

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DESARROLLO *in vitro* DE OVOCITOS BOVINOS PROVENIENTES DE VACAS CON PREDOMINANCIA FENOTÍPICA *Bos taurus* Y *Bos indicus*

Evaluation of *in vitro* Development Capacity of Bovine Oocytes Obtained from Predominantly *Bos taurus* and *Bos indicus* cows

Francisco J. Báez Contreras¹, Adeymi C. Chávez Corona¹, Hugo J. Hernández Fonseca²
y Patricia C. Villamediana Monreal^{1*}

¹Laboratorio de Citogenética, Unidad de Investigación de Biotecnología Animal, Dpto. de Biología, Facultad Experimental de Ciencias.

²Laboratorio de Fecundación In Vitro, Unidad de Investigación de Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. *patriciavillamediana@cantv.net

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos de vacas mestizas *B. taurus* y *B. indicus*. Los ovocitos fueron recuperados de ovarios de hembras bovinas provenientes de un matadero comercial. Para la obtención de los complejos cumulus-ovocitos (CCO) se realizó la técnica de *slicing*, seleccionando los ovocitos que tenían al menos una capa de células del cumulus y un citoplasma homogéneo. Los ovocitos seleccionados fueron madurados y fecundados *in vitro* (MIV-FIV). Se utilizó semen de un toro Brahman puro (*B. indicus*). Para la evaluación de la MIV y FIV todos los ovocitos se fijaron por al menos 24 h a 4°C en solución metanol-ácido acético (3:1) y teñidos con aceto-orceína al 1,1%. La tasa de maduración de ovocitos de vacas con predominancia fenotípica *B. indicus* fue del 66,17% mientras que las vacas con predominancia fenotípica *B. taurus* alcanzaron un 50,94% ($P>0,05$). En cuanto a la tasa de fecundación se obtuvo un 14,28 y 35,72% de ovocitos penetrados normalmente y anormales, respectivamente, para el grupo de ovocitos con predominancia fenotípica *B. indicus*. Mientras que para vacas con predominancia fenotípica *B. taurus*, un 10,22% correspondió a ovocitos penetrados normales y 19,31% de ovocitos penetrados anormales, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos. Los presentes resultados, tanto para la progresión meiótica como para las tasas de fecundación, indican que los ovocitos de vacas mestizas con predominancia fenotípica *B. indicus* son más competentes

en las primeras etapas de desarrollo *in vitro* que los ovocitos de vacas mestizas con predominancia fenotípica *B. taurus*.

Palabras clave: *Bos taurus*, *Bos indicus*, ovocito, maduración *in vitro*, fecundación *in vitro*.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* development capacity of bovine oocytes from crossbred *B. taurus* and *B. indicus* cows. Oocytes from bovine cows were collected from commercial slaughterhouse. The cumulus-oocyte complex (COC) ovaries were obtained by Slicing technique, selecting those oocytes that had 2 to 3 layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm. After selection oocytes proceed with maturation (IVM) and fertilization *in vitro* (IVF). It used semen from a pure Brahman bull (*B. indicus*). For the assessment of IVM as for IVF oocytes were fixed for about 24 hours at 4°C in methanol-acetic acid (3:1) solution and stained with 1.1% aceto-orcein. The maturation rate of oocytes from cows with *B. indicus* phenotypic predominance was 66.17%, whereas cows with *B. taurus* phenotypic predominance 50.94% ($P>0.05$). Fertilization rate obtained in *B. indicus* phenotypic predominance group was 14.28% of oocytes normal penetrated and abnormal penetrated 35.72%, for cows with a phenotypic predominance *B. taurus* oocytes normal penetrated were 10.22% and 19.31% of abnormal oocytes penetrated. In conclusion, the present results indicate that oocytes from cows with phenotypic predominance *B. indicus* are more competent in the early stages of development *in vitro* than oocytes from cows with phenotypic predominance *B. taurus*.

Key words: *Bos taurus*, *Bos indicus*, oocyte, *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF).

INTRODUCCIÓN

El establecimiento de nuevas biotecnológicas para la producción *in vitro* (PIV) de embriones tienen un gran potencial como método de obtención de un elevado número de embriones utilizables, tanto para estudios científicos como para aplicación comercial [13], siendo la PIV de gran interés en Venezuela, a causa de las limitaciones de tipo ambiental y como respuesta para los ganaderos de la cuenca del Lago de Maracaibo, estado Zulia, en su búsqueda de animales más productivos y rentables en estos ambientes tropicales.

En la región occidental de Venezuela se ha venido desarrollando una ganadería de doble propósito, como resultado de programas de cruzamiento, principalmente del tipo alterno *B. taurus* y *B. indicus*, con la finalidad de obtener un animal adaptable a las condiciones ambientales particulares del trópico y que muestren mayor resistencia a las enfermedades [15]. Estos cruzamientos son una estrategia para incrementar los niveles de producción ya que los cruces *taurus-indicus* en estas regiones resultan la vía más recomendada para la producción de leche y de carne. Estos programas se han desarrollado a raíz de los actuales problemas generados en la producción bovina, que a pesar de presentar un ganado con excelente adaptación al medio (*B. indicus*), muestra disminuidas tasas de crecimiento y de producción láctea a diferencia de las especies taurinas, las cuales presentan mejor producción láctea pero bajas tasas de crecimiento por mala adaptabilidad al ambiente tropical [2].

