

01694



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y SALUD ANIMAL**

**EFFECTO DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE EL DESARROLLO
FOLICULAR, LA FERTILIDAD, EL DESARROLLO Y CALIDAD DEL
EMBRIÓN Y LA FUNCIÓN LÚTEA EN VACAS HOLSTEIN**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

RENATO RAÚL LOZANO DOMÍNGUEZ

TUTOR: DR. EVERARDO GONZÁLEZ PADILLA

COMITE TUTORAL

**DR. CARLOS FERNANDO ARÉCHIGA FLORES
DR. ALEJANDRO VILLA GODOY
DR. CARLOS GUTIÉRREZ AGUILAR
DR. JAVIER VALENCIA MÉNDEZ**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa y mis hijas que han sido el motor y la energía para cumplir con esta meta. Por su amor, comprensión y apoyo. Gracias.

A mi madre, que en todo momento me ha apoyado.

A mis hermanos, que forman parte importante en mi vida.

Al Dr. Everardo González Padilla por su orientación en mi formación profesional y por la confianza que siempre me ha tenido. Gracias.

Una mención especial a los productores de leche del estado de Aguascalientes: Jorge Luis de Anda García y Ricardo Pérez Gómez, que sin su apoyo no hubiera sido posible realizar los trabajos de investigación que sustentan esta tesis.

En general a los productores de leche de Aguascalientes y Ciudad Delicias, Chihuahua por su colaboración desinteresada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo financiero al proyecto de investigación 31457- B.

A la Fundación Produce Aguascalientes por su apoyo financiero al proyecto de investigación.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE GRAFICAS Y CUADROS	III
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2. Alteraciones productivas, fisiológicas y metabólicas en vacas lecheras bajo condiciones de estrés calórico	3
2.1. Eficiencia reproductiva y fertilidad	3
2.2. Adaptaciones fisiológicas y mecanismos de disipación del calor	5
2.3. Variación en la producción láctea	6
2.4. Alteraciones metabólicas y su repercusión sobre la reproducción	7
2.5. Defensa celular contra el daño de especies reactivas a oxígeno	10
2.5.1. Daño celular por los radicales libres	11
2.5.2. Sistema de defensa de los antioxidantes	11
2.5.2.1. Defensa primaria	12
2.5.2.2. Defensa secundaria	12
3. Folículogénesis	13
3.1. Dinámica folicular	13
3.1.1. Fase inicial del desarrollo folicular	14
3.1.2. Fase de emergencia y selección	14
3.1.3. Fase de dominancia	16
3.2. Efecto del estrés calórico sobre el desarrollo y la calidad folicular	18
3.3. Efecto acarreado del calor sobre la esteridogénesis folicular y la calidad del folículo ovulatorio	21
4. Condiciones anovulatorias en bovinos	23
4.1. Anovulación de folículos en crecimiento	24
4.2. Anovulación de folículos en crecimiento hasta la desviación, sin alcanzar un tamaño ovulatorio	24

4.3.	Anovulación de folículos ovulatorios	25
4.4.	Anovulación en vacas lecheras en condiciones de estrés calórico	26
5.	Mecanismos de control de la función lútea	27
5.1.	Acciones de la progesterona en rumiantes	27
5.2.	Desarrollo del cuerpo lúteo	28
5.3.	Esteroidogénesis lútea	28
5.4.	Regulación trópica de la función lútea	29
5.5.	Efecto del estrés calórico sobre la función y la esteroidogénesis lútea	30
6.	Maduración y competencia del ovocito	31
6.1.	Relación ovocito – células foliculares	31
6.2.	Reinicio de la meiosis	33
6.3.	Expresión génica durante el desarrollo embrionario y la fase de transición de la dependencia del genoma de la madre a la del cigoto	35
6.4.	Competencia del ovocito	36
6.5.	Efecto del estrés calórico sobre la competencia del ovocito, la fertilización y el desarrollo embrionario	37
6.6.	Efecto de la dominancia folicular sobre la competencia del ovocito, la tasa de fertilización, el desarrollo y la recuperación embrionaria	40
6.7.	Efecto del estrés calórico sobre la fertilización y el desarrollo embrionario, en modelos de vacas superovuladas	42
7.	Mortalidad embrionaria	43
7.1.	Efecto del estrés calórico durante el desarrollo embrionario temprano	44
7.2.	Efecto del estrés calórico sobre la mortalidad embrionaria tardía	45

8. Factores que afectan la gestación en vacas receptoras de embriones	47
8.1. Efecto del estrés calórico sobre la tasa de gestación de vacas receptoras de embriones	48
9. Estrategias para eficientar la reproducción y favorecer el mantenimiento de la preñez en vacas lecheras	49
9.1. Incremento de la fertilidad por servicio	49
9.2. Mantenimiento de la gestación	54
9.3. Empleo de la transferencia embrionaria	55
9.4. Manejo nutricional	57
9.5. Modificaciones al medio ambiente	59
9.6. Aspectos genéticos	60
CAPITULO 3. FACTORES ASOCIADOS AL ESTRÉS CALÓRICO Y SU INTERACCIÓN CON LOS NIVELES DE PRODUCCIÓN DE LECHE SOBRE LA TASA DE GESTACIÓN EN SISTEMAS INTENSIVOS EN EL NORTE DE MÉXICO	61
CAPITULO 4. EFECTO DEL ESTRÉS CALÓRICO Y SU INTERACCIÓN CON OTRAS VARIABLES DE MANEJO Y PRODUCTIVAS SOBRE LA TASA DE GESTACIÓN EN VACAS LECHERAS EN AGUASCALIENTES, MÉXICO	84
CAPITULO 5. EFECTOS DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE LA FERTILIZACIÓN, DESARROLLO Y CALIDAD EMBRIONARIA EN VACAS HOLSTEIN	108
CAPITULO 6. LA TASA DE GESTACIÓN EN VACAS HOLSTEIN RECEPTORAS DE EMBRIONES ES AFECTADA POR LAS CONDICIONES DE ESTRÉS CALÓRICO DE LA PRODUCCIÓN DEL EMBRIÓN Y POR LA DE TRANSFERENCIA	129

CAPITULO 7. EFECTO DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR EN VACAS HOLSTEIN DE SISTEMAS INTENSIVOS DE PRODUCCIÓN EN AGUASCALIENTES, MÉXICO	153
REFERENCIAS	201
APENDICE I	243

