD se asocia positivamente con la competencia de los ovocitos (120). En este estudio, además de que la expresión del G6PD se encontrase aumentado, también se vio que estaba altamente correlacionado con la expresión de HSPB11, probablemente, como parte de un mecanismo de protección contra los factores de oxidación; y con CCNB1, que está relacionado con el ciclo celular, teniendo como objetivo, probablemente, la de proteger la integridad del ciclo celular (78).

En la **Figura 14** se puede ver un resumen de las alteraciones que se producen en los ovocitos por la influencia del ET en la expresión de distintos genes, transcritos y proteínas dentro de los ovocitos, según los autores mencionados anteriormente.

Díaz y cols. 2021

- Proceso de biosíntesis de esteroides alterado
- Proceso de reducción oxidativa alterado
- Mitofagia alterada
- Regulación de la cascada MAPK alterada
- Organización del melanosoma alterada
- Regulación negativa de la transcripción alterada

Payton y cols. 2018

- Alteración de la cadena de transporte de electrones y de las reacciones de fosforilación oxidativa
- Alteración de la translocación de proteínas a las mitocondrias
- Alteración de la síntesis proteica dentro de las mitocondrias
- Potencial de oxidación/reducción alterado

Gendelman y cols. 2012

- Afección de la correcta maduración ovocitaria

Pavani y cols. 2017

- Menor supervivencia de ovocitos

Rowinski y cols. 2020

- Aceleración de la RVG

Stamperna y cols. 2020

- Aumento de la defensa antioxidante

Ferreira y cols. 2013

- Transcripción y replicación mitocondrial afectadas
- Proceso apoptótico alterado
- Producción de chaperonas alterada

Hooper y cols. 2015 y Payton y cols. 2018

- Envejecimiento ovocitario

Roth y cols. 2004 y Soto y cols. 2009 y Pavani y cols. 2017

- Aumento de procesos apoptóticos

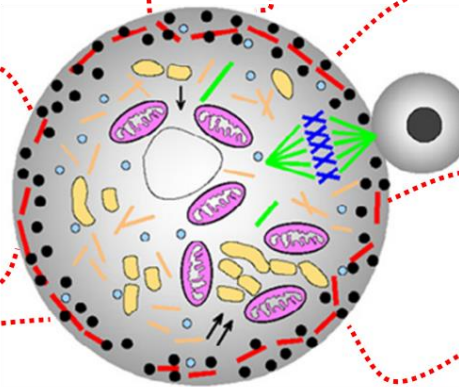


Figura 14. Resumen de las alteraciones producidas en los ovocitos por los efectos del ET a nivel molecular durante su maduración según los estudios seleccionados para esta revisión sistemática. Fuente: Imagen adaptada de Mao y cols., 2014 (164).

6.1.2.1. Efecto de la hipertermia en el embrión

Las modificaciones epigenéticas relacionadas con la estructura de la cromatina incluyen cambios en la metilación del ADN y modificaciones postraduccionales en las histonas. La cromatina altamente condensada (heterocromatina) suele ser transcripcionalmente represiva, mientras que la cromatina no condensada (eucromatina) es permisiva para la transcripción (121). Durante el desarrollo temprano, el embrión experimenta una activación del genoma que requiere modificaciones epigenéticas, como cambios en la metilación de las histonas y cambios en la organización de la cromatina (122). Como se ha dicho anteriormente, en el bovino, la mayor AGE ocurre entre los estadios de 8 y 16 células (123) y está asociada a la remodelación de la cromatina (124). Esas modificaciones son esenciales para reprogramar el genoma parental y generar embriones sanos (125).

Se ha demostrado que la metilación de H3K9 se correlaciona con la represión transcripcional y sirve como sitio de unión específico para la HP1. HP1 reconoce la cromatina metilada por H3K9, se oligomera y forma una plataforma versátil que participa en diversas funciones nucleares, que van desde el silenciamiento de genes hasta la segregación cromosómica (126). En embriones bovinos fecundados *in vitro*, la metilación de H3K9 se reduce entre los estadios de 2 y 4 células y aumenta a partir del estadio de 8 células (127). A pesar de la presencia de H3K9 metilado, no hay una clara co-localización entre HP1 y H3K9 en embriones bovinos en las etapas de 2 y 4 células. De hecho, la co-localización entre H3K9 y HP1 sólo es evidente en el estadio de 8 células (124), coincidiendo con la AGE. Los cambios en los niveles de metilación de HP1 y/o H3K9 podrían alterar la AGE y perjudicar el desarrollo embrionario (82).

Siguiendo en esta línea, Almeida y cols. (2019), con el fin de comprobar si el ET (41,5°C/12 h) durante la maduración del ovocito podría afectar a la remodelación de la cromatina en el embrión en su fase inicial, evaluaron la distribución de la trimetilación de H3K9 (H3K9me3) y de HP1 en embriones de 4 y 8 células (82). Estos autores observaron una inesperada acumulación de H3K9me3 y HP1 en los núcleos de embriones de 4 células y una presencia anormal de H3K9me3 en embriones de 8 células derivados de ovocitos sometidos a ET. Estos hallazgos sugieren la presencia de alteraciones en la remodelación

de la cromatina embrionaria, pudiendo causar perturbaciones en la AGE y, en consecuencia, en la expresión génica (82).

Siguiendo con las alteraciones epigenéticas producidas por el ET, Stamperna y cols. (2020) observaron que la expresión de DNMT3A en el grupo de ET (41°C/6 h) estaba regulada a la baja (78). Este gen codifica la metiltransferasa de novo del ADN, que controla en parte, las marcas epigenéticas. Una actividad reducida de DNMT3A indica una menor actividad de metilación y se ha demostrado que una expresión reducida de este gen está relacionada con una alta capacidad de desarrollo de los embriones producidos *in vitro* (128).

Así mismo, estos mismos autores registraron una sobreexpresión de PLAC8 en los embriones del grupo ET (78). PLAC8 regula el desarrollo de la placenta y la interacción embrión-madre, de hecho, en previos estudios se ha mostrado una mayor expresión de PLAC8 en embriones que dieron lugar a una gestación y un parto normal que en las que resultaron en una gestación no establecida o en un aborto espontáneo (129).

El patrón de expresión de DNMT3A y PLAC8 sugiere que la reducida proporción de ovocitos que sobreviven al ET pueden convertirse en embriones sanos. De hecho, cabe destacar que aunque bajo condiciones de altas temperaturas ambientales las tasas de preñez del ganado lechero disminuyan, el nacimiento de terneros sanos sigue existiendo, lo que sugiere la existencia de una cierta termotolerancia inherente en algunos animales y sus gametos, lo que les permite la formación de un embrión normal y el nacimiento de un ternero sano (78).

Por otro lado, Pavani y cols. (2016) comprobaron el impacto del ET en el desarrollo folicular *in vivo* en la expresión génica de CDH1, DNMT1 y HSPA14, en los embriones derivados de ovocitos recogidos en meses cálidos en comparación con los recogidos en meses fríos. En este estudio observaron una constante regulación a la baja del gen DNMT1 en todas las etapas del desarrollo del embrión cuando estos provenían de ovocitos recogidos en los meses cálidos (71); así mismo, se han obtenido resultados similares en estudios realizados en roedores (130). Se ha planteado la hipótesis de que esta modificación epigenética inducida por el ET puede ser una de las responsables de la muerte celular programada en los embriones, puesto que estudios previos realizados en

ranas han revelado que la depleción transitoria de DNMT1 en los embriones induce la hipometilación del ADN, produciendo fenotipos alterados y causando apoptosis (131).

Por el contrario, cuando estos mismos autores evaluaron el efecto del ET (39,5°C y 40,5°C/24 h) en la MIV, observaron que el ET aumentaba la expresión de DNMT1 en todos los estadios de desarrollo embrionario, excepto en el estadio de mórula (71). Sin embargo, este aumento tampoco parece ser beneficioso, ya que en estudios previos se ha demostrado que la presencia aberrante del gen DNMT1 en la placenta de los terneros puede ser la causante de la aparición de problemas de desarrollo y, en última instancia, provocar su muerte (132).

Así mismo, Pavani y cols. (2016) también determinaron que el ET, tanto en el desarrollo folicular *in vivo*, como en la MIV de ovocitos, provoca la disminución de la expresión de HSP14 en los embriones, lo cual podría perjudicar el desarrollo embrionario, puesto que, como se ha mencionado anteriormente, estas chaperonas juegan un papel vital en la supervivencia y desarrollo de las células (71). Así mismo, el ET *in vitro* también provocaba la disminución de CDH1, excepto en el estadio de blastocisto, en el que su expresión se encontraba aumentada. Los autores sugieren que esta regulación a la baja podría estar asociada a la disminución de HSP14 (71). Además, una posible razón para la regulación al alza de CDH1 observada en la fase de blastocisto puede explicarse junto a la regulación al alza de DNMT1 también observada, ya que el patrón de alta expresión de CDH1 y DNMT1 ya ha sido previamente descrita en células cancerosas o en muestras afectadas de otro modo (muestras con ET, patógenas o degeneradas) (114).