El ganado *B. taurus* es muy sensible a las condiciones climáticas, experimentando grados variables de infertilidad. Los animales con mayor herencia cebuina (*B. indicus*), además de ser menos exigentes en alimentación debido a su menor producción lechera, poseen características anatómicas y funcionales que los hacen más aptos para resistir las condiciones ambientales adversas, mayor resistencia a enfermedades por lo cual mantienen tasas de fertilidad más elevadas a lo largo del año [4]. El ganado cebú (*B. indicus*) es predominante en las regiones tropicales, debido a su mejor tolerancia al estrés térmico y la resistencia a los parásitos [4, 9] que las razas europeas (*B. taurus*), las cuales son predominantes en climas templados [9]. En comparación con las razas europeas, el ganado cebú experimenta una menor reducción en el consumo de alimento, en la tasa de crecimiento, la producción de leche y la función reproductiva, en respuesta al estrés térmico [4].

Se ha demostrado que el estrés calórico ejerce un efecto nocivo sobre el desarrollo de folículos ováricos, nivel de progesterona y sobre la competencia ovocitaria en vacas Gyr (*B. indicus*) a diferencia del ganado Holstein (*B. taurus*), donde el estrés calórico causa un inmediato deterioro sobre el desarrollo folicular [37]. No se conoce el mecanismo exacto por el cual el estrés calórico puede afectar a los folículos y a los ovocitos, pero se ha descrito que produce daño en la comunicación intercelular entre las células de la granulosa, del cúmulus y el ovocito [1, 31], afectándose la competencia del ovocito

para ser fecundado [1, 33] y la viabilidad de las células de la granulosa y de la teca interna, induciendo cambios en la esteroidogénesis [31]. Por tanto, algunos folículos ováricos pudieran ser afectados antes de su reclutamiento, lo que se traduce en la prolongación de los efectos del estrés térmico aún a los meses con condiciones más confortables [21, 29].

La maduración de ovocitos bovinos, seguida por la fecundación para la PIV de embriones bovinos, está siendo cada vez más utilizada. Estas técnicas *in vitro* tienen un valor importante, tanto para investigar los eventos biológicos básicos que ocurren durante la maduración, la fecundación de ovocitos y el desarrollo embrionario temprano [32], como para proveer ovocitos capaces de soportar el desarrollo embrionario preimplantacional [13, 20], a partir de gametos de alto valor genético [12].

La fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos bovinos es una técnica beneficiosa que permite obtener embriones, lo que representa grandes ventajas en reproducción animal garantizando un elevado número de embriones en el mismo estadio de desarrollo, clonación mediante transferencia nuclear y producción de animales transgénicos [12], biotecnologías que permiten el mejoramiento genético necesario para vencer las limitaciones impuestas por las condiciones ambientales [15]. Además, las técnicas de FIV son la única opción disponible para producir crías de hembras valiosas, que por causas no genéticas son estériles y por lo tanto son eliminadas de los sistemas productivos [26].

Cada vez es más evidente la importancia del componente racial sobre los eventos fisiológicos del embrión y los gametos que le dan origen y dada la importancia de la ganadería mestiza en el país, es importante caracterizar la influencia de dicho componente sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos. La realización de estudios donde se compare la capacidad de desarrollo ovocitario entre las especies *B. taurus* y *B. indicus*, permitirá contribuir a fortalecer los conocimientos relacionados con las diferencias biológicas existentes entre estas dos especies.

Se espera que el conocimiento generado de la selección de una de las especies predominantes, *B. taurus* o *B. indicus*, sea utilizado como fuente de gametos femeninos, que muestren la mayor capacidad de maduración *in vitro*, para la FIV. Esto tenderá a mejorar la eficiencia de la PIV de embriones bovinos. Este estudio pretende alcanzar este objetivo al evaluar la capacidad de desarrollo de los ovocitos luego de madurados y fecundados *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y selección de los ovocitos

Se recogieron los ovarios de vacas sacrificadas en un matadero comercial que presentaron características con predominancia fenotípica de las especies *B. taurus* y *B. indicus*,

según la clasificación de vacas mestizas propuesta por Isea y Aranguren [11] (FIG. 1), para ser luego transportados al laboratorio en *buffer* fosfato salino (PBS) + gentamicina (50 mg/L) (G1397, Sigma) a 37°C en recipientes isotérmicos. Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados tres veces con la misma solución y condiciones. Los complejos cumulus ovocitos (COC) fueron recuperados mediante la técnica de *slicing* o recogida en masa [35], que consiste en cortar sucesivamente la superficie del ovario con una hoja de bisturí en una placa de petri conteniendo medio TCM-199 (M2520, Sigma) suplementado con 2,2 mg/mL NaHCO₃ (31437, Riedel-de Haën), 50 mg/L gentamicina (G1397, Sigma) y 11,1 mg/L de heparina (H-9399, Sigma). Fueron seleccionados bajo un microscopio estereoscópico (50X, Olympus SZX12, Japón) aquellos ovocitos con mayor tamaño y con al menos una capa completa de células del cumulus y citoplasma homogéneo.