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto del estrés calórico sobre el desarrollo folicular, la fertilidad, el desarrollo del embrión y la función lútea en vacas lecheras. 44,532 registros de inseminación artificial de Aguascalientes y Chihuahua fueron estudiados. Se utilizaron 60 vacas en cuatro épocas del año para evaluar el desarrollo folicular. 42 vacas fueron superovuladas para evaluar la tasa de fertilización y el desarrollo embrionario, y se utilizaron 132 vacas receptoras de embriones. Los estudios fueron realizados en épocas con o sin presencia de estrés calórico. El estrés calórico disminuyó la tasa de gestación de las vacas ($P < 0.01$) acentuándose más en vacas con mayor producción láctea ($P < 0.01$). Los porcentajes de gestación se redujeron cuando el índice temperatura – humedad fue mayor a 72 en Chihuahua y mayor a 74 en Aguascalientes ($P < 0.01$). La tasa de fertilización fue similar entre épocas de colección embrionaria ($P > 0.05$). Las vacas de época templada tuvieron una mayor colección embrionaria ($P < 0.05$). Las vacas receptoras de embriones en la época de transferencia templada tuvieron una mayor tasa de gestación ($P > 0.01$), donde los embriones producidos en época cálida tuvieron una menor habilidad para incrementarla ($P < 0.01$). Las vacas mantenidas en épocas cálidas tuvieron una pérdida de la dominancia folicular ($P < 0.01$) y un mayor número de ondas foliculares que en las de época templada ($P < 0.05$). Condiciones ambientales de estrés calórico afectan la dominancia folicular y la tasa de gestación de las vacas, deprimiéndose aún más en vacas con una mayor producción láctea.

PALABRAS CLAVE: ESTRÉS CALÓRICO, FERTILIDAD, VACAS LECHERAS

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of heat stress on the follicular development, the fertility, the development of the embryo and the luteal function in dairy cows. 44,532 registries of artificial insemination of Aguascalientes and Chihuahua were studied. In order to evaluate the follicular development 60 cows at four times of the year were used. 42 cows were superovulated to evaluate the rate of fertilization and the embryonic development, and 132 receiving cows of embryos were used. The studies were made in times with or without presence of heat stress. Heat stress diminished the rate of gestation of the cows ($P < 0.01$) accentuating itself more in cows with greater milk production ($P < 0.01$). The percentage of gestation were reduced when to index temperature - humidity was greater to 72 in Chihuahua and greater to 74 in Aguascalientes ($P < 0.01$). The rate of fertilization was similar between times of embryonic collection ($P > 0.05$). The cows of tempered time had a greater embryonic collection ($P < 0.05$). The receiving cows of embryos at the time of tempered transference had a greater rate of gestation ($P < 0.01$), where the embryos produced at warm time had a smaller ability to increase it ($P < 0.01$). The cows maintained at warm times had lost of follicular dominance ($P < 0.01$) and a greater number of follicular waves that in those of tempered time ($P < 0.05$). Environmental conditions of heat stress affect follicular dominance and the rate of gestation of the cows, depressing itself still more in cows with a greater milk production.

KEY WORDS: HEAT STRESS, FERTILITY, DAIRY COWS

LISTA DE GRÁFICAS Y CUADROS

DEL CAPÍTULO 3.

EFFECTO DEL ESTRÉS CALÓRICO Y SU INTERACCIÓN CON OTRAS VARIABLES DE MANEJO Y PRODUCTIVAS SOBRE LA TASA DE GESTACIÓN DE VACAS LECHERAS EN EL NORTE – CENTRO DE MÉXICO

GRÁFICA 1. Medias mínimo cuadráticas del porcentaje de gestación, y las medias mensuales del índice temperatura – humedad (THI) registradas a través del año

GRÁFICA 2. Porcentaje de gestación por efecto del nivel de producción láctea en vacas lecheras de la raza Holstein a través del año en sistemas intensivos de producción en el altiplano del centro – norte de México

GRÁFICA 3. Efecto del índice temperatura – humedad en el día del servicio sobre la tasa de gestación de vacas Holstein con diferente producción animal en Delicias, Chihuahua, México

CUADRO 1. Efecto del índice temperatura – humedad en el día del servicio (THIS), el número de partos, la administración de somatotropina bovina y el nivel de producción de leche estimada a 305 días (PROD) sobre tasa de gestación en vacas lecheras Holstein en el altiplano del centro – norte de México

CUADRO 2. Efecto de la interacción del índice de temperatura – humedad en el día del servicio (THIS) con la paridad de la vaca (NP) sobre la tasa de gestación de vacas Holstein lactantes en sistemas intensivos de producción en el altiplano del centro – norte de México

CUADRO 3. Medias mínimo cuadráticas de la producción de leche estimada a 305 días por efecto del número de partos, la administración o no de somatotropina bovina, número de ordeños y el tamaño de hato lechero, en vacas Holstein del altiplano centro – norte de México

DEL CAPÍTULO 4.

FACTORES ASOCIADOS DEL ESTRÉS CALÓRICO Y SU INTERACCIÓN CON LOS NIVELES DE PRODUCCIÓN DE LECHE SOBRE LA TASA DE GESTACIÓN EN SISTEMAS INTENSIVOS EN AGUASCALIENTES, MÉXICO

GRÁFICA 1. Relación entre las medias mínimo cuadráticas de la tasa de gestación, y la media mensual del índice temperatura – humedad (THI) registradas a través del año en sistemas intensivos de producción de leche del estado de Aguascalientes

GRÁFICA 2. Efecto de interacción del nivel de producción de leche estimada a 305 días y el mes de servicio sobre la tasa de gestación en vacas Holstein de sistemas intensivos de producción de leche del estado de Aguascalientes

GRÁFICA 3. Relación de la tasa de gestación y del índice temperatura – humedad en los diferentes niveles de producción láctea de vacas Holstein en Aguascalientes

CUADRO 1. Efecto del índice temperatura – humedad en el día del servicio (THIS), número de parto, la administración o no de somatotropina bovina, el número de ordeños, el nivel de producción láctea, y el tamaño del hato lechero sobre la tasa de gestación en vacas Holstein en producción en Aguascalientes

CUADRO 2. Medias mínimo cuadráticas de la producción estimada de leche a 305 días para los efectos del número de partos, la administración o no de somatotropina bovina, el número de ordeños, y el tamaño del hato en vacas Holstein de sistemas intensivos de producción en Aguascalientes

DEL CAPÍTULO 5.