Por otro lado, Amaral y cols. (2020) evaluaron el efecto del ET (40,5°C/6 h), antes de la AGE en la producción de ROS y observaron que el ET, aplicado tanto en la etapa de MIV, FIV y CIV de forma independiente, como en todas ellas, provocaba el aumento de producción de ROS en los embriones de 7 días, siendo este aumento mayor cuando el ET se aplicaba en los 3 procesos (77). Así mismo, Sakatani y cols. (2004) evaluaron si el ET (41°C/6 horas) en el CIV de embriones provocaba estrés oxidativo en los mismos y observaron que cuando el ET se aplicaba en los días 0 y 2 de CIV, éste provocaba un mayor estrés oxidativo intracelular (84). Cabe recordar que las ROS inducen roturas de las cadenas de DNA y se ha visto que dichas roturas provocan la detención del desarrollo embrionario. Además, el estrés oxidativo también está estrechamente relacionada con la

apoptosis. De hecho, en previos estudios se ha demostrado que los embriones cultivados bajo una mayor concentración de oxígeno muestran un aumento del estado oxidativo intracelular y una disminución de su desarrollo (133). Volviendo al estudio de Sakatani y cols. (2004), este estudio proporciona la evidencia de que la etapa embrionaria temprana, es decir, previa al estadio de 8 células, es el momento en el que los embriones preimplantacionales bovinos son más susceptibles al ET (84).

Además, Sakatani y cols. (2004) también evaluaron el efecto del ET (41°C/ 6 h), en los niveles de peróxido de hidrógeno, concretamente cuando el ET era aplicado en el proceso de FIV. Estos autores observaron que los cigotos resultantes de la fecundación llevada a cabo bajo condiciones de ET presentaban mayores niveles de peróxido de hidrógeno. Este resultado, al igual que el estudio realizado por Amaral y cols. (2020) (77), sugiere que una temperatura elevada concretamente durante la fecundación, también induce un estrés oxidativo en los cigotos, que puede afectar negativamente al ADN o a otros orgánulos y repercutir en el desarrollo del embrión en su fase inicial (80).

Teniendo en cuenta el aumento de ROS observado en los embriones, Amaral y cols. (2020) evaluaron el efecto del ET (40,5°C/6 h) en la expresión génica de enzimas antioxidantes, genes relacionados con la supervivencia celular y genes relacionados con el estrés celular. En este estudio, la expresión génica de genes relacionados con el sistema antioxidante como SOD1, GPX4 y NRF2 no se vio afectada por el ET, mientras que la expresión de SOD2 y CAT disminuyó y la expresión de GPX1 aumentó. Estos resultados junto a los resultados previamente descritos muestran el desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad antioxidante de las células, caracterizando el estrés oxidativo que sufren los embriones (77).

Por el contrario, Stamperna y cols. (2020) cuando evaluaron la influencia de madurar los ovocitos bajo condiciones de ET (41°C/6 h) en la expresión génica de GPX1, entre otros genes antioxidantes en los blastocistos, observaron que el ET provocaba una disminución de la expresión del mismo. Aunque este resultado contradice a lo observado por Amaral y cols. (2020), donde vieron un incremento de expresión de este mismo gen, los dos estudios llegan a la conclusión de que los blastocistos provenientes de ovocitos madurados bajo condiciones de ET tienen una protección antioxidante más débil en

comparación con los controles, ya que la expresión de genes relacionados con la actividad antioxidante o se reduce o no cambia en respuesta al ET (77,78).

Por otro lado, la expresión de genes relacionados con la supervivencia celular (AKT y XIAP) no se vio afectada por el ET (40,5°C/6 h) en el estudio llevado a cabo por Amaral y cols. (2020), por lo tanto, esto sugiere que la viabilidad de los blastocistos no se ve afectada cuando el ET se mantiene durante 6 horas en la maduración de los ovocitos, la fecundación y/o en el primer día de cultivo (77).

Por el contrario, cuando estos mismos autores evaluaron el efecto del ET en genes relacionados con el estrés celular en las distintas etapas de la producción embrionaria, observaron que el ET aumentaba la expresión de HSPA1A en todos los grupos (77). De la misma forma, Sakatani y cols. (2014) evaluaron el efecto de someter a los ovocitos al ET (41°C/6 h) en el proceso concreto de la FIV en la expresión de HSPA1A en los embriones resultantes y observaron que los embriones presentaban mayores niveles de dicho transcrito (80). Está descrito que la inducción de HSPA1A es un marcador de estrés celular, daño al ADN y apoptosis, por lo que, las respuestas inducidas por el ET en los ovocitos y los embriones tempranos también pueden influir en la apoptosis y la competencia embrionaria (95).

Así mismo, Almeida y cols. (2019) también evaluaron la expresión de distintos genes que codifican proteínas asociados al ET como HSP40, bajo condiciones de ET (41,5°C/12 h) en embriones tempranos, con el fin de asociar el ET durante la MIV en la expresión génica de embriones de 8 células. Estos autores observaron que había menores niveles de HSP40 en embriones derivados de ovocitos sometidos al ET, lo que sugiere que el ET durante la maduración de los ovocitos puede perturbar la expresión de algunos genes en embriones de 8 células (82). La HSP40 es una co-chaperona con un papel importante en la protección de las células en condiciones de estrés y las alteraciones en su expresión pueden perjudicar el desarrollo embrionario cuando éste se lleva a cabo en un entorno subóptimo (134,135). Sin embargo, estos autores sugieren que las alteraciones en la expresión génica causadas por el ET durante la MIV pueden no ser específicas de un gen, suponiendo que dichas alteraciones se deban a una alteración aleatoria en la remodelación de la cromatina. Ésta puede ser una de las razones por las que algunos embriones en fase temprana alcanzan la fase de blastocisto, mientras que otros no lo

hacen, dependiendo de los genes que se vean afectados por la aberrante remodelación de la cromatina (82).

Por otro lado, Amaral y cols. (2020) evaluaron si el ET antes de la AGE afectaba a la expresión génica y proteica de IFNT y observaron que se producía una disminución tanto a nivel génico, como proteico de IFNT en embriones de 7 días. Cabe recordar que el IFNT es producido por las células trofoblásticas y que es esencial para el reconocimiento materno de la gestación (136), siendo un buen marcador de la salud embrionaria (137).

Además, Pavani y cols. (2016) observaron una menor expresión de Cx43 en embriones de 4 células y mórulas provenientes de ovocitos recogidos bajo condiciones de ET, mientras que cuando los ovocitos eran madurados *in vitro* en condiciones de ET, la expresión de Cx43 difería dependiendo del estadio embrionario y la magnitud del ET (71). Cabe destacar que el gen Cx43 está relacionado con la alteración de estructuras intracelulares y, según estudios previos, la menor expresión de Cx43 refleja la baja calidad de los embriones provenientes de ovocitos con baja competencia de desarrollo (138).

Así mismo, Sakatani y cols. (2014) evaluaron el efecto de someter a los ovocitos al ET (41°C/6 h) en el proceso de FIV en la expresión de UCHL1 en los embriones resultantes y observaron que los embriones presentaban menores niveles de dicho transcrito (80). UCHL1 es una tiol-proteasa que reside en la región cortical y subcortical de los ovocitos bovinos, donde se ha visto que participa en la prevención de la poliespermia (139), por lo tanto, las mayores tasas de poliespermia asociadas a las altas temperaturas durante la fecundación podrían ser una consecuencia de la disminución de los niveles de UCHL1 (80).

Igualmente, Gendelman y cols. (2012) examinaron el efecto del ET en ovocitos desarrollados *in vivo* en la expresión génica de GDF9 y POU5F1, en los embriones resultantes. La variación estacional más destacada observada en este estudio fue la reducida expresión de POU5F1 a lo largo de todas las etapas embrionarias (69). En los bovinos, el nivel de transcripción de POU5F1 se caracteriza por una alta expresión en los ovocitos inmaduros hasta el estadio de 4 células, seguida de una regulación a la baja en el estadio de 8 células hasta la mórula, y una expresión relativamente alta en el estadio de

blastocisto (140). Se ha demostrado que el nivel de transcripción de POU5F1 es mayor en los ovocitos y embriones competentes (141); por lo tanto, los embriones que se desarrollan durante la estación cálida y expresan niveles bajos de POU5F1 podrían considerarse de calidad inferior (69).

Además, la expresión de GDF9 en los embriones de 4 células desarrollados a partir de ovocitos recogidos en la estación cálida fue relativamente alta, lo que sugiere un retraso en la disminución de los niveles de GDF9, que generalmente se espera que ocurra en esta etapa de desarrollo embrionario (142). Este hecho indica una posible alteración de la competencia de desarrollo de estos embriones y podría explicar, en parte, la reducida proporción de blastocistos desarrollados durante la estación cálida (69).