Maduración *in vitro* de ovocitos

El medio de maduración fue el TCM-199 (M-7528, Sigma) suplementado con 275 mg/L de piruvato sódico (815990, Fluka), 50 mg/L de gentamicina (G1397, Sigma), 146 mg/L de L-glutamina (G-15120, Sigma), factor de crecimiento epidermal (50 ng/mL), 10 µg/mL de Folltropin-V®, 1 µg/mL de 17β-estradiol y 10% de suero fetal bovino (BFS). Los complejos cumulus-ovocito fueron cultivados en grupos de 12, en microgotas de 50 µL de medio cubiertas con aceite mineral (M8410, Sigma) y mantenidos en un incubador de CO₂ (Lab-Line 490, EUA) durante 24 horas a 38,5°C en una atmósfera con 5% CO₂ en aire saturado de humedad [22].

Selección y capacitación espermática

Para llevar a cabo la FIV se utilizó semen congelado de un toro Brahman puro (*B. indicus*) de probada fertilidad. Las pajueltas contenidas en el tanque de nitrógeno líquido, se descongelaron en agua a 37°C durante 30 segundos. Luego, el

semen se depositó en un tubo cónico de 15 mL que contenía 2 mL de TL-Semen suplementado con 100 mM de piruvato sódico (815990, Fluka) y 50 mg/L gentamicina (G1397, Sigma). Se homogenizó y se llevó a la centrifuga (Thermo IEC-CL10, EUA) a 39 G por 5 minutos. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se centrifugó por segunda vez de la misma manera. Se tomaron 30 µL del *pellet* y se mezclaron con 30 µL del medio TL-Stock. Se calculó la concentración y motilidad ajustando la concentración a 1 x 10⁶ espermatozoides/mL [23].

Fecundación *in vitro*

Una vez transcurrido el tiempo de maduración, los COC se trasladaron en grupos de 15, a microgotas cubiertas con aceite mineral (69794, Fluka) las cuales contenían 5 L de la mezcla del semen y 90 L de medio TL-IVF suplementado con piruvato sódico (815990, Fluka), 50 mg/L gentamicina (G1397, Sigma), 30 g/mL de heparina (H3149, Sigma) y 6 mg/mL de BSA, libre de ácidos grasos (A6003, Sigma). Luego se colocaron en la incubadora (Lab-Line 490, EUA) durante 20 horas a 38,5°C en una atmósfera saturada de humedad, bajo 5% CO₂ [23].

Evaluación de la progresión meiótica

Para evaluar la progresión meiótica, los ovocitos fueron denudados de las células del cumulus mediante agitación mecánica con citrato de sodio al 3% y luego fijados en una mezcla de metanol-ácido acético (3:1) durante al menos 24 horas a 4°C. Posteriormente, se procedió a teñirlos con aceto-orceína al 1,1%. Se evaluó la maduración nuclear de los mismos bajo microscopio óptico (400X, Olympus CX31, Japón), clasificándolos según el estadio meiótico alcanzado en: ovocitos maduros (metafase II y telofase I) e inmaduros (anafase I, metafase I, condensación cromosómica y vesícula germinal). Aquellos ovocitos que no pudieron ser incluidos en ninguno de los grupos anteriormente nombrados fueron clasificados como degenerados (FIG. 2).



(a)



(b)

FIGURA 1. HEMBRAS SELECCIONADAS CON PREDOMINANCIAS FENOTÍPICAS DE LAS ESPECIES *B. taurus* Y *B. indicus*: (a) PREDOMINANTEMENTE *B. indicus*; (b) PREDOMINANTEMENTE *B. taurus* / FEMALE SELECTED WITH PREDOMINANTLY PHENOTYPE OF THE SPECIES *B. indicus* Y *B. Taurus*: (a) PREDOMINANTLY *B. indicus*; (b) PREDOMINANTLY *B. taurus*.