EFFECTOS DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE LA FERTILIZACIÓN, DESARROLLO Y CALIDAD EMBRIONARIA EN VACAS HOLSTEIN

GRÁFICAS 1, 2 y 3. Distribución del porcentaje de vacas en relación al número de embriones y óvulos, embriones y óvulos colectados por vaca en las épocas de colección embrionaria cálida y templada en vacas Holstein

GRÁFICAS 4 y 5. Distribución de los estadíos de desarrollo y calidad de los embriones colectados en épocas cálidas y templadas en vacas Holstein

GRÁFICAS 6. Porcentaje de embriones buenos y excelentes por efecto de época de colección cálida y templada en vacas Holstein

GRÁFICA 7. Porcentaje de embriones buenos y excelentes por efecto de época de colección cálida y templada en vacas Holstein

GRÁFICA 8. Efecto de la interacción de los diferentes estadíos de desarrollo del embrión congelado (MOR – mórula; B.TEM – blastocito temprano; BLAS – blastocito maduro y B.EXP. – blastocito expandido) con la época de colección embrionaria (TEMP – templada y CAL – cálida) en la proporción de embriones buenos y excelentes en vacas Holstein

CUADRO 1. Temperatura ambiente, humedad relativa e índice temperatura – humedad (THI) registrados durante el período de colección embrionaria: época templada (9 al 17 de febrero / 2001 y del 12 al 24 de marzo / 2001) y cálida (21 de mayo al 2 de junio / 2001 y del 2 al 14 de julio / 2001) en Aguascalientes, México

CUADRO 2. Variables productivas de las vacas donadoras al inicio de la superovulación en las dos épocas de colección embrionaria

CUADRO 3. Efecto de la época de colección embrionaria sobre el porcentaje de vacas que respondieron a la superovulación (RSO), la tasa de fertilización (TFERT), las tasas de colección de embriones y óvulos (TREC) y embriones (TRE), el número de embriones y óvulos (NEO), de embriones (NE) y de óvulos (NO) y el número de cuerpos lúteos (NCL) en vacas Holstein

CUADRO 4. Porcentaje de los embriones transferibles y retrasados, grado de calidad de los embriones transferibles por efecto de época de colección embrionaria

DEL CAPÍTULO 6.

LA TASA DE GESTACIÓN EN VACAS HOLSTEIN RECEPTORAS DE EMBRIONES ES AFECTADA POR LAS CONDICIONES DE ESTRÉS CALÓRICO DE LA ÉPOCA DE PRODUCCIÓN DEL EMBRIÓN Y POR LA DE TRANSFERENCIA

CUADRO 1. Temperatura ambiente, humedad relativa e índice temperatura – humedad registrados durante la época de colección embrionaria: templada (9 al 17 de febrero / 2001 y del 12 al 24 de marzo / 2001) y cálida (21 de mayo al 2 de junio / 2001 y del 2 al 14 de julio / 2001)

CUADRO 2. Temperatura ambiente, humedad relativa e índice temperatura - humedad registrados durante las épocas de transferencia embrionaria templada (15 de enero al 27 de marzo del 2002) y cálida (1 de mayo al 17 de agosto del 2002).

CUADRO 3. Características productivas de las vacas receptoras en dos épocas de transferencia embrionaria

CUADRO 4. Temperatura corporal y concentración sérica de progesterona (P4) de las vacas receptoras, y el tiempo de transferencia en las épocas de transferencia templada y cálida

CUADRO 5. Porcentaje de gestación de las vacas receptoras de embriones por efecto de la época de producción del embrión (P), la época de transferencia (T), la interacción de P x T y la calidad del embrión transferido

CUADRO 6. Número de embriones de estadio de mórula empleados, número de vacas receptoras gestantes (n Gestantes), y las medias de las variables productivas de las vacas receptoras, como son: el número de partos (NP), días en leche (DEL), condición física (CFI), peso corporal (PINIC) y producción de leche estimada a 305 días (P305D) para los efectos de hato, época de transferencia (T), época de producción del embrión (P) y calidad del embrión (GC)

DEL CAPÍTULO 7.

EFFECTO DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE LA DINÁMICA Y LA CALIDAD FOLICULAR EN VACAS HOLSTEIN DE SISTEMAS INTENSIVOS DE PRODUCCION EN AGUASCALIENTES, MÉXICO

GRÁFICA 1. Índice temperatura–humedad en el estado de Aguascalientes en los años de 1995 a 1998. Las barras horizontales de la parte superior, señalan las épocas en que se caracterizaron los desarrollos foliculares

GRÁFICA 2 y 3. Número de ondas foliculares por época de estudio: cálida – templada (CT), templada – templada (TT), Templada – Cálida (TC) y Cálida – Cálida (CC) en vacas Holstein lactantes de Aguascalientes

GRÁFICA 4 y 5. Intervalo entre estro con dos y tres ondas foliculares durante un ciclo estral, y tasa de ovulación del folículo dominante (FD) de acuerdo a la época de estudio (templada vs cálida) en vacas Holstein lactantes del estado de Aguascalientes

GRÁFICA 6. Concentraciones séricas de la hormona folículo estimulante (FSH) para el efecto de época durante el período de estudio (EPO), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 7. Concentraciones séricas de la hormona folículo estimulante (FSH) para el efecto de número de ondas foliculares, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 8. Concentraciones séricas de la hormona folículo estimulante (FSH) , a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante el período de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 9. Concentración sérica de la hormona folículo estimulante (FSH) para el efecto de la época (EPO) durante el período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 10. Concentración sérica de la hormona folículo estimulante (FSH) para el efecto del número de ondas foliculares, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 11. Concentraciones de FSH, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante el período de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas con intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 12. Número de folículos menores de 5 mm (FPEQ) para el efecto de época (EPO) durante el estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 13. Número de folículos menores de 5 mm (FPEQ) para el efecto de número de ondas foliculares, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 14. Número de folículos pequeños (FPEQ), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la fase de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 15. Número de folículos pequeños (FPEQ) para el efecto de la época durante el período de estudio (EPO), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 16. Número de folículos pequeños (FPEQ) para el efecto del número de ondas foliculares a lo largo del ciclo estral en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 17. Número de folículos pequeños (FPEQ), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la época de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 18. Número de folículos medianos (FMED) para el efecto de época durante el período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 19. Número de folículos medianos (FMED) para el efecto de la época durante el período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 20. Número de folículos medianos (FMED) para el efecto del número de ondas foliculares, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 21. Número de folículos grandes (FGRA) para el efecto del número de ondas foliculares a lo largo del ciclo estral en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 22. Número de folículos grandes (FGRA) para el efecto de la época durante el período de estudio (EPO), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 23. Número de folículos grandes (FGRA) para el efecto del número de ondas foliculares, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 24. Número de folículos grandes (FGRA), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la época de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 25. Concentración sérica de progesterona (ng/ml) para el efecto de la época durante la época de estudio (EPO), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 26. Concentración sérica de progesterona (ng/ml) para el efecto de la época previa al estudio (TA), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 27. Concentración sérica de progesterona (P4, ng / ml) para el efecto del número de ondas foliculares a lo largo del ciclo estral en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 28. Concentración sérica de progesterona (P4, ng / ml) para el efecto de interacción de las épocas previa y durante el período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 29. Concentración sérica de progesterona (P4) para el efecto de la época durante el período de estudio (EPO), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 30. Concentración sérica de progesterona (P4) para el efecto de época previa al período de estudio (TA), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 31. Concentración sérica de progesterona (P4) para el efecto del número de ondas foliculares, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 32. Concentración sérica de progesterona (P4) para el efecto de la interacción de las épocas previa y durante el período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICAS 33, 34 y 35. Concentración sérica del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I) para el efecto del número de ondas foliculares, época de estudio y su efecto de interacción, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein

CUADRO 1. Temperatura ambiente, humedad relativa e índice temperatura – humedad registradas antes y durante el ciclo estral muestreado en las distintas épocas de estudio para evaluar el desarrollo folicular de vacas Holstein lactantes en Aguascalientes, México

CUADRO 2. Distribución de los animales en estudio con relación a las condiciones de desarrollo folicular durante el ciclo estral caracterizado en las cuatro épocas de estudio

CUADRO 3. Distribución del número de vacas por duración del ciclo estral y número de ondas foliculares, por épocas de condiciones de estrés calórico o no, antes y durante la evaluación del desarrollo folicular

CUADRO 4. Distribución del número de vacas con dos (dos OF) o tres (tres OF) ondas foliculares, con diferente duración del ciclo estral, por épocas de condiciones de estrés calórico o no, antes y durante la evaluación del desarrollo folicular

CUADRO 5. Características productivas de las 60 vacas experimentales en las que se caracterizó un ciclo estral en cuatro diferentes épocas de estudio

CUADRO 6. Medias mínimo cuadráticas, por efecto de las condiciones climáticas durante el estudio, de la emergencia (d), días de crecimiento (d) y la tasa de crecimiento (mm/día) de los folículos dominantes (FD) de la primera a la tercera emergencia (1,2) durante el ciclo estral en las diferentes épocas de estudio en vacas Holstein lactantes

CUADRO 7. Medias mínimo cuadráticas de la emergencia (d), días de crecimiento (d) y tasa de crecimiento (mm/día) de los folículos dominantes emergidos de cada onda folicular (1,2) durante el ciclo estral para el efecto de dos (dos OF) y tres (tres OF) foliculares en vacas Holstein lactantes

CUADRO 8. Medias mínimo cuadráticas de la emergencia (d), días de crecimiento (d) y la tasa de crecimiento (mm/día) de los folículos dominantes (FD) de la primera a la tercera emergencia (1,2,3) durante el ciclo estral por efecto de interacción de las condiciones climáticas antes y durante el estudio en vacas Holstein lactantes

APENDICE I. Lista de gráficas del capítulo 7 que no fueron incluidas en el artículo

GRÁFICA 1. Concentraciones séricas de la hormona folículo estimulante (FSH) para el efecto de época previa al período de estudio (TA), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 2. Concentraciones séricas de la hormona folículo estimulante (FSH) a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la época previa al estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 3. Concentración sérica de la hormona folículo estimulante (FSH) para el efecto de la época previa (TA) al período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 4. Concentraciones séricas de hormona folículo estimulante (FSH) , a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la fase previa al estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 5. Número de folículos menores de 5 mm (FPEQ) para el efecto de época (TA) previa al estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 6. Número de folículos pequeños (FPEQ), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas previa a la fase de estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 7. Número de folículos pequeños (FPEQ) para el efecto de la época previa al período de estudio (TA), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 8. Número de folículos pequeños (FPEQ), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la fase previa al estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 9. Número de folículos medianos (FMED) para el efecto de época previa al estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 10. Número de folículos medianos (FMED) para el efecto del número de ondas foliculares, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 11. Número de folículos pequeños (FMED), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la fase de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 12. Número de folículos pequeños (FMED), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas en la fase previa del estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 13. Número de folículos medianos (FMED) para el efecto de la época previa al estudio (TA), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 14. Número de folículos medianos (FMED), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la época de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 15. Número de folículos medianos (FMED), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la fase previa al estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 16. Número de folículos grandes (FGRA) para el efecto de la época durante el período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 17. Número de folículos grandes (FGRA) para el efecto de la época previa al período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 18. Número de folículos grandes (FGRA), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la fase de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 19. Número de folículos grandes (FGRA), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas en la fase previa al estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

GRÁFICA 20. Número de folículos grandes (FGRA) para el efecto de la época previa al período de estudio (TA), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 21. Número de folículos grandes (FGRA), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas de la fase previa al estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 22. Número de folículos pequeños (FPEQ), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la época de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

CAPITULO 1

I. INTRODUCCIÓN

Las explotaciones lecheras han tendido a promover una mayor producción por vaca y por lactancia, mediante la adopción de tecnología, para mejorar la administración y el manejo general del hato, lo que incluye una alimentación más intensiva y precisa, el establecimiento de medidas estrictas de medicina preventiva, y mayor presión de selección genética.

En los últimos 25 años, el incremento de la producción de leche se ha relacionado con una reducción de la fertilidad al primer servicio entre 0.5 y 1 % anual (Beam y Butler, 1999; Roche et al., 2000; Royal et al., 2000; Royal et al., 2001) con un retraso en el re-inicio de la actividad ovárica post-parto (Staples et al., 1990; Opsomer et al., 1998; Cartmill et al., 2001), del primer servicio (Faust et al., 1988) y de la concepción (Hermas et al., 1987; Washburn et al., 2002; Osen et al., 2003). Así mismo, la mayor productividad láctea se ha asociado también con un mayor porcentaje de vacas con anestros prolongados (Royal et al., 2001), con retrasos en la ovulación y la luteólisis (Royal et al., 2001). Lo que reduce la eficiencia reproductiva de los hatos lecheros (Hansen et al., 1983; Oltenacu et al., 1991; Faust et al., 1988; Butler, 1998; Lucy y Crooker, 2001; Ravagnolo y Misztal, 2001; Osen et al., 2003).

Por otra parte, la disminución de la fertilidad en vacas altas productoras de leche, también se ha relacionado con los cambios en la condición física corporal, ya que éstas tienen una mayor depresión del balance de energía al inicio de la lactancia, teniendo que movilizar sus reservas corporales para apoyar la producción láctea, lo que conlleva a una lenta recuperación de la condición corporal post-parto (Butler y Smith, 1989; Lucy et al., 1992; Nebel y McGuilliard, 1993; Macmillan et al., 1996). Es por esto, que la pérdida de la condición física y la profundidad del balance negativo de energía, se han descrito como factores de riesgo para el retraso en el reinicio de la ciclicidad ovárica (Opsomer et al., 2000).