Por otro lado, Yamanaka y cols. (2018), evaluaron el efecto del ET en el proceso de FIV (40°C/6 h) y CIV (40°C/20 h) de embriones, sobre la actividad de la CTSB en los mismos (75). La CTSB es una cisteína proteasa lisosomal que desempeña un papel importante en la degradación de las proteínas intracelulares en el lisosoma (143). Su actividad también se ha relacionado con cambios en la competencia embrionaria, ya que, su elevada actividad provoca una disminución significativa de las tasas de desarrollo *in vitro* y un aumento de la apoptosis (144,145). Estos autores observaron que el ET provocaba un aumento de la actividad de CTSB en los embriones, siendo este aumento mayor cuando el ET se aplicaba en la etapa de CIV. Así mismo, observaron que la suplementación del medio con un inhibidor de CTSB (E-64) mejoraba la competencia de desarrollo de los embriones sometidos a ET. Estos resultados sugieren que la CTSB compromete la competencia de desarrollo de los embriones bovinos en condiciones de ET (75).

Además, Payton y cols. (2018) evaluaron si el efecto del ET (41°C/12 h) en el proceso de MIV en los niveles de ATP del ovocito se trasladaban a los embriones resultantes y observaron que los niveles aumentados de ATP hallados en los ovocitos persistían en los embriones tempranos de 8-16 células. Sin embargo, el contenido de ATP era similar en los embriones en fase de blastocisto procedentes de ovocitos sometidos a ET y no sometidos. La falta de diferencias detectables en este estadio embrionario podría deberse a que los embriones con un contenido de ATP alterado no llegan a este estadio (79). Estos resultados indican que la exposición directa de los ovocitos en su maduración

al ET puede alterar los procesos/funciones mitocondriales de los ovocitos, que son heredados por el embrión temprano tras la fecundación (79), lo cual puede ser suficiente para alterar el posterior desarrollo fetal y placentario (146).

Por último, Souza y cols. (2021) evaluaron si el ET (41°C/12 h) en la MIV de ovocitos alteraba la abundancia de micro ARNs (miARNs) y expresión de DROSHA en los embriones resultantes. Estos autores hallaron que el ET provocaba el aumento de bta-miR-19b en dichos embriones, mientras que provocaba la disminución de DROSHA (70).

Los miARNs son una de las clases más importantes de ARN no codificantes y afectan a los niveles de traducción de proteínas de los ARNm objetivo sin modificar su secuencia de nucleótidos (147). En el bovino, se ha visto que el miARN-19b tiene como objetivo los genes HSPBAP1 y DNAJB1 (148), que participan en la respuesta celular al estrés (149). Teniendo en cuenta que la termotolerancia se debe en parte a mecanismos de desarrollo que evitan la acumulación de proteínas desnaturalizadas y el daño por estrés oxidativo (150), las alteraciones en la regulación de la síntesis de estas proteínas podrían tener impactos significativos en la viabilidad del embrión. Por este motivo, el aumento de la abundancia de bta-miR-19b podría estar asociado a una desregulación de la respuesta al estrés celular, que puede afectar al desarrollo temprano del embrión hacia las fases de blastocisto (70).

Por otro lado, DROSHA es un enzima esencial en la vía canónica de la biogénesis de miARNs (147). Una disminución de la abundancia de transcritos en esos embriones de 8 células podría reflejar la reducción de la cantidad de enzima DROSHA disponible para las etapas posteriores del embrión y la consiguiente alteración de la homeostasis del entorno global de miARNs y cambios en las complejas vías y redes de expresión génica controladas por miARNs (70).

En la **Figura 15** se puede ver el resumen de las alteraciones que se pueden producir durante el desarrollo embrionario por la influencia del ET a nivel molecular, tanto a nivel genético y epigenético, como a nivel de transcritos y proteínas en los embriones, según los autores mencionados anteriormente.

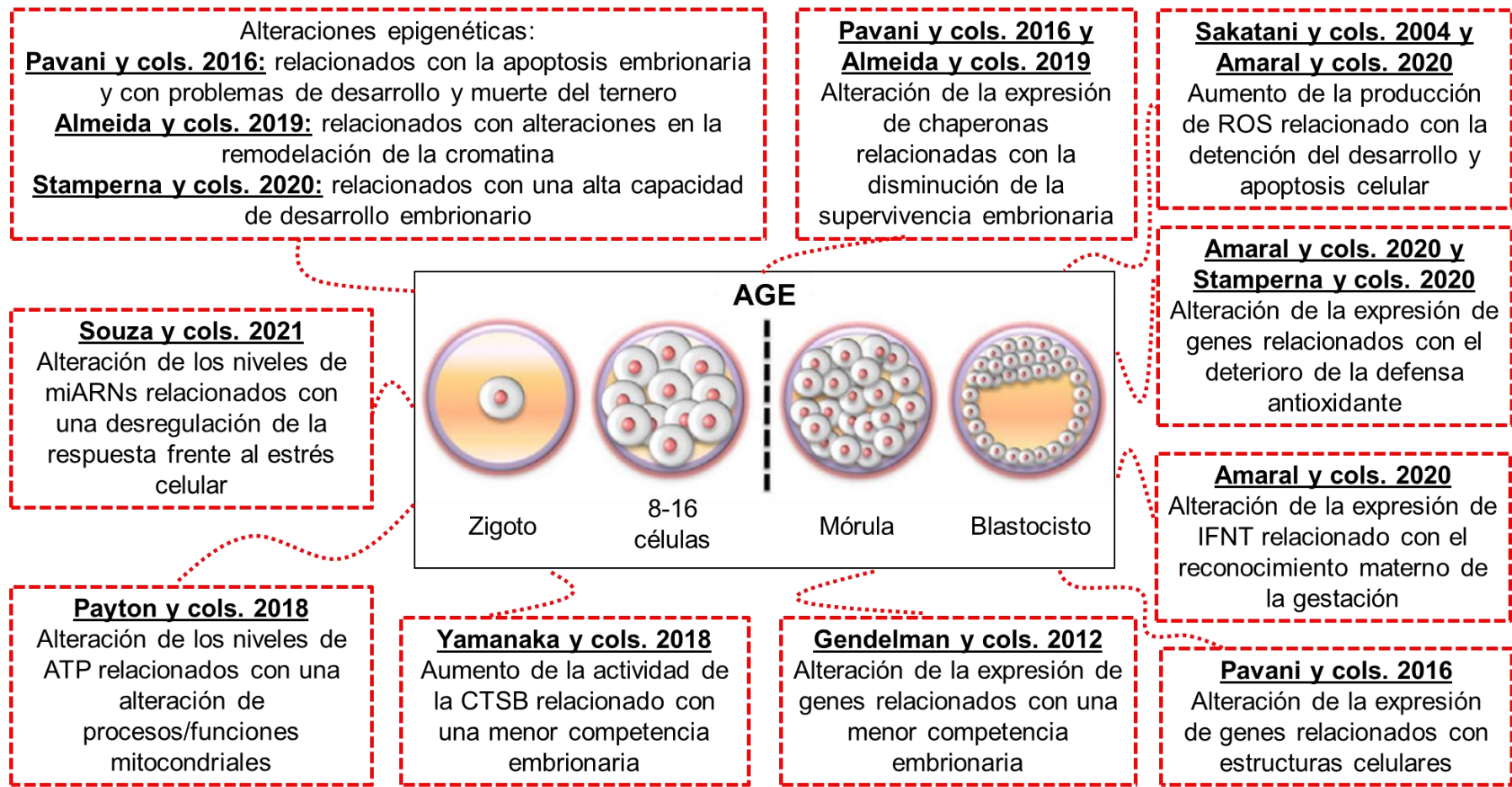


Figura 15. Resumen de las alteraciones producidas en los embriones por los efectos del ET a nivel molecular durante el desarrollo embrionario según los estudios seleccionados para esta revisión sistemática. Fuente: Imagen adaptada de Naranjo-Gómez y cols., 2021 (165).

En definitiva, los genes y/o moléculas diana de los estudios previamente mencionados son muy dispares, lo cual dificulta su interpretación. No obstante, se puede llegar a la conclusión de que el ET, por causa de su acción múltiple a nivel molecular, induce alteraciones tanto en los ovocitos, como en los embriones y que, además, los efectos del ET durante el desarrollo ovocitario afectan posteriormente a la competencia embrionaria. De esta forma, el conjunto de estos estudios evidencia que la transferencia de embriones competentes producidos *in vivo* en épocas en las que la vaca no esté sometida a ET o *in vitro* en condiciones óptimas de MIV, FIV y CIV podría ser una solución para sobrepasar los efectos negativos que el ET provoca tanto en ovocitos, como en embriones tempranos.