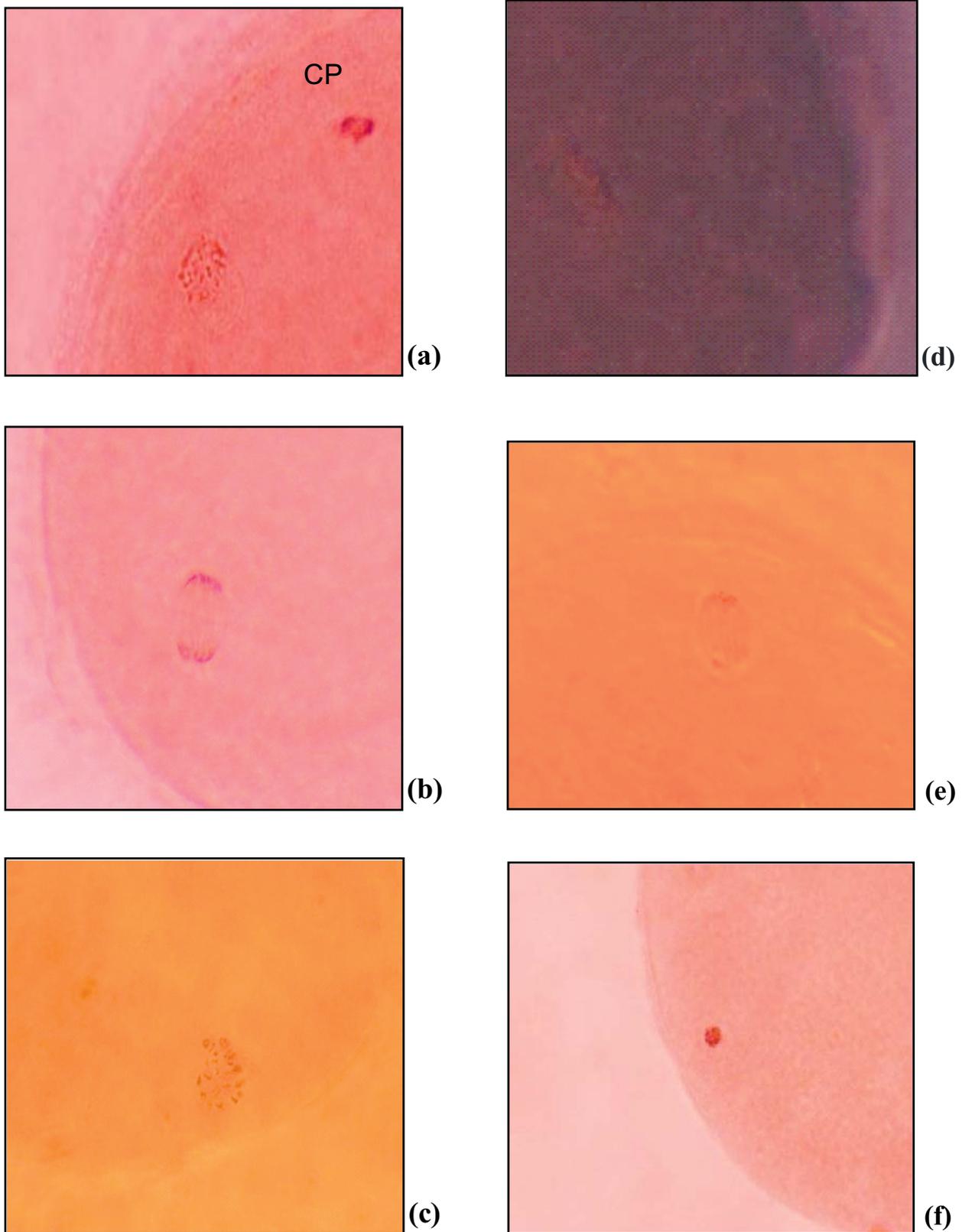


FIGURA 2. PROGRESIÓN MEIÓTICA DE OVOCITOS BOVINOS: (a) MII+CP (400X), (b) TELOFASE I (400X), (c) METAFASE I (400X), (d) ANAFASE I (400X). OVOCITOS BOVINOS DEGENERADOS: (e) TELOFASE I (400X), (f) METAFASE I (400X) / MEIOTIC PROGRESSION OF BOVINE OOCYTES: (a) MII+CP (400X), (b) TELOFASE I (400X), (c) METAFASE I (400X), (d) ANAFASE I (400X). BOVINE OOCYTES DEGENERATED: (e) TELOFASE I (400X), (f) METAFASE I (400X).

Evaluación de la fecundación *in vitro*

Tras 20 h de incubación los ovocitos fueron lavados con citrato de sodio (32320, Riedel-de Haën) al 3% bajo microscopio estereoscópico para denudarlos, y luego se fijaron en una mezcla de etanol-ácido acético (3:1) durante al menos 24 horas a 4°C y posteriormente se realizó la tinción con aceto-orceína al 1,1%, clasificándolos como: (a) normalmente penetrados cuando en el citoplasma del cigoto se observaron dos pronúcleos, uno masculino y otro femenino, y una cola de espermatozoide, o bien, una cabeza de espermatozoide descondensada acompañada de su cola y de un pronúcleo femenino; (b) asincrónicos: los ovocitos son penetrados solamente por un espermatozoide, pero se observa alguna alteración o retraso en la formación de los pronúcleos, como cabeza del espermatozoide no descondensada. Mientras que dentro del grupo de ovocitos activados (c), se encuentran los detenidos en telofase II. Por último, los cigotos poliespermáticos (d), presentaron

más de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares, o bien, más de dos cabezas de espermatozoide descondensándose o más de dos colas [19] (FIG. 3).

Análisis estadístico

Los experimentos fueron repetidos seis veces. Las tasas de maduración y de fecundación de ambas especies se expresaron como proporciones analizadas mediante el test de χ^2 bajo la aplicación del paquete estadístico SAS® [34]. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron un total de 414 ovocitos en este estudio. En la TABLA I se muestra un resumen de la progresión meiótica del total de ovocitos bovinos evaluados mediante análisis