En México, las cuencas lecheras de producción intensiva con mayor desarrollo se ubican en regiones donde la temperatura ambiente, durante los meses cálidos, pueden rebasar la capacidad de las vacas para mantenerse en condiciones no estresantes, de confort, particularmente las altas productoras. La alta tasa metabólica, asociada a la mayor producción de leche, puede tener un efecto aditivo al del estrés calórico, sobre la tasa de fertilidad al primer servicio (Al-Katanani et al., 1999; Wolfenson et al., 2000; Ravagnolo y Miztal, 2002). En algunos estudios, se observó en las vacas con mayor potencial de producción en los meses con estrés calórico, una mayor depresión de la tasa de no retorno al estro del primer servicio a 45 (Ravagnolo y Miztal, 2002) y 90 días (Al-Katanani et al., 1999).

La importancia económica de la subfertilidad en vacas lecheras, se refleja en tres vertientes: 1. Los programas reproductivos en los sistemas intensivos de producción de leche, se han establecido para obtener un intervalo entre partos óptimo, lo que representa una mayor utilidad económica (Call, 1978; Holmann et al., 1984; Funk et al., 1987; Stevenson, 1997). Si el intervalo entre partos es superior al óptimo, se incrementa la probabilidad de que el período seco sea mayor y se reduzca la producción de leche en la siguiente lactancia (Funk et al., 1987), lo que representa una pérdida potencial de la vida útil de la vaca. 2. La reducción de la fertilidad en el verano, necesariamente establece una estacionalidad de los partos (Osen et al., 2003) y de la producción, concentrándose en nuestro hemisferio en los meses de junio a diciembre del siguiente ciclo productivo. La mayor producción en esa época, en las cuencas de lechería intensiva del norte – centro de México, se suma a la que proviene de sistemas tradicionales y de doble propósito, con lo que se aumenta la oferta de leche, que reduce el precio del producto y dificulta su comercialización. 3. La subfertilidad incrementa el porcentaje de vacas problema y la probabilidad de eliminación prematura de las vacas del hato. Esto último, ha sido confirmado por varios estudios, al observar que las causas de eliminación más importantes de las vacas, han sido las afecciones del aparato reproductor, lo que representan entre el

43.8 % y el 57.4 % del total de vacas eliminadas (Talavera et al., 1973; Augstburger et al., 1988; Valdespino, 1991).

Las tendencias ya señaladas en las cuencas de producción intensiva de leche de México, hacen previsible que el estrés calórico continúe siendo un problema no resuelto, que afecta la fertilidad de los hatos y que tendrá cada vez mayor vigencia.

CAPITULO 2

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2. ALTERACIONES PRODUCTIVAS, FISIOLÓGICAS Y METABÓLICAS EN VACAS LECHERAS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS CALÓRICO

2.1. Eficiencia reproductiva y fertilidad

La subfertilidad se ha definido como una condición que impide el establecimiento de la preñez después de haberse completado la involución uterina. Se sabe que ésta característica es afectada por una gran cantidad de factores como son: la condición física, enfermedades metabólicas e infecciosas, mastitis, época de parto, producción láctea y condiciones de estrés calórico, entre otras (Scott et al., 1999; Grohn y Rajala, 2000; Wolfenson et al., 2000; Hansen, 2001).

A través de los años, en las vacas Holstein de los sistemas intensivos de producción se ha observado una reducción significativa del porcentaje de concepción en los meses calurosos del año (Stott et al., 1961; McDowell et al., 1976; Lewis et al., 1984; Cavestany et al., 1985; Silva et al., 1986; Gwasdauskas et al., 1986; Avendaño et al., 1990; Fernández, 1997; Yu et al., 1997; Lozano et al., 1999; Cartmill et al., 2001; Lozano y González, 2003), y de Holstein, Pardo Suizo y sus cruza con Cebú en clima tropical (Ingraham et al., 1971; Ingraham et al., 1975; Roman et al., 1983; El-Amin et al., 1986; Lozano et al., 1992).

Varios estudios han determinado, que el efecto del estrés calórico cinco (Ravagnolo y Misztal, 2002) y dos días antes del servicio (Ingraham et al., 1971;

Ingraham et al., 1975; Ravagnolo y Misztal, 2002), al momento del servicio (Cartmill et al., 2001; Ravagnolo y Misztal, 2002), y en los primeros tres (Ealy et al., 1993) y siete (Putney et al. 1989 c; Rivera y Hansen, 2001) días post-servicio es crítico sobre la tasa de fertilización y el desarrollo embrionario. En un estudio, mediante un análisis de regresión, se observó que por cada unidad de incremento del índice temperatura – humedad (THI) se tuvo una reducción de 0.5 % de la TNRE a 45 días (Ravagnolo y Miztal, 2002).

A pesar de conocer la relación negativa entre la fertilidad y la producción de leche, se desconoce si el efecto de interacción de la producción individual y el estrés calórico puede deprimir aún más la fertilidad en los meses calurosos del año. Se ha encontrado que la depresión de la TNRE a 45 (Ravagnolo y Mistztal, 2001) y 90 d (Al-Katanani et. al., 1999) se presentó en los meses de verano, siendo más notoria en vacas con una mayor producción láctea, donde la magnitud de la depresión osciló entre el 16 (Ravagnolo y Miztal, 2002) y el 90 % (Al-Katanani et al., 1999).

La disminución de la tasa de fertilidad en las épocas cálidas del año implica un incremento del intervalo parto – concepción y una estacionalidad de las pariciones, en los meses calurosos de primavera y verano del siguiente ciclo productivo (Osen et al., 2003). Estas estaciones de parición se han asociado con una menor concepción al primer servicio, un mayor número de servicios por concepción, un incremento en los intervalos parto-concepción y entre partos (Martin et al., 1986; Lozano et al., 1992; Osen et al., 2003) y una menor duración del estro (Gwazdauskas et al., 1981). Lo anterior, también se ha confirmado en vacas primíparas paridas en los meses de abril a junio (Faust et al., 1988). Al respecto, Cartmill et al. (2001) estimaron que por cada 10 unidades de incremento del THI al que fue expuesta la vaca en el día del parto, la fertilidad del primer servicio disminuyó de 4.1 a 4.7%, y la sobrevivencia embrionaria se redujo en un 7.1%.

2.2. Adaptaciones fisiológicas y mecanismos de disipación del calor

La intensificación de los sistemas de producción de leche impone en los animales grandes demandas fisiológicas, que sólo pueden ser satisfechas cuando existe la constitución genética adecuada y se garantiza un ambiente donde ésta pueda expresarse. La temperatura ambiental confortable para el ganado lechero ha sido estimada entre los - 5 y 20 ° C (Johnson, 1987), mientras que el umbral máximo no estresante se ha estimado entre 25 y 26 ° C (Berman et al., 1985).