6.2. Empleo de embriones como opción terapéutica en el SVR

Las VRs son uno de los mayores problemas en las explotaciones ganaderas de vacuno de leche (30). Como se ha mencionado anteriormente, la definición más simplista del SVR es la vaca que no ha quedado gestante después de haberse inseminado 3 o más veces. Sin embargo, esta definición se debe limitar a los animales que tienen menos de 10 años y han tenido al menos un parto, con ciclos sexuales regulares, sin trastornos clínicos en los órganos genitales y con ausencia de descargas anormales, pero que sin embargo, no quedan gestantes después de aparearse con un toro fértil o inseminarse artificialmente 3 o más veces (85).

Como se ha mencionado en la introducción, el ET es uno de los principales causantes de la aparición de este síndrome durante los meses en los que la vaca está expuesta a altas temperaturas ambientales. La disminución de la fertilidad asociada al ET es un problema multifactorial, en la que la hipertermia afecta a la función celular en varios tejidos del aparato reproductor femenino. El ET estival compromete la dinámica folicular ovárica y la capacidad del folículo dominante para ejercer su dominio. Además, induce la codominancia folicular y disminuye la duración del ciclo estral, así como la competencia del ovocito para desarrollarse en un blastocisto (36).

Además, es probable que los efectos inhibidores del ET sobre la producción y la fertilidad aumenten en los próximos años, ya que las mejoras genéticas para la producción de leche provocan un aumento de la generación de calor por parte de la vaca, dificultando la regulación de la temperatura corporal durante los periodos de ET. Por otro lado, el

cambio climático global también podría exacerbar el problema del ET. Por este motivo, es esencial la búsqueda de distintas estrategias que mitiguen los efectos negativos de la hipertermia materna en la función reproductiva de las vacas (151).

Una de las estrategias planteadas para mitigar el efecto del ET y reducir la aparición de VRs es la utilización de la técnica de la TE. La base para el uso de esta técnica es que los principales efectos nocivos de la hipertermia sobre la fertilidad se producen en los ovocitos durante su desarrollo en el ovario y en los embriones en fase de escisión/clivaje, como se ha demostrado en los apartados anteriores. Además, en el momento en el que los embriones son transferidos a la vaca, éstos se encuentran en estadio de mórula o blastocisto, los cuales son mucho más resistentes a las altas temperaturas (59,60).

Con el fin de demostrar si la TE es una técnica que permite mejorar la tasa de gestación en VRs, Say y cols. (2021) compararon la tasa de preñez obtenida tras la técnica de la TE con embriones frescos producidos *in vivo* en vacas control y VRs. La tasa de preñez el día 35 de gestación fue significativamente mayor para el grupo control (50%) en comparación con el grupo de VRs (35,5%) tras la TE (85). Sin embargo, hay que tener en cuenta que las VRs son vacas que no han logrado quedarse preñadas con 3 o más inseminaciones, por lo que es muy difícil que estos animales lleguen a concebir con la técnica de la IA. De hecho, hay estudios que han logrado tasas de preñez, como máximo del 18,75% (152) y 20% (153) en VRs tras llevar a cabo la IA. Por esta razón, la técnica de la TE parece ser una alternativa útil y adecuada para el tratamiento de este síndrome y mejorar las tasas de gestación en estas vacas (85).

Cabe destacar que en el estudio anterior utilizaron embriones frescos producidos *in vivo* para llevar a cabo la técnica de la TE. Sin embargo, para la generalización de esta técnica la criopreservación de embriones es una cuestión fundamental (154). Existen dos procedimientos principales para la criopreservación de embriones bovinos: la congelación/descongelación y la vitrificación/desvitrificación. Por lo tanto, mejorar la supervivencia después de estos dos procedimientos es uno de los principales objetivos de la tecnología de embriones bovinos (155).

Según los datos de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS) en 2017, la congelación lenta se empleó en aproximadamente en el 60% de los embriones

bovinos criopreservados *in vivo* y en el 34% de los embriones bovinos producidos *in vitro* a lo largo de todo el mundo (156).

Así pues, Son y cols. (2007) evaluaron la tasa de preñez tras un protocolo de transferencia embrionaria a tiempo fijo (TETF) con embriones producidos *in vivo* y criopreservados mediante congelación lenta, en comparación con la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) e inseminación artificial tras la detección del estro (IAE) en VRs lactantes. La tasa de preñez el día 60 de gestación fue significativamente mayor en el grupo TETF (53,8%) que en los grupos IAE (18,5%) y IATF (7,7%) (87). Este resultado indica que la inducción de una ovulación a tiempo fijo y la formación concomitante del CL por sí solas no son suficientes para aumentar la tasa de preñez, lo que sugiere la necesidad de la provisión adicional de un embrión viable para aumentar la fertilidad de las VRs. De esta forma, la técnica de la TE supera algunos de los problemas relacionados con la maduración de los ovocitos, la fecundación y el desarrollo temprano del embrión y el paso del embrión al útero en las VRs (87).

La eficacia del protocolo de TETF se basa en dos factores. En primer lugar, la TETF evita las pérdidas gestacionales debidas a los efectos del ET sobre el ovocito y el embrión temprano, ya que, como se ha mencionado anteriormente, parte de la disminución de la fertilidad asociada al ET se debe a daños en el ovocito (61,64,67), o en el embrión antes del día 3 después de la fertilización (75,77,79). Así pues, un embrión de buena o excelente calidad transferido en el día 7 ya ha superado los posibles efectos nocivos del ET durante el desarrollo del ovocito o del embrión temprano (86). En segundo lugar, la TETF evita la elevada tasa de celos no detectados que se produce durante el ET (55), ya que mediante el protocolo OvSynch se consigue un alto grado de sincronía, el cual permite llevar a cabo la TE sin necesidad de detección del celo (86).

Sin embargo, una de las limitaciones para el uso generalizado de la técnica de la TE para aumentar las tasas de preñez en vacas lecheras lactantes durante el ET es el alto coste de la producción de embriones *in vivo* mediante el proceso de superovulación o por recuperación transvaginal de ovocitos y su fertilización *in vitro*. Por este motivo, los embriones producidos *in vitro* utilizando ovocitos recuperados de ovarios de matadero pueden proporcionar una fuente económica de embriones (86).

Siguiendo en esta línea, Stewart y cols. (2011) evaluaron si la técnica de TE con embriones frescos (TE-F) o vitrificados (TE-V) producidos *in vitro* mejoraba las tasas de preñez y de parto de las vacas lecheras lactantes en verano en comparación con la técnica de la IA. El día 40 ± 7 de gestación, el porcentaje de vacas preñadas fue significativamente mayor en el grupo TE-F (42,1%) que en el de la TE-V (29,3%) y en el de la IA (18,3%), al igual que el día 97 ± 7 de gestación, en el que el porcentaje de vacas preñadas fue significativamente mayor para los grupos TE-F (36,4%) y TE-V (25,7 %) que para el grupo de IA (17,0%), siendo el porcentaje para el grupo TE-F mayor que para el grupo TE-V. Además, el porcentaje de vacas con nacidos vivos fue significativamente mayor en el grupo TE-F (27,5 %) que en el grupo TE-V (17,1%) y en el de IA (14,6%). Por lo tanto, la utilización de la técnica de TE-F es una forma eficaz para aumentar drásticamente el porcentaje de vacas que paren una novilla viva en comparación con la IA (88).

Además, en este estudio se utilizó semen sexado para fertilizar a los ovocitos y generar así embriones hembras *in vitro*. El uso de semen sexado para la producción de embriones representa una estrategia para superar la tendencia de sexo masculino que suele observarse en los embriones producidos de esta forma. Según los resultados previamente comentados, el uso de semen sexado para producir embriones *in vitro* parece ser una forma eficaz para superar dicho sesgo (88).

Se conoce que los embriones producidos *in vitro* son sensibles a la criopreservación, ya que en previos estudios se ha visto que los embriones vitrificados tienen una fertilidad disminuida en comparación con los embriones frescos (157). De hecho, aunque en el estudio llevado a cabo por Stewart y cols. (2011) existía una tendencia a que el porcentaje de vacas preñadas en el día 40 ± 7 de gestación fuera mayor para el grupo de TE-V que para el de IA, no existían diferencias entre estos dos grupos en el porcentaje de vacas preñadas en el día 97 ± 7 de gestación, ni en el porcentaje de vacas que llegaban a parir (88).

Así mismo, Al-Katanani y cols. (2002) evaluaron la tasa de preñez de vacas lecheras sometidas a ET tras un protocolo de TETF, tanto con embriones frescos, como con embriones vitrificados producidos *in vitro* en comparación con la IATF. La tasa de preñez en el día 45 de gestación fue significativamente mayor en el grupo de TE-F ($19 \pm 5,0\%$) que en los grupos de IATF ($6,2 \pm 3,6\%$) y TE-V ($6,5 \pm 4,1\%$) (86). Al igual que lo observado

por Stewart y cols. (2011), estos resultados indican que la TETF con embriones frescos producidos *in vitro* puede mejorar la fertilidad en vacas lecheras en condiciones de ET en comparación con las tasas de preñez logradas con la IATF (86,88).