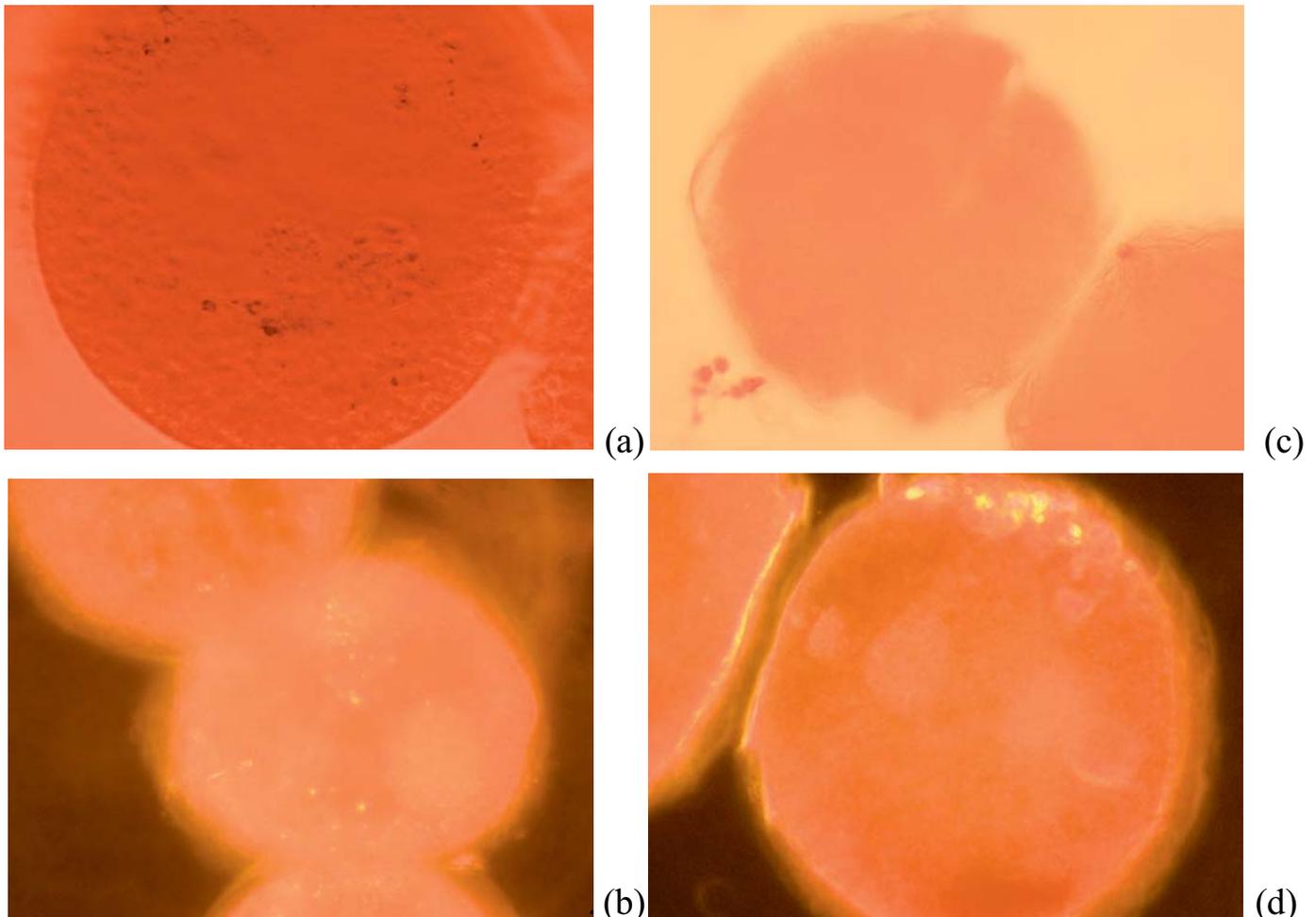


FIGURA 3. DESARROLLO *In vitro* DE OVOCITOS A LAS 20 HORAS POST-FECUNDACIÓN: (a) OVOCITO CON 2 PRONÚCLEOS + COLA (EN OTRO CAMPO) (400X); (b) OVOCITO ANORMAL CON 3 PRONUCLEOS (400X); (c) CIGOTO COMENZANDO PROCESO DE CITOQUINESIS (400X). (d) OVOCITO CON 2 PRONUCLEOS + COLA (EN OTRO CAMPO) / *In vitro* DEVELOPMENT OF OOCYTES 20 HOURS OF POST-FERTILIZATION: (a) OOCYTES WITH 2 PRONUCLEI + TAIL (ANOTHER FIELD) (400X); (b) ABNORMAL OOCYTE WITH 3 PRONUCLEUS (400X); (c) ZYGOTE CYTOQUINESIS PROCESS STARTED (400X). (d) OOCYTES WITH 2 PRONUCLEUS + TAIL (ANOTHER FIELD).

citogenético. La mayor tasa de maduración *in vitro* fue observada en el grupo con predominancia *B. indicus* (66,17%) al compararla con la tasa alcanzada por el grupo predominantemente *B. taurus* (50,94%; $P < 0,05$).

La tasa de maduración obtenida en el grupo predominantemente *B. indicus* fue similar a la observada por Rodríguez y col. [28] y Báez y col. [3] con un 57,3 y 61,36%, respectivamente, en ovocitos bovinos madurados recuperados de hembras mestizas. Resultados diferentes se han observado en estudios anteriores donde se han obtenido porcentajes mayores de 88% [18], 92% [7] y menores entre 46,93% [14] y 50,5% en ovocitos felinos (*Felis catus*) [24].

Para la fecundación *in vitro* se evaluaron un total de 172 ovocitos, de los cuales 84 pertenecen al grupo experimental con predominancia fenotípica *B. indicus* y 88 a *B. taurus*. En el grupo experimental de predominancia fenotípica *B. indicus* se obtuvo un 14,28% de penetrados normales y un 35,72% de

penetrados anormales, a diferencia del grupo experimental con predominancia fenotípica *B. taurus*, en el cual se obtuvieron menores tasas de penetrados normales (10,22%) y anormales (19,31%). En el grupo experimental con predominancia fenotípica *B. indicus* se obtuvo un 15,48% de ovocitos asincrónicos y un 5,95% de ovocitos polispermicos (TABLA II). Menores porcentajes se observaron en el grupo experimental con predominancia fenotípica *B. taurus* donde se obtuvieron un 6,82 y 1,13%, respectivamente.