Las funciones básicas del organismo explican entre el 35 y el 70 % del total de la producción diaria de calor, proporción que varía dependiendo de la cantidad, calidad y tipo de alimento consumido (Shearer y Beede, 1990b), así como del nivel de producción láctea, ya que se ha demostrado en vacas con baja (18.5 kg/d) y alta (31.5 kg/d) producción de leche, una mayor generación de calor metabólico, 27 y 48 % más que en las vacas no lactantes, respectivamente (Purwanto et al., 1990).

Si a lo anterior se le suma el incremento de la temperatura corporal y de la tasa respiratoria por efectos del calor ambiental, efecto que ha sido demostrado en vacas y vaquillas (Gwasdauskas et al., 1981; Rosenberg et al., 1982; Berman et al., 1985; Shearer y Beede, 1990 a; Shearer y Beede, 1990a; Shearer y Beede, 1990b; Gilad et al., 1993; Hansen, 1994; Howell et al., 1994; Verbeck et al., 1994; Wolfenson et al., 1995; Truth et al., 1998; Wilson et al., 1998; Roth et al., 2000; Guzeloglu et al., 2001; Umphrey et al., 2001), entonces se incrementa la posibilidad de que la vaca lechera entre en estrés calórico, que se ha definido como el límite o punto en el que el calor generado o ganado por la vaca es superior a su capacidad para eliminarlo (Hansen, 1994).

Para eliminar el calor generado y almacenado en su cuerpo, las vacas responden al estrés calórico con una reducción del consumo de alimento y de la absorción de nutrientes, con una menor actividad física, con un incremento en el consumo de agua cercano al 30 % y de los requerimientos de potasio y sodio. Así mismo, se

incrementan la tasa respiratoria, la temperatura corporal, el flujo sanguíneo periférico, la sudoración y el jadeo (Kibler, 1950; Wayman et al., 1962; Joshi, 1968; Shearer y Beede, 1990a; Shearer y Beede 1990b; Berman y Wolfenson, 1992; Hansen, 1994; Shearer y Bray, 1994; Verbeck et al., 1994; West, 1999).

2.3. Variación en la producción láctea

La capacidad productiva de la vaca lechera es afectada por el estrés calórico durante el período seco y productivo del animal. En vacas sin acceso a sombra, ni a tratamientos para mitigar el calor durante el último tercio de la gestación se ha observado una reducción del 12 % de la producción de leche de la lactancia subsecuente, con relación a lo observado en vacas con acceso a esos tratamientos (Collier et al., 1982; Wolfenson et al., 1988; Hansen, 1994).

Durante el período post-parto, la reducción del consumo de materia seca es uno de los primeros cambios que se dan en las vacas para eliminar el calor corporal en períodos de estrés calórico, y en buena medida a ello se debe la disminución de la producción láctea. Algunos estudios han observado en vacas Holstein, que estuvieron sujetas a cambios de temperatura ambiente de 18 a 29.4° C (Rousel y Chandler, 1984) o que fueron mantenidas en ambientes naturales en los meses cálidos (Wray, 1975), una reducción en la producción de leche (Rousel y Chandler, 1984) y en la producción de leche corregida a grasa (Wray, 1975).

Los efectos del estrés calórico sobre la producción han sido más críticos cuando las vacas fueron expuestas a temperatura ambiente entre 27° y 40° C (Brody, 1954; Johnson, 1983; McGuire, 1989; Wilson et al., 1998) y a una mayor radiación solar, en áreas sin sombras (Brody, 1954; Roman et al., 1977; Schneider, 1984). En estas condiciones se observó una reducción del consumo de materia seca entre el 10 y el 33% (Johnson, 1983; McGuire, 1989; Wilson et al., 1998), y de la producción láctea, entre 10.7 y 43% (Brody, 1954; Roman et al., 1977; Schneider, 1984; Wilson et al., 1998).

En un estudio realizado en Israel en sistemas intensivos de producción de leche, se observaron tres efectos estacionales sobre la producción: 1. Durante el verano, las vacas en su segundo mes de lactancia produjeron 15 % menos leche, que las vacas que tuvieron los mismos días en leche del mes de febrero. 2. Las vacas paridas en diciembre mostraron una mayor producción láctea que las paridas en junio. 3. La reducción del pico de producción de leche en el verano tiene un efecto acarreado sobre la producción de otoño (Barash et al., 2001). Esto mismo fue observado en otro estudio, donde el estrés calórico durante el pico de lactancia disminuyó la producción de leche de 2 a 4 kg / d en los primeros 4 y 5 meses de lactancia (Berman y Wolfenson, 1992).

La composición de proteína y grasa de la leche también es afectada por la alta temperatura y humedad ambiental. Se ha observado que cuando la temperatura ambiente se incrementa de 7.7 a 36 ° C, los porcentajes de grasa y proteína en la leche se reducen de 3.85 a 3.31 % y 3.42 a 2.98 %, respectivamente (Rodríguez, 1985); además, se ha demostrado una fluctuación en la producción de proteína de leche a través del año, siendo mayor en los meses de enero y febrero (1.28 kg/d) y menor en septiembre (1.1 kg/d), por lo que los autores infieren que la producción láctea y el contenido de proteína y grasa son más afectados por las variaciones de temperatura ambiental y por el fotoperíodo, que por la variación estacional en la composición de la alimentación o por la variabilidad genética de los animales (Barash et al., 2001).

2.4. Alteraciones metabólicas y su repercusión sobre la reproducción

Se ha observado en vacas expuestas a condiciones ambientales calurosas, una reducción de las concentraciones plasmáticas de somatotropina, triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) (Magdub et al., 1982; Johnson et al., 1988; McGuire et al., 1991). Esta reducción se ha relacionado con un consumo restringido de alimento, y se ha propuesto que la declinación de las concentraciones hormonales fue debida a un intento por reducir la producción de calor metabólico (McGuire et al., 1991), ya que las hormonas tiroideas tienen un efecto calorígeno al estimular el

catabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos, y el metabolismo en general, con lo que se incrementa la temperatura corporal y se activan los mecanismos disipadores de calor (Ganong, 2002).

Cuando el gasto energético es mayor al consumo, las vacas entran en un balance energético negativo (BEN), entonces utilizarán sus reservas corporales y catabolizarán glucógeno, proteínas y grasas, por estímulo de las concentraciones altas de glucagón, glucocorticoides y catecolaminas (Grummer, 1995), por lo que perderán peso corporal (Butler, 2000).