Cabe mencionar que en ninguno de los anteriores estudios que han llevado a cabo la técnica de la TE con embriones producidos *in vitro* vitrificados han obtenido buenos resultados (86,88). Esto puede deberse a la utilización de altas concentraciones de crioprotectores para llevar a cabo el proceso de vitrificación, que pueden causar un shock osmótico y afectar a la supervivencia del embrión (158).

Sin embargo, en ninguno de los estudios anteriores se han utilizado embriones producidos *in vitro* criopreservados mediante congelación lenta, por lo que se desconoce si este procedimiento podría o no mejorar el éxito reproductivo de las VRs. No obstante, en el único estudio que ha utilizado embriones criopreservados mediante congelación lenta, se han obtenido muy buenos resultados en comparación a la técnica de la IATF, aunque en este caso, los embriones criopreservados fueron producidos *in vivo* (87), los cuales son más resistentes a la criopreservación, probablemente debido a las diferentes proporciones de lípidos y proteínas en estos dos tipos de embriones (154).

Es preciso destacar la importancia de mejorar el rendimiento de la técnica de la criopreservación mediante la congelación lenta, ya que este tipo de embriones son los más adecuados para poder generalizar el uso de embriones como opción terapéutica en VRs. Con los embriones criopreservados mediante congelación lenta se puede realizar una transferencia directa (TD), sin necesidad de llevar a cabo ningún tipo de procedimiento intermedio, mientras que los embriones vitrificados tienen que volver a expandirse en soluciones de desvitrificación antes de que se puedan transferir a las receptoras, lo que hace que el proceso de transferencia sea más largo y complicado cuando se trabaja en condiciones de campo (159).

Por este motivo, el Centro de Biotecnología Animal-SERIDA y la Cooperativa de Usuarios y Agricultores de Gijón (y dentro de la misma AsturBiotech, empresa de biotecnología especializada en la FIV animal), han analizado un nuevo procedimiento de congelación/descongelación de embriones producidos *in vitro*, con el fin de llevar a cabo la TD de estos embriones (155).

Este nuevo procedimiento consiste, por un lado, en una modificación del sistema de criopreservación descrita por Sanches y cols. (2016) (160), ya que se realiza un único paso de siembra para la inducción de la nucleación del hielo (en lugar de dos) y una distribución de las columnas de crioprotector diferente, con una primera columna más larga en las pajuelas donde se cargan los embriones (en lugar de una distribución homogénea); en segundo lugar, en la utilización de un medio sintético de fluido oviductal (SOF) sin proteínas, ya que se ha demostrado que se obtienen embriones con mayor supervivencia, una reducción de abortos espontáneos y mayores tasas de nacimientos (161,162); y en tercer lugar, la sustitución de suplementos proteicos presentes en las soluciones crioprotectoras (normalmente de origen animal), por un compuesto sintético (CRYO3), puesto que se ha visto que mejora la supervivencia de los embriones producidos *in vitro* a la congelación respecto a la albúmina sérica bovina (BSA) (163). Los embriones congelados con este nuevo procedimiento de congelación lenta y después de realizar una TD dieron lugar a tasas similares de gestación que con la transferencia de embriones frescos, lo cual supone un gran avance a la hora de plantear el uso de embriones producidos *in vitro* como opción terapéutica para el SVRs. Los resultados de este estudio están publicados en un artículo reciente del año 2020 (155).

7. CONCLUSIONES

Como resultado del presente Trabajo de Fin de Máster se obtienen las siguientes conclusiones:

1. El ET tiene graves consecuencias a nivel celular/molecular, tanto en ovocitos, como en embriones bovinos. Además, los efectos deletéreos producidos en los ovocitos durante su proceso de maduración persisten en el desarrollo embrionario posterior.
2. A nivel celular, el ET provoca alteraciones tanto en el núcleo, citoplasma y membrana plasmática de los ovocitos y embriones tempranos, como en las células del cúmulo que rodean a los ovocitos.
3. A nivel molecular, el ET afecta a procesos epigenéticos y a la expresión de múltiples genes, transcritos y proteínas, tanto en ovocitos, como en embriones tempranos. Muchos de ellos están relacionados con procesos mitocondriales, procesos apoptóticos, defensa antioxidante, supervivencia celular y respuesta de los ovocitos y embriones frente al ET.
4. Aunque la técnica de la TE en VRs no iguala los índices reproductivos obtenidos en vacas sanas, parece ser una alternativa útil para el tratamiento del SVR, ya que se consiguen mejorar de forma significativa las tasas de gestación en estas vacas problemáticas, sobre todo, cuando se transfieren embriones frescos.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta revisión sistemática ofrece una visión global de las estructuras, procesos y expresión de genes que pueden verse afectados por el ET, por lo que podría suponer un punto de partida para el comienzo de nuevos estudios. Los futuros estudios podrían dirigirse a analizar la posible utilización de distintos compuestos durante la MIV, FIV y/o CIV de embriones para mejorar su competencia. Por ejemplo, antioxidantes, compuestos que inhiban a distintos niveles la vía apoptótica, compuestos dirigidos a genes concretos implicados en el deterioro ovocitario y/o embrionario, compuestos dirigidos a restaurar la funcionalidad mitocondrial, etc. De esta forma, se podrían reducir los efectos adversos que el ET produce a distintos niveles en la calidad ovocitaria durante su desarrollo folicular *in vivo* y producir así embriones competentes para su posterior transferencia.

Por otro lado, es necesario realizar más estudios que analicen los resultados obtenidos con la técnica de la TE en VRs o vacas sometidas a ET para poder hacer una determinación más firme de los beneficios que obtendrían los ganaderos si implementasen esta técnica como rutina diaria en estas vacas problemáticas. Además, también es necesario mejorar los procedimientos de congelación/descongelación de embriones producidos *in vitro*, como ya han conseguido el Centro de Biotecnología Animal-SERIDA y la Cooperativa de Usuarios y Agricultores de Gijón, con el objetivo de posibilitar la TD de los mismos, convirtiéndose así en un proceso rentable para los ganaderos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parish J. The Estrous Cycle of Cattle. Mississippi State Univ. 2016;1-8.
2. Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci.* 2011;124(3-4):163-9.
3. Carvajal AM, Martínez ME, Tapia M. El ciclo estral en la hembra bovina y su importancia productiva. *Inst Investig Agropecu.* 2020;246:1-4.
4. Crowe M, Mullen M. Regulation and Function of Gonadotropins Throughout the Bovine Oestrous Cycle. En: *Gonadotropin.* 2013. p. 1-12.
5. Colazo MG, Mapletoft R. Fisiología del ciclo estral bovino. *Rev Ciencias Vet.* 2014;16(2):31-46.
6. Clarke IJ. Interface between metabolic balance and reproduction in ruminants: Focus on the hypothalamus and pituitary. *Horm Behav.* 2014;66(1):15-40.
7. Hernández Cerón J. Fisiología Clínica de la Reproducción de Bovinos Lecheros. 1.^a ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2016. 1-87 p.
8. Stevenson JS, Pulley SL. Feedback effects of estradiol and progesterone on ovulation and fertility of dairy cows after gonadotropin-releasing hormone-induced release of luteinizing hormone. *J Dairy Sci.* 2016;99(4):3003-15.
9. Peter AT, Levine H, Drost M, Bergfelt DR. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology.* 2009;71(9):1343-57.
10. Guáqueta H. Ciclo estral: fisiología básica y estrategias para mejorar la detección de celos. *Rev la Fac Med Vet y Zootec.* 2009;56(3):163-83.
11. Atuesta JE, Gonella Diaza A. Control hormonal del ciclo estral en bovinos y ovinos. *Rev Spei Domus.* 2011;7(14):15-25.
12. Fesseha H, Degu T. Estrus detection, estrus synchronization in cattle and its economic importance. *Int J Vet Res.* 2020;3(1):1-8.
13. Seneda MM, Delchiaro SB, Zangirolamo AF, Alfieri AA, Morotti F. Folliculogenesis, Fertility and Biotechnology in Dairy Cattle. En: *New Advances*

- in the Dairy Industry. 2021. p. 1-18.
14. Crowe MA. Reproduction, Events and Management: Estrous Cycles: Characteristics. *Encycl Dairy Sci.* 2022;948-53.
 15. Lamb GC, Smith MF, Perry GA, Atkins JA, Risley ME, Busch DC, et al. Reproductive Endocrinology and Hormonal Control of the Estrous Cycle. *Bov Pract.* 2010;44(1):18-26.
 16. Edwards JL, Saxton AM, Lawrence JL, Payton RR, Dunlap JR. Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens in vitro maturation in bovine oocytes. *J Dairy Sci.* 2005;88(12):4326-33.
 17. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles F V., Ferriani RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology.* 2009;71(5):836-48.
 18. Meirelles F V., Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF, Merighe GK, et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:13-20.
 19. Hosoe M, Shioya Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote.* 1997;5(4):371-6.
 20. Conner S, Leaf D, Wessel G. Members of the SNARE hypothesis are associated with cortical granule exocytosis in the sea urchin egg. *Mol Reprod Dev.* 1997;48(1):106-18.
 21. Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology.* 2001;55(6):1241-54.
 22. Maillo V, Gaora PÓ, Forde N, Besenfelder U, Havlicek V, Burns GW, et al. Oviduct-Embryo Interactions in Cattle: Two-Way Traffic or a One-Way Street? *Biol Reprod.* 2015;92(6):1-8.
 23. Valadão L, Moreira da Silva H, Moreira da Silva F. Bovine Embryonic Development to Implantation. En: *Embryology - Theory and Practice.* 2019. p. 1-