Estas tasas de fecundación son bajas en comparación con otros estudios realizados, donde se observa de forma frecuente porcentajes que pueden superar el 50% en porcinos [11] y entre el 10 y el 25% en bovino [8, 38], ya que son las anomalías más frecuentemente observadas en fecundación *in vitro* [25].

Estos resultados reflejan una tendencia de la especie *B. indicus* sobre la especie *B. taurus*, a mostrar mayor competen-

TABLA I
PROGRESIÓN MEIÓTICA DE OVOCITOS BOVINOS / MEIOTIC PROGRESSION OF BOVINE OOCYTES

	Nº de ovocitos totales evaluados	Nº de ovocitos Madurados			Nº de ovocitos Inmaduros				Nº Deg. n (%)	
		Total n (%)	Telol n (%)	MII+ CP n (%)	Total n (%)	Anal n (%)	MI n (%)	CCII n (%)		VG n (%)
<i>Bos indicus</i>	136	90 (66,17) ^a	20 (14,70)	70 (51,47)	32 (23,53)	1 (0,73)	31 (22,79)	0	0	14 (10,29)
<i>Bos taurus</i>	106	54 (50,94) ^b	12 (11,32)	42 (39,62)	31 (29,25)	1 (0,94)	27 (25,47)	2 (1,88)	1 (0,94)	21 (19,81)
Total	242	144 (59,50)	32 (13,22)	112 (46,28)	63 (26,03)	2 (0,82)	58 (23,96)	2 (0,82)	1 (0,41)	35 (14,46)

^{a,b}: Valores en la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente ($P < 0,05$).

MII+CP: metafase II + corpúsculo polar. Telol: telofase I. Total Ovoc. mad.: total ovocitos madurados. Anal: anafase I. MI: metafase I. CCII: condensación cromosómica II. VG: vesícula germinal. Ovoc. inmd.: ovocitos inmaduros. Deg: degenerados.

TABLA II
FECUNDACIÓN A LAS 20 HORAS / FERTILIZATION AT 20 HOURS

	Nº de ovocitos totales evaluados	No Penet. n (%)	Ovoc. Penet. Normales 2 PN+C n (%)	Ovoc. Penet. Anormales			Deg. n (%)	
				Total n (%)	Telo II n (%)	Asin. n (%)		> 2 PN n (%)
<i>Bos indicus</i>	84	24 (28,57) ^a	12 (14,28)	30 (35,72)	12 (14,29)	13 (15,48)	5 (5,95)	18 (21,43)
<i>Bos taurus</i>	88	42 (47,72) ^b	9 (10,22)	17 (19,31)	6 (6,82)	10 (11,36)	1 (1,13)	20 (22,72)
Total	172	66 (38,37)	21 (12,21)	47 (27,32)	18 (10,46)	23 (13,37)	6 (3,48)	38 (22,09)

^{a,b}: Valores en la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente ($P < 0,05$).

Ovoc. No Penet.: Ovocitos no penetrados. 2PN+C: ovocitos penetrados presentando 2 pronúcleos y la cola del espermatozoide. Telo II: ovocitos en telofase II. Asin: ovocitos asincrónicos. > 2 PN: ovocitos polispermicos y poliginicos. Deg: degenerados.

cia ovocitaria y mejor desarrollo embrionario debido a la resistencia a altas temperaturas de los ovocitos como resultado de la adquisición de genes termotolerantes [16] y al hecho que este ganado presenta algunas características que contribuyen a la regulación de la temperatura corporal, entre estas, menor grasa subcutánea, pelaje corto, grandes glándulas sudoríparas [6].

Los resultados del presente trabajo coinciden con los obtenidos por Roth y Hansen [30], quienes evaluaron la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos de hembras puras y mestizas, encontrando menores tasas de degeneración y mayores tasas de división embrionaria, en hembras puras o con predominancia *B. indicus*. Estos autores manifiestan que en las primeras 12 h de maduración *in vitro* los ovocitos bovinos son más susceptibles a daños, que se reflejan en las tasas de degeneración y división de los primeros estadios embrionarios, por lo que recomiendan estudios de apoptosis bajo las mismas condiciones de cultivo.

En la fecundación *in vitro* existe ciertos aspectos que son importantes pero el principal de ellos es la adecuada maduración del ovocito para asegurar la calidad del embrión. Actualmente, también se ha estudiado el efecto que ejerce el macho sobre la calidad embrionaria. Se ha demostrado que embriones producidos *in vitro* utilizando ovocitos Brahman (*B. indicus*) con semen Angus (*B. taurus*) fueron más termotolerantes que embriones producidos por inseminación con ovocitos Holstein con semen Angus (*B. taurus*) [5]. Autores como Eberhardt y col. [10], estudiaron los efectos del estrés térmico sobre el desarrollo embrionario evaluando el ganado Nelore (*B. indicus*), Angus y Holstein (*B. taurus*), y mestizos (*B. indicus* frente *B. taurus*), utilizando semen de ganado Nelore, concluyendo que los embriones fecundados con éste son más capaces de sobrevivir al calor en las primeras etapas de desarrollo que los fecundados con Angus, siendo esto resultado de la contribución genética de los ovocitos y los espermatozoide [10]. Estos resultados indican que, al igual que el ovocito, el espermatozoide influye en la capacidad termotolerante de los embriones producidos *in vitro*.