La reducción del consumo de materia seca, se ha relacionado con un BEN en vacas lecheras (Bauman y Currie, 1980; Butler et al., 1998; Kendrick et al., 1999). Las vacas con BEN tienen una mayor concentración circulante de ácidos grasos no esterificados (NEFA), que están estrechamente relacionados con el catabolismo de las grasas (Shimada, 2003). La producción tisular de los NEFA está regulada por dos lipasas activadas, el glucagón y las catecolaminas, a través de la proteincinasa A, adenilatociclasa y el adenosin monofosfato cíclico (AMPc), que catalizan la hidrólisis de los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos (Shimada, 2003; Ganong, 2002).

En vacas alimentadas con bajos niveles de energía (Armstrong et al., 2001) y con un BEN (Mihm y Bleach, 2003) se observa una menor concentración de insulina (Mihm y Bleach, 2003), de factores de crecimiento similares a la insulina tipo I (IGF-I) (Bossis et al., 2000; Armstrong et al., 2001; Mihm y Bleach, 2003) y de estradiol (E_2) (Bossis et al., 2000; Armstrong et al., 2001), que en las vacas que satisfacen sus requerimientos. Esto mismo se ha observado en vacas lecheras con BEN durante el post-parto temprano, donde la disminución de las concentraciones de IGF-I, glucosa y E_2 (Beam y Butler, 1997; Butler, 2000; Armstrong et al., 2001) se han asociado con fallas en la ovulación de las primeras ondas de desarrollo folicular post-parto y con un mayor intervalo de la primera ovulación posparto (Beam y Butler, 1997; Beam y Butler, 1998).

Si el BEN es prolongado, el glucógeno puede agotarse, y por lo tanto se incrementa la gluconeogénesis a partir de aminoácidos y glicerol. La interconversión entre aminoácidos y productos del metabolismo de los carbohidratos y grasas implica la transferencia, eliminación o formación de grupos amino. La actividad de las aminotransferasas en estas condiciones es alta, ya que participa en la movilización de las proteínas de los músculos, para liberar aminoácidos glucogénicos como precursores de glucosa (Ganong, 2002; Shimada, 2003).

En animales con BEN se ha observado una menor concentración y frecuencia de pulsos de la hormona luteinizante (LH) (Beam y Butler, 1997) y menor respuesta de las estructuras ováricas a la LH (Butler et al., 2000), por lo que se tienen menos folículos de gran tamaño (Bossis et al., 2000) y se incrementan las fallas en la ovulación (Mackey et al., 1999). Se ha sugerido, que una mayor tasa de ovulación, puede ser resultado de una acción ovárica directa por la mayor disponibilidad de glucosa e insulina. En trabajos de investigación se ha demostrado, que al aumentar la densidad energética de la dieta, se incrementa la concentración circulante de LH, insulina e IGF-I y la frecuencia de pulsos de LH. También, se ha observado una mayor respuesta del folículo a la LH, se incrementa la esteroidogénesis, la probabilidad de ovulación de los folículos dominantes y el número de folículos pequeños (Staples et al., 1990; Beam y Butler, 1998).

Por otra parte, las vacas sometidas a estrés calórico presentan alteraciones del equilibrio ácido-base sanguínea, como resultado de un cambio en los medios de disipación del calor, de no evaporativos a evaporativos. Los medios evaporativos que se activan, como sudoración y jadeo, incrementan la pérdida de CO₂ por el aparato respiratorio y se reduce la concentración sanguínea de ácido carbónico, con lo que se presenta alcalosis respiratoria (Benjamín, 1981). Como mecanismo de compensación, el organismo incrementa la excreción de bicarbonato por la orina, reduciendo la concentración sanguínea del mismo, con lo que se puede inducir una acidosis metabólica transitoria (Schneider et al., 1988).

2.5. Defensa celular contra el daño de especies reactivas de oxígeno

La sobrevivencia de las células requiere del mantenimiento de la homeostasis, que es incesantemente amenazada por estresores intra y extracelulares. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se derivan de procesos fisiológicos y metabólicos normales. El principal proceso biológico del que deriva la generación de ROS está asociado al funcionamiento de la cadena de electrones de la membrana interna de la mitocondria, durante la transferencia de electrones de NADH o FADH₂ (Byung, 1994; Prasad et al., 1997; Achim et al., 1997; Hiroko et al., 1998; Yau et al., 1998; Schwarse et al., 1998; Loeckie et al., 1999; Gannong, 2002).

Las ROS, llamadas comúnmente radicales libres, son moléculas o átomos en cuya órbita externa el número de electrones está incompleto, lo que les da una alta inestabilidad. El oxígeno se reduce a agua por la aceptación de cuatro electrones; sin embargo, con la reducción de un electrón, varios radicales libres y agua pueden ser formados, como son: superóxido (O₂⁻), hidroxilo (-OH), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), hidroperóxido (HO₂), entre otros (Byung, 1994; Yau, 1998).

Los complejos de ubiquinona – citocromo b, son los sitios con la mayor generación de O₂⁻, donde la mayoría de los O₂⁻ producidos en la mitocondria son convertidos a H₂O₂, por la actividad de la superoxido dismutasa. El H₂O₂ mitocondrial puede escapar de la acción de la dismutasa y salir al citosol (Byung, 1994; Achim et al., 1997; Yau, 1998)

Las enzimas superoxido dismutasa (SOD), catalasa (CT) y la glutaciona peroxidasa (GSH-P_x) reducen las ROS, y neutralizan el efecto dañino de los radicales libres en la célula. Estas substancias, agrupadas en el sistema de defensa de antioxidantes para proveer una máxima protección celular, están localizadas no solamente en la mitocondria, sino también en compartimentos de otros organelos celulares (Byung, 1994; Yau, 1998).

Existen otras sustancias antioxidantes, como las vitaminas A, C, E, glutatión, taurina, alfa tocoferol, ceruloplasmina, transferina y selenio, entre otros, que actúan reduciendo las ROS y/o dando protección celular en diferentes niveles (Ealy et al., 1992; Ealy y Hansen, 1994; Aréchiga et al., 1994; Aréchiga et al., 1995).

2.5.1. Daño celular por los radicales libres

La peroxidación de los ácidos grasos polinsaturados involucra tres procesos definidos como: iniciación, propagación y terminación. La iniciación, usualmente procede con la formación de conjugados por substracción de átomos de hidrógeno; la propagación de la peroxidación lipídica, realiza la interacción del oxígeno molecular con el carbón central de los radicales libres, para formar hidroxiperóxidos lipídicos, cuyos radicales son capaces de generar reacciones adicionales y propagar la peroxidación. Con la peroxidación lipídica de la membrana celular y de los organelos intracelulares, ocurren cambios importantes, que alteran la cohesión del arreglo de la bicapa lipídica y su estructura organizacional. Se ha establecido, que los principales ácidos grasos de la membrana que sufren esta peroxidación son el ácido linoleico y el ácido araquidónico (Ross y Maludus, 1991; Prasad et al., 1997).