- 10.
24. Lonergan P, Fair T, Forde N, Rizos D. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*. 2016;86(1):270-7.
 25. Bai H, Sakurai T, Godkin JD, Imakawa K. Expression and Potential Role of GATA Factors in Trophoblast Development. *J Reprod Dev*. 2013;59(1):1-6.
 26. Lonergan P, Forde N. Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation of pregnancy in cattle. *Animal*. 2014;8(s1):64-9.
 27. Lonergan P, Sánchez JM. Symposium review: Progesterone effects on early embryo development in cattle. *J Dairy Sci*. 2020;103(9):1-10.
 28. Yusuf M, Nakao T, Ranasinghe RBK, Gautam G, Long ST, Yoshida C, et al. Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. *Theriogenology*. junio de 2010;73(9):1220-9.
 29. Jaureguiberry M, Madoz L V., de la Sota RL. Actualización en el síndrome de vaca repetidora. *Taurus*. 2015;17(65):14-9.
 30. Nowicki A. Embryo transfer as an option to improve fertility in repeat breeder dairy cows. *J Vet Res*. 2021;65(2):231-7.
 31. El-Tarabany MS, Al-Marakby KM. Effect of synchronization protocols on reproductive indices, progesterone profile and fertility under subtropical environmental conditions in repeat breeder Holstein cows. *Reprod Domest Anim*. 2019;54(2):234-42.
 32. Sartori R, Bastos MR, Wiltbank MC. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reprod Fertil Dev*. 2010;22(1):151.
 33. Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 2011;123(3-4):127-38.
 34. Kurykin J, Waldmann A, Tiirats T, Kaart T, Jaakma Ü. Morphological Quality of Oocytes and Blood Plasma Metabolites in Repeat Breeding and Early Lactation Dairy Cows. *Reprod Domest Anim*. 2011;46(2):253-60.
 35. Kafi M, Azari M, Chashnigir O, Gharibzadeh S, Aghabozorgi Z, Asaadi A, et al.

- Inherent inferior quality of follicular fluid in repeat breeder heifers as evidenced by low rates of in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. 2017;102:29-34.
36. Ferreira RM, Ayres H, Chiaratti MR, Ferraz ML, Araújo AB, Rodrigues CA, et al. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *J Dairy Sci*. 2011;94(5):2383-92.
 37. Sood P, Zachut M, Dekel I, Dube H, Jacoby S, Moallem U. Preovulatory follicle characteristics and oocyte competence in repeat breeder dairy cows. *J Dairy Sci*. 2017;100(11):9372-81.
 38. Humblot P. Monitor Pregnancy and Determine the Timing , Frequencies and Sources of Embryonic Mortality in Ruminants. *Theriogenology*. 2001;56:1417-33.
 39. Diskin MG, Morris DG. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reprod Domest Anim*. 2008;43(S.2):260-7.
 40. Diskin MG, Parr MH, Morris DG. Embryo death in cattle: An update. *Reprod Fertil Dev*. 2012;24(1):244-51.
 41. Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci*. 2002;85(11):2803-12.
 42. Katagiri S, Moriyoshi M. Alteration of the endometrial EGF profile as a potential mechanism connecting the alterations in the ovarian steroid hormone profile to embryonic loss in repeat breeders and high-producing cows. *J Reprod Dev*. 2013;59(5):415-20.
 43. Souza AH, Narciso CD, Batista EOS, Carvalho PD, Wiltbank MC. Effect of uterine environment on embryo production and fertility in cows. *Anim Reprod*. 2014;11(3):159-67.
 44. Silva CF, Sartorelli ES, Castilho ACS, Satrapa RA, Puelker RZ, Razza EM, et al. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. *Theriogenology*. 2013;79(2):351-7.

45. Wiltbank M, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gümen A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*. 2006;65(1):17-29.
46. Leroy JLMR, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IGF, Bols PEJ. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod Domest Anim*. 2008;43(5):612-22.
47. Ferreira RM, Chiaratti MR, Macabelli CH, Rodrigues CA, Ferraz ML, Watanabe YF, et al. The infertility of repeat-breeder cows during summer is associated with decreased mitochondrial dna and increased expression of mitochondrial and apoptotic genes in oocytes. *Biol Reprod*. 2016;94(3):1-10.
48. Hansen PJ. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology*. 2007;68S(S.1):S242-9.
49. Bragança LG, Zangirolamo AF. Strategies for increasing fertility in high productivity dairy herds. *Anim Reprod*. 2018;15(3):256-60.
50. Wakayo BU, Brar PS, Prabhakar S. Review on mechanisms of dairy summer infertility and implications for hormonal intervention. *Open Vet J*. 2015;5(1):6-10.
51. Dash S, Chakravarty AK, Singh A, Upadhyay A, Singh M, Yousuf S. Effect of heat stress on reproductive performances of dairy cattle and buffaloes: A review. *Vet World*. 2016;9(3):235-44.
52. Sammad A, Umer S, Shi R, Zhu H, Zhao X, Wang Y. Dairy cow reproduction under the influence of heat stress. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2020;104(4):978-86.
53. Basiricò L, Morera P, Primi V, Lacetera N, Nardone A, Bernabucci U. Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. *Cell Stress Chaperones*. 2011;16(4):441-8.
54. Kumar S, Kumar A, Kataria M. Effect of Heat Stress in Tropical livestock and different Strategies for its Amelioration. *J Stress Physiol Biochem*. 2011;7(1):45-

- 54.
55. Abdelatty AM, Iwaniuk ME, Potts SB, Gad A. Influence of maternal nutrition and heat stress on bovine oocyte and embryo development. *Int J Vet Sci Med.* 2018;6(S1):S1-5.
56. Roth Z. Effect of Heat Stress on Reproduction in Dairy Cows: Insights into the Cellular and Molecular Responses of the Oocyte. *Annu Rev Anim Biosci.* 2017;5(1):151-70.
57. Hansen P. Cellular and molecular basis of therapies to ameliorate effects of heat stress on embryonic development in cattle. *Anim Reprod.* 2013;10(3):322-33.
58. Ahmad Para I, Ahmad Dar P, Ahmad Malla B, Punetha M, Rautela A, Maqbool I, et al. Impact of heat stress on the reproduction of farm animals and strategies to ameliorate it. *Biol Rhythm Res.* 2020;51(4):616-32.
59. Hansen PJ. Reproductive physiology of the heat-stressed dairy cow: implications for fertility and assisted reproduction. *Anim Reprod.* 2019;16(3):497-507.
60. Baruselli PS, Ferreira RM, Vieira LM, Souza AH, Bó GA, Rodrigues CA. Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. *Theriogenology.* 2020;155:1-11.
61. Ahmed JA, Nashiruddullah N, Dutta D, Biswas RK, Borah P. Cumulus cell expansion and ultrastructural changes in in vitro matured bovine oocytes under heat stress. *Iran J Vet Res.* 2017;18(3):203-7.
62. Rivera RM, Kelley KL, Erdos GW, Hansen PJ. Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced in vitro and in vivo following a physiologically relevant heat shock. *Biol Reprod.* 2003;69(6):2068-77.
63. Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE, Yang XZ. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology.* 2005;64(8):1677-89.
64. Baez F, Darriulat RL, Rodriguez-Osorio N, Vinales C, Báez F, López Darriulat R, et al. Effect of season on germinal vesicle stage, quality, and subsequent in vitro developmental competence in bovine cumulus-oocyte complexes. *J Therm Biol.*

- 2022;103(103171):1-8.
65. Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*. 2001;121(3):447-54.
 66. Hooper LM, Payton RR, Rispoli LA, Saxton AM, Edwards JL. Impact of heat stress on germinal vesicle breakdown and lipolytic changes during in vitro maturation of bovine oocytes. *J Reprod Dev*. 2015;61(5):459-64.
 67. Pavani K, Carvalhais I, Faheem M, Chaveiro A, Reis FV, da Silva FM. Reproductive Performance of Holstein Dairy Cows Grazing in Dry-summer Subtropical Climatic Conditions: Effect of Heat Stress and Heat Shock on Meiotic Competence and In vitro Fertilization. *Asian-Australasian J Anim Sci*. 2015;28(3):334-42.
 68. Roth Z, Hansen PJ. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*. 2005;129(2):235-44.
 69. Gendelman M, Roth Z. Seasonal Effect on Germinal Vesicle-Stage Bovine Oocytes Is Further Expressed by Alterations in Transcript Levels in the Developing Embryos Associated with Reduced Developmental Competence. *Biol Reprod*. 2012;86(1):1-9.
 70. Souza V das GP de, Souza GT de, Lemos DR de, Guimarães JM de O, Quintão CCR, Munk M, et al. Heat shock during in vitro maturation of bovine oocytes disturbs bta-miR-19b and DROSHA transcripts abundance after in vitro fertilization. *Reprod Domest Anim*. 2021;56(8):1128-36.
 71. Pavani KC, Baron E, Correia P, Lourenço J, Bettencourt BF, Sousa M, et al. Gene expression, oocyte nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes and embryos produced after in vivo and in vitro heat shock. *Zygote*. 2016;24(5):748-59.
 72. Ferreira RM, Macabelli CH, de Carvalho NA, Soares JG, Gimenes LU, Ferraz ML, et al. Molecular Evaluation of Developmental Competence of Oocytes Collected