Existen indicios de que en vacas Holstein (*B. taurus*), el estrés calórico parece reducir la competencia ovocitaria y las tasas de fecundación, reduciendo la capacidad de desarrollo de embriones y contribuyendo a una pobre fertilidad durante los meses de calor [6, 17, 36]. El ganado cebú (*B. indicus*) está bien adaptado a ambientes tropicales, demostrando una óptima tolerancia al calor. Las vacas *B. indicus* han demostrado mejor rendimiento reproductor que las *B. taurus* en regiones tropicales y subtropicales, lo que ha quedado evidenciado por sus mayores índices de reproducción en ambientes tropicales al compararlas con los obtenidos por el ganado *B. taurus* [6]. Rocha y col. [27], demostraron que existe una disminución significativa en la calidad ovocitaria de vacas Holstein (*B. taurus*) en temporada caliente, mientras que en temporada lluviosa, no se observó diferencia en la calidad ovocitaria. No obstante, para vacas Brahman (*B. indicus*) no se ob-

servó ninguna diferencia entre las estaciones en cuanto a la calidad del ovocito [6].

El reciente estudio realizado por Camargo y col. [6] demuestra que existen diferencias significativas y evidentes en la transcripción de la expresión de la proteína Hsp 70,1. Estos autores concluyen que esta diferencia de expresión proteica podría estar asociada con el desarrollo de la competencia ovocitaria y la adaptación para el ambiente tropical de las vacas *B. indicus*, a diferencia de las *B. taurus*, debido a que mientras mayor sea la expresión de esta proteína, mayor es la resistencia al estrés calórico. Biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial a tiempo fijo y la producción de embriones *in vivo* e *in vitro* pueden utilizarse para explotar los ovocitos y genotipos para producir animales híbridos cuyos gametos presenten mayor capacidad de maduración y desarrollo en ambientes tropicales. Estas biotecnologías se pueden utilizar para evitar o minimizar los efectos del estrés térmico en periodos críticos del desarrollo ovocitario y embrionario [17, 36].

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el ganado con predominancia fenotípica *B. indicus* presenta mejores tasas de maduración y fecundación *in vitro* que el ganado predominantemente *B. taurus*, debido a que sus ovocitos son más competentes con genes termotolerantes, capaces de resistir las condiciones ambientales del trópico, y que pueden llegar a desarrollarse en mayor porcentaje que el ganado *B. taurus*.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia y a la empresa GENICA y VIATECA por el financiamiento y apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AL-KATANANI, Y.; PAULA-LOPES, F.; HANSEN, P. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **J. Dairy Sci.** 85: 390-396. 2002.
- [2] ARANGUREN-MÉNDEZ, J.; YÁNEZ C., L.F. Planifique Cruzamientos. En: González-Stagnaro, C., Soto-Belloso E. (Eds). **Manejo de la Ganadería Doble Propósito**. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo-Venezuela. Capítulo II. 119-124 pp. 2005.
- [3] BÁEZ, F.; HERNÁNDEZ, L.; VILLAMEDIANA, P. Estudio estructural del huso meiótico de ovocitos bovinos vitrificados. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XVIII (3):253-268. 2008.

- [4] BARROS, C.; PEGORER, M.; MORAES, J.; EBERHARDT, B.; MONTEIRO, F. Importance of sperm genotype (*indicus* versus *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. **Theriogenol.** 65: 210-218. 2006.
- [5] BLOCK, J.; CHASE, C.C.; HANSEN, P.J. Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal vs. paternal contribution. **Mol. Reprod. Develop.** 63:32-37. 2002.
- [6] CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; SERAPIAO, R.V.; DE SA, W.F.; FERREIRA, A.M.; GUIMARAES, M.F.M.; DO VALE FILHO, V.R. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenol.** 68: 626-632. 2007.
- [7] CHOHAN, K.R.; HUNTER, A. G. *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. **Theriogenol.** 61: 373-380. 2004.
- [8] COY, P.; ROMAR, R.; PAYTON, R.R.; MCCANN, L.; SAXTON, A.M.; EDWARDS, J.L. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. **Reprod.** 129:19-26. 2005.
- [9] DUBUC-MARCHIANI, W. Animales Tropicales. **Zebuinos y Azebuados**. Espesantes S.R.L (Ed). Caracas-Venezuela. 3era Ed. 21-25 pp. 1984.
- [10] EBERHARDT, B.G.; SATRAPAA, R.A.; CAPINZAIKIB, C.R.L.; TRINCAB, L.A.; BARROS, C.M. Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. **Anim. Reprod. Sci.** 114: 54-61. 2009.
- [11] FUNAHASHI, H.; ROMAR, R. Reduction of the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes by pre-treatment of fresh spermatozoa with adenosine and a transient co-incubation of the gametes with caffeine. **Reprod.** 128:789-800. 2004.
- [12] GADEA, J.; RUIZ, P.S.; COY, A.; POTO, A.; PEINADO, B.; ROMAR, R.; CAMPOS, I.; ZUBILLAGA, O. Fecundación *in vitro* con semen congelado en la especie porcina. **Arch. Zoot.** 47: 299-304. 1998.
- [13] GILCHRIST, R.; THOMPSON, J. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenol.** 67: 6-15. 2007.
- [14] GONZÁLEZ, N.; ECHEGARAY, A.; GIL, L.; FALCETO, M.V. Efecto de 17 β -estradiol en la maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos de novillas scificadas en el matadero. **Med Vet.** 17: 173-180. 2000.
- [15] GUTIÉRREZ, C.; CIFUENTES, E.; PÉREZ, R.; ROMERO, L.; MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ, M. Transferencia de embriones fecundados *in vitro* en ganado bovino de doble propósito. **Med. Vet. Zoot. Córdoba.** 6: 52-57. 2001.
- [16] HANSEN, P. Physiology and cellular adaptations of zebu cattle to termal stress. **Anim. Reprod. Sci.** 83: 349-360. 2004.
- [17] HANSEN, P.J.; ARECHIGA, C.F. Strategies for managing the heat-stressed dairy cow. **Anim. Sci.** 77:36-50. 1999.
- [18] HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R.; IMAI, H. Bovine immature oocytes developmental competence during meiotic arret *in vitro*. **Biol. of Reprod.** 66: 1696-1701. 2002.
- [19] IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; PARAMIO, M.T. Effect of culture media on embryo development from pre-pubertal goat ivm-ivf oocytes. **Theriogenol.** 52:847-861. 1999.
- [20] LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.; CRITSER., E.; EYESTONE, W.; NORTHEY, D.; FIRST, N. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Biol. Reprod.** 36: 376-383. 1987.
- [21] LOZANO, R.R.; VÁSQUEZ, C.G.; GONZÁLEZ, P.E. Effect of heat stress and its interaction with other management and productive variables on pregnancy rate in dairy cows in Aguascalientes, México. **Vet. Méx.** 36(3): 245-260. 2005.
- [22] MARQUANT, B.; GERARD, M.; SOLARI, A.; THIBAUT, C. *In vitro* culture of bovine egg fertilized either *in vivo* or *in vitro*. **Reprod. Fert. Develop.** 29: 559-568. 1989.
- [23] MÉO, S.C.; FERREIRA, C.R.; PERECIN, F.; YAMAZAKI, W.; LEAL, C.L.V.; MEIRELLES, F.V.; GARCIA, J.M. Desenvolvimento embrionário, visualização de pronúcleos e transferência pronuclear após centrifugação de zigotos bovinos em meio com citocalasina. **Bol. de Pesq. e Dessenvolvim.** Embrapa Pecuária Sudeste. 11: 1-34. 2007.
- [24] NAGANO, M.; UCHIKURA, K.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M. Effect of duration of *in vitro* maturation on nuclear maturation and fertilizability of feline oocytes. **Theriogenol.** 69: 231-236. 2008.
- [25] PLACHOT, M. Fertilization. **Human Reprod.** 15: 19-30. 2000.
- [26] RATTO, M.; BERLAND, M.; WOLTER, M.; MATAMOROS, R. Bovine embryo development produced by *in vitro* fertilization cultured with oviductal cell or conditioned medium and transfer to recipients. **Arch. Med. Vet.** 31 (1). 1999.

- [27] ROCHA, A.; RANDEL, R.; BROUSSARD, J.; BLAIR, R.; ROUSSEL, J.; GODKE, R.; HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but no in *Bos indicus* cows. **Theriogenol.** 49: 657-665. 1998.
- [28] RODRÍGUEZ, B.; MOLINA, J.; VILLAMEDIANA, P. Sobrevivencia morfológica y progresión meiótica de ovocitos bovinos vitrificados. **Cien.** 12(2): 125-136. 2004.
- [29] ROTH, Z.; ARAV, A.; BOR, Y.; ZERON, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reprod.** 122:737-744. 2001.
- [30] ROTH, Z.; HANSEN, P. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biol. Of Reprod.** 71: 1898-1906. 2004.
- [31] ROTH, Z.; MEIDAN, R.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium sized and preovulatory bovine follicles. **Reprod.** 121: 745-751. 2001.
- [32] SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N.L.; PARRISH, J.J.; MEMILI, E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Anim. Reprod. Sci.** 3: 225-240. 2007.
- [33] SARTORI, S.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S.A.; GUENTHER, J.N.; PARRISH, J.J.; WILTBANK, M.C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J. Dairy Sci.** 85: 2803-2812. 2002.
- [34] STATISTICAL ANALISYS SYSTEM INSTITUTE (SAS). SAS/STAT User's Guide. 8.2. Cary, NC. 2001.
- [35] SUSS, U.; MADISON, V. Morphology and meiotic development of bovine oocytes culture *in vitro*. **Arch. Androl.** 11:217-218. 1983.
- [36] THATCHER, W.W.; HANSEN, P.J. Environment and reproduction. Reproduction in domesticated animals. **World Anim. Sci.** 9: 433-57. 1993.
- [37] TORRES-JUNIOR, J.R.; PIRES, M.; SA, W.F.; FERREIRA, A.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; RAMOS, A.A.; FOLHADELLA, I.M.; POLISSENI, J.; FREITAS, C.; CLEMENTE, C.A.A.; FILHO, M.F.; PAULA-LOPEZ, F.F.; BARUSELLI, P.S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenol.** 69: 155-166. 2008.
- [38] WANG, W.; HOSOE, M.; LI, R.; SHIOYA, Y. Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. **Develop Growth & Different.** 39:607-615. 1997.