- In Vivo from Buffalo and Bovine Heifers during Winter and Summer. *Buffalo Bull.* 2013;32(2):596-600.
73. Pavani KC, Rocha A, Baron E, Lourenço J, Faheem M, Da Silva FM. The effect of kinetic heat shock on bovine oocyte maturation and subsequent gene expression of targeted genes. *Zygote.* 2017;25(3):383-9.
 74. Roth Z, Hansen PJ. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol Reprod.* 2004;71(6):1898-906.
 75. Yamanaka K, Khatun H, Egashira J, Balboula AZ, Tatemoto H, Sakatani M, et al. Heat-shock-induced cathepsin B activity during IVF and culture compromises the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology.* 2018;114:293-300.
 76. Diaz FA, Gutierrez-Castillo EJ, Foster BA, Hardin PT, Bondioli KR, Jiang Z. Evaluation of Seasonal Heat Stress on Transcriptomic Profiles and Global DNA Methylation of Bovine Oocytes. *Front Genet.* 2021;12:1-10.
 77. Amaral CS, Koch J, Correa Júnior EE, Bertolin K, Mujica LKS, Fiorenza MF, et al. Heat stress on oocyte or zygote compromises embryo development, impairs interferon tau production and increases reactive oxygen species and oxidative stress in bovine embryos produced in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2020;87(8):899-909.
 78. Stamperna K, Giannoulis T, Nanas I, Kalemkeridou M, Dadouli K, Moutou K, et al. Short term temperature elevation during IVM affects embryo yield and alters gene expression pattern in oocytes, cumulus cells and blastocysts in cattle. *Theriogenology.* 2020;156:36-45.
 79. Payton RR, Rispoli LA, Nagle KA, Gondro C, Saxton AM, Voy BH, et al. Mitochondrial-related consequences of heat stress exposure during bovine oocyte maturation persist in early embryo development. *J Reprod Dev.* 2018;64(3):243-51.
 80. Sakatani M, Yamanaka K, Balboula AZ, Takenouchi N, Takahashi M. Heat stress during in vitro fertilization decreases fertilization success by disrupting anti-polyspermy systems of the oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2014;82(1):36-47.

81. Rowinski JR, Rispoli LA, Payton RR, Schneider LG, Schrick FN, McLean KJ, et al. Impact of an acute heat shock during in vitro maturation on interleukin 6 and its associated receptor component transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes. *Anim Reprod.* 2020;17(4):1-14.
82. Almeida Camargo LS, Aguirre-Lavin T, Adenot P, Araujo TD, Araujo Mendes VR, Louro ID, et al. Heat shock during in vitro maturation induces chromatin modifications in the bovine embryo. *Reproduction.* 2019;158(4):313-22.
83. Soto P, Smith LC. BH4 peptide derived from Bcl-xL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2009;76(7):637-46.
84. Sakatani M, Kobayashi S-I, Takahashi M. Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 2004;67(1):77-82.
85. Say E, Sagirkaya H. Searching of Pregnancy Rate in Repeat Breeder Cows by Embryo Transfer Practices. *J Agric Sci.* 2021;27(4):436-40.
86. Al-Katanani YM, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Krininger CE, Block J, et al. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology.* 2002;58(1):171-82.
87. Son DS, Choe CY, Cho SR, Choi SH, Kim HJ, Hur TY, et al. A CIDR-based timed embryo transfer protocol increases the pregnancy rate of lactating repeat breeder dairy cows. *J Reprod Dev.* 2007;53(6):1313-8.
88. Stewart BM, Block J, Morelli P, Navarette AE, Amstalden M, Bonilla L, et al. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *J Dairy Sci.* 2011;94(7):3437-45.
89. Payton RR, Romar R, Coy P, Saxton AM, Lawrence JL, Edwards JL. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. *Biol Reprod.* 2004;71(4):1303-8.
90. Lozano-Dominguez RR, Aspron-Pelayo MA, Vasquez-Pelaez CG, Gonzalez-

- Padilla E, Arechiga-Flores CF. Effect of heat stress on embryo production in superovulated cows and on the pregnancy rate in recipient cows. *Rev Mex Ciencias Pecu.* 2010;1(3):189-203.
91. Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 2002;85(2):390-6.
 92. Sugiyama S, McGowan M, Kafi M, Phillips N, Young M. Effects of increased ambient temperature on the development of in vitro derived bovine zygotes. *Theriogenology.* 2003;60(6):1039-47.
 93. Sugiyama S, McGowan M, Phillips N, Kafi M, Young M. Effects of Increased Ambient Temperature During IVM and/or IVF on the In Vitro Development of Bovine Zygotes. *Reprod Domest Anim.* 2007;42(3):271-4.
 94. Edwards JL, Bogart AN, Rispoli LA, Saxton AM, Schrick FN. Developmental competence of bovine embryos from heat-stressed ova. *J Dairy Sci.* 2009;92(2):563-70.
 95. Edwards JL, Hansen PJ. Elevated Temperature Increases Heat Shock Protein 70 Synthesis in Bovine Two-Cell Embryos and Compromises Function of Maturing Oocytes. *Biol Reprod.* 1996;55(2):340-6.
 96. Luciano AM, Franciosi F, Dieci C, Lodde V. Changes in large-scale chromatin structure and function during oogenesis: A journey in company with follicular cells. *Anim Reprod Sci.* 2014;149(1-2):3-10.
 97. Lodde V, Modina S, Galbusera C, Franciosi F, Luciano AM. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: Interplay with gap junction functionality and developmental competence. *Mol Reprod Dev.* 2007;74(6):740-9.
 98. Aman RR, Parks JE. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod.* 1994;50(1):103-10.
 99. Ju J-C, Tseng J-K. Nuclear and cytoskeletal alterations of in vitro matured porcine oocytes under hyperthermia. *Mol Reprod Dev.* 2004;68(1):125-33.

100. Rivera RM, Kelley KL, Erdos GW, Hansen PJ. Reorganization of Microfilaments and Microtubules by Thermal Stress in Two-Cell Bovine Embryos. *Biol Reprod.* 2004;70(6):1852-62.
101. Schrock GE, Saxton AM, Schrick FN, Edwards JL. Early in vitro fertilization improves development of bovine ova heat stressed during in vitro maturation. *J Dairy Sci.* 2007;90(9):4297-303.
102. Lawrence JL, Payton RR, Godkin JD, Saxton AM, Schrick FN, Edwards JL. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. *J Dairy Sci.* 2004;87(8):2449-54.
103. Qu P, Tian W, Li T, Jiang Z, Gao S, Tian Z, et al. Developmental competence and ultrastructural changes of heat-stressed mouse early blastocysts produced in vitro. *Curr Zool.* 2009;55(1):61-6.
104. Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, De Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev.* 2002;61(3):414-24.
105. Barlan K, Gelfand VI. Microtubule-Based Transport and the Distribution, Tethering, and Organization of Organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(5).
106. Ichas F, Mazat JP. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1366(1-2):33-50.
107. Wang C, Youle RJ. The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annu Rev Genet.* 2009;43:95.
108. Roth Z. Physiology and endocrinology symposium: Cellular and molecular mechanisms of heat stress related to bovine ovarian function. *J Anim Sci.* 2015;93(5):2034-44.
109. Memili E, Dominko T, First NL. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 1998;51(1):36-41.
110. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat*

- Rev Genet. 2013;14(3):204-20.
111. Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*. 2011;11(5):797-813.
 112. Zhang B, Peñagaricano F, Driver A, Chen H, Khatib H. Differential expression of heat shock protein genes and their splice variants in bovine preimplantation embryos. *J Dairy Sci*. 2011;94(8):4174-82.
 113. Sudo T, Ota Y, Kotani S, Nakao M, Takami Y, Takeda S, et al. Activation of Cdh1-dependent APC is required for G1 cell cycle arrest and DNA damage-induced G2 checkpoint in vertebrate cells. *EMBO J*. 2001;20(22):6499.
 114. Pali SS, Van Emburgh BO, Sankpal UT, Brown KD, Robertson KD. DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol*. 2008;28(2):752-71.
 115. Hyttel P, Viuff D, Fair T, Laurincik J, Thomsen PD, Callesen H, et al. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction*. 2001;122(1):21-30.
 116. Liu Z, De Matos DG, Fan HY, Shimada M, Palmer S, Richards JAS. Interleukin-6: An Autocrine Regulator of the Mouse Cumulus Cell-Oocyte Complex Expansion Process. *Endocrinology*. 2009;150(7):3360-8.
 117. Temme A, Traub O, Willecke K. Downregulation of connexin32 protein and gap-junctional intercellular communication by cytokine-mediated acute-phase response in immortalized mouse hepatocytes. *Cell Tissue Res* 1998 2942. 1998;294(2):345-50.
 118. De Matos DG, Furnus CC, Moses DF. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod*. 1997;57(6):1420-5.
 119. Koyama K, Kang SS, Huang W, Yanagawa Y, Takahashi Y, Nagano M. Aging-related changes in in vitro-matured bovine oocytes: oxidative stress, mitochondrial activity and ATP content after nuclear maturation. *J Reprod Dev*. 2014;60(2):136-42.

120. Alm H, Torner H, Löhrike B, Viergutz T, Ghoneim IM, Kanitz W. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology*. 2005;63(8):2194-205.
121. Cheung P, Lau P. Epigenetic Regulation by Histone Methylation and Histone Variants. *Mol Endocrinol*. 2005;19(3):563-73.
122. Sepulveda-Rincon LP, Solanas E del L, Serrano-Revuelta E, Ruddick L, Maalouf WE, Beaujean N. Early epigenetic reprogramming in fertilized, cloned, and parthenogenetic embryos. *Theriogenology*. 2016;86(1):91-8.
123. Graf A, Krebs S, Heininen-Brown M, Zakhartchenko V, Blum H, Wolf E. Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Anim Reprod Sci*. 2014;149(1-2):46-58.
124. Pichugin A, Le Bourhis D, Adenot P, Lehmann G, Audouard C, Renard JP, et al. Dynamics of constitutive heterochromatin: two contrasted kinetics of genome restructuring in early cloned bovine embryos. *Reproduction*. 2010;139(1):129-37.
125. Beaujean N. Epigenetics, embryo quality and developmental potential. *Reprod Fertil Dev*. 2015;27(1):53-62.
126. Grewal SIS, Jia S. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*. 2007;8(1):35-46.
127. Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, et al. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol*. 2003;13(13):1116-21.
128. Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ, Memili E. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*. 2006;131(5):895-904.
129. Ghanem N, Salilew-Wondim D, Gad A, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, et al. Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. *Reproduction*. 2011;142(4):551-64.
130. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from

- epigenomics. *Nat Rev Genet.* 2008;9(6):465-76.
131. Stancheva I, El-Maarri O, Walter J, Niveleau A, Meehan RR. DNA methylation at promoter regions regulates the timing of gene activation in *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol.* 2002;243(1):155-65.
 132. Su J, Wang Y, Xing X, Liu J, Zhang Y. Genome-wide analysis of DNA methylation in bovine placentas. *BMC Genomics.* 2014;15(1):1-11.
 133. Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med.* 1993;15(1):69-75.
 134. Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C. Apoptosis Versus Cell Differentiation. *Prion.* 2007;1(1):53-60.
 135. Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ.* 2004;11(4):390-402.
 136. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction.* 2004;128(6):657-68.
 137. Roberts RM, Chen Y, Ezashi T, Walker AM. Interferons and the maternal–conceptus dialog in mammals. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(2):170-7.
 138. Nemcova L, Machatkova M, Hanzalova K, Horakova J, Kanka J. Gene expression in bovine embryos derived from oocytes with different developmental competence collected at the defined follicular developmental stage. *Theriogenology.* 2006;65(7):1254-64.
 139. Susor A, Liskova L, Toralova T, Pavlok A, Pivonkova K, Karabinova P, et al. Role of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 in antipolyspermy defense of mammalian oocytes. *Biol Reprod.* 2010;82(6):1151-61.
 140. Nganvongpanit K, Müller H, Rings F, Hoelker M, Jennen D, Tholen E, et al. Selective degradation of maternal and embryonic transcripts in in vitro produced bovine oocytes and embryos using sequence specific double-stranded RNA. *Reproduction.* 2006;131(5):861-74.
 141. Schultz RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the

- preimplantation embryo. *Hum Reprod Update*. 2002;8(4):323-31.
142. Pennetier S, Uzbekova S, Perreau C, Papillier P, Mermillod P, Dalbiès-Tran R. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *BMP15* and *VASA* in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biol Reprod*. 2004;71(4):1359-66.
 143. Szpaderska A., Frankfater A. An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer. *Cancer Res*. 2001;61:3493-500.
 144. Balboula AZ, Yamanaka K, Sakatani M, Hegab AO, Zaabel SM, Takahashi M. Intracellular cathepsin B activity is inversely correlated with the quality and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*. 2010;77(12):1031-9.
 145. Balboula AZ, Yamanaka K, Sakatani M, Hegab AO, Zaabel SM, Takahashi M. Cathepsin B activity is related to the quality of bovine cumulus oocyte complexes and its inhibition can improve their developmental competence. *Mol Reprod Dev*. 2010;77(5):439-48.
 146. Wakefield SL, Lane M, Mitchell M. Impaired Mitochondrial Function in the Preimplantation Embryo Perturbs Fetal and Placental Development in the Mouse. *Biol Reprod*. 2011;84(3):572-80.
 147. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(402):1-12.
 148. Zheng Y, Chen KL, Zheng XM, Li HX, Wang GL. Identification and bioinformatics analysis of microRNAs associated with stress and immune response in serum of heat-stressed and normal Holstein cows. *Cell Stress Chaperones*. 2014;19(6):973-81.
 149. Nakamoto H, Vigh L. The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(3):294-306.
 150. Sakatani M, Bonilla L, Dobbs KB, Block J, Ozawa M, Shanker S, et al. Changes in the transcriptome of morula-stage bovine embryos caused by heat shock: Relationship to developmental acquisition of thermotolerance. *Reprod Biol*

- Endocrinol. 2013;11(1):1-12.
151. Kadokawa H, Sakatani M, Hansen PJ. Perspectives on improvement of reproduction in cattle during heat stress in a future Japan. *Anim Sci J.* 2012;83(6):439-45.
 152. Selvaraju M, Veerapandian C. Effect of PGF2 alpha on oestrus and fertility rate in repeat breeder cows treated with norgestomet-oestradiol. *Vet World.* 2010;3(10):466-8.
 153. Ergene O. Progesterone concentrations and pregnancy rates of repeat breeder cows following postinsemination PRID and GnRH treatments*. *Turkish J Vet Anim Sci.* 2012;36(3):283-8.
 154. Assumpção MEOD, Milazzotto MP, Simões R, Nicacio AC, Mendes CM, Mello MRB, et al. In vitro survival of in vitro-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification. *Anim Reprod.* 2008;5(3/4):116-20.
 155. Gómez E, Carrocera S, Martín D, Pérez-Jánez JJ, Prendes J, Prendes JM, et al. Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium. *Theriogenology.* 2020;146:39-47.
 156. Viana J. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technol Newsl.* 2019;36(4).
 157. Block J, Bonilla L, Hansen PJ. Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *J Dairy Sci.* 2010;93(11):5234-42.
 158. Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2008;90(1):186-93.
 159. Najafzadeh V, Bojsen-Møller Secher J, Pihl M, Aerenlund A, Jørgensen N, Jensen KK, et al. Vitrification yields higher cryo-survival rate than slow freezing in biopsied bovine in vitro produced blastocysts. *Theriogenology.* 2021;171:44-54.

160. Sanches BV, Lunardelli PA, Tannura JH, Cardoso BL, Colombo Pereira MH, Gaitkoski D, et al. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology*. 2016;85(6):1147-51.
161. Murillo-Ríos A, Maillo V, Muñoz M, Gutiérrez-Adán A, Carrocera S, Martín-González D, et al. Short- and long-term outcomes of the absence of protein during bovine blastocyst formation in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 2017;29(6):1064-73.
162. Gómez E, Carrocera S, Uzbekova S, Martín D, Murillo A, Alonso-Guervós M, et al. Protein in culture and endogenous lipid interact with embryonic stages in vitro to alter calf birthweight after embryo vitrification and warming. *Reprod Fertil Dev*. 2017;29(10):1932-43.
163. Bruyère P, Baudot A, Guyader-Joly C, Guérin P, Louis G, Buff S. Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology*. 2012;78(6):1294-302.
164. Mao L, Lou H, Lou Y, Wang N, Jin F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(3):284-99.
165. Naranjo-Gómez JS, Uribe-García HF, Herrera-Sánchez MP, Lozano-Villegas KJ, Rodríguez-Hernández R, Rondón-Barragán IS. Heat stress on cattle embryo: gene regulation and adaptation. *Heliyon*. marzo de 2021;7(3):1-9.