Con la oxidación de los aminoácidos, las proteínas invariablemente tienen cambios en su configuración, los que han sido categorizados en fragmentación, agregación y la susceptibilidad a la digestión proteolítica. Se ha determinado, que aproximadamente 20 tipos de moléculas de ácido desoxiribonucleico (ADN), han sido alterados por la acción de las ROS, entre ellos el ADN mitocondrial (Yau, 1998; Loeckie et al., 1999).

2.5.2. Sistemas de defensa de los antioxidantes

Los sistemas de defensa de los antioxidantes se han clasificado en dos niveles (Davies, 1988).

2.5.2.1. Defensa primaria

Los antioxidantes como la vitamina A, C y E, la glutatona y las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas participan en este nivel de protección celular. La vitamina E es liposoluble, y está asociada con las membranas ricas en lípidos, como la mitocondria y el retículo endoplásmico; ésta es altamente efectiva para proteger a la membrana contra la peroxidación lipídica por reacción con O_2^- y el radical alcaxyl RO (Ross y Maldus, 1991; Prasad et al., 1997). La vitamina C, reduce las ROS (O_2^- , OH- y varios dihidroxiperoxidos) y ofrece una efectiva protección de la membrana plasmática a la peroxidación lipídica, además se encarga de restaurar las propiedades antioxidantes de la vitamina E (Byung, 1994). La glutatona, un tripéptido, es el antioxidante más abundante que interactúa con numerosas ROS (Ealy et al., 1992; Ealy y Hansen, 1994; Aréchiga et al., 1995; Aréchiga, 1998).

La superóxido dismutasa (SOD) se clasifica de acuerdo al metal que contenga (Mn, Cu, Fe). En la mitocondria la predominante es SOD unida a Mn, y en compartimientos del citosol, las que predominan son SOD-Cu y SOD-Zn (Byung, 1994). La catalasa es el principal antioxidante primario que cataliza la conversión de H_2O_2 a agua (Cheng et al., 1981). Estas dos enzimas tienen afinidad por diferentes sustratos, donde la presencia de bajos niveles de peróxidos orgánicos son preferentemente procesados por la peroxidasa; mientras, en altas concentraciones de peróxido, la enzima dominante es la catalasa. La glutatona peroxidasa, localizada en el citosol y la matriz mitocondrial, cataliza la reducción de H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos (Byung, 1994).

2.5.2.2. Defensa secundaria

En este nivel de defensa, las células tienen varias enzimas lipolíticas y proteolíticas, responsables de la reconstrucción del daño o alteración de los constituyentes de la membrana. La peroxidación de las membranas lipídicas estimula la acción lipolítica de la fosfolipasa A2 y provee a las células adyacentes de mecanismos protectores contra la peroxidación lipídica. Se sugiere, que la

fosfolipasa A2 interviene en la remoción de los ácidos grasos dañados de la membrana lipídica, y podría ser un proceso efectivo para mantener la integridad de la membrana (Ross y Maldus, 1991; Prasad et al., 1997). Por su parte, las enzimas proteolíticas degradan muchas proteínas alteradas en la célula, por lo que existen complejos proteicos multicatalíticos (Byung, 1994; Prasad et al., 1997).

3. FOLICULOGÉNESIS

La foliculogénesis es un proceso de crecimiento continuo y de regresión de la mayoría de los folículos antrales, lo que permite el desarrollo de un folículo preovulatorio. La foliculogénesis esta regulada por una serie de factores intra y extraováricos, que dependiendo del estadio del folículo, modifican su desarrollo y la esteroidogénesis, regulando la expresión génica. La interacción de señales endócrinas y los factores intraováricos determinará si el folículo se desarrolla y ovula, o entra en fase de atresia y apoptosis.

3.1. Dinámica folicular

La dinámica folicular en su fase de crecimiento final se ha clasificado en tres etapas: emergencia, selección y dominancia. En vacas y vaquillas Holstein, se ha observado que el folículo dominante no ovulatorio crece en forma lineal, se mantiene estático por algunos días y después inicia su regresión, lo que ha sugerido que la existencia de las ondas foliculares es un fenómeno bien controlado, con una relación temporal consistente, entre la emergencia de la onda folicular y el inicio de la regresión del folículo dominante anovulatorio (Ginther et al., 1989a; Findlay, 1994; Roche, 1996; Adams, 1999; Ireland et al., 2000; Driancourt, 2001; Ginther et al., 2001).

Los patrones de crecimiento folicular en bovinos durante un ciclo estral, se caracterizan por tener entre dos y cuatro ondas foliculares. En cada una se desarrolla un folículo dominante y un número variable de folículos más pequeños que sufren atresia (Sirois y Fortune, 1988; Driancourt, 2001). En varios estudios,

realizados en vaquillas (Ginther et al., 1989 a) y vacas lactantes (Ginther et al., 1989 b; Trough et al., 1998; Wilson et al., 1998; Towson et al., 2002) se ha observado que el incremento del número de ondas foliculares en el ciclo estral, se asocia con una extensión de la fase lútea y del período entre celos.

3.1.1. Fase inicial del desarrollo folicular

El desarrollo folicular inicial en las fases preantral y antral temprana se caracteriza por la mitosis e incremento de capas de las células de la granulosa. Esta fase de desarrollo inicial está regulada por factores de crecimiento, de acción autócrina y parácrina, que inducen cambios en la expresión génica de los folículos (Monget y Monniaux, 1995; McNatty et al., 1999; Ethier y Findlay, 2001; Weeb et al., 2003). En las células de la granulosa, se da una expresión génica (mRNA) para receptores de hormona folículo estimulante (FSH), y en las células de la teca se da una expresión de mRNA para receptores de hormona luteinizante (LH), citocromo p450 c17 (P450c17), P450 scc y 3 β -dihidro hidroxí isomerasa (3 β -HSD). Por ende, en las células de la teca los principales esteroides sintetizados son la pregnenolona, progesterona y androstenediona (McNatty et al., 1999; Driancourt, 2001; Ethier y Findlay, 2001; Weeb et al., 2003).

3.1.2. Fase de emergencia y selección

Se ha definido la emergencia como el reclutamiento de un grupo de folículos dependientes de las gonadotropinas, que permite que al menos uno de ellos llegue a ser dominante y tenga oportunidad de ser ovulado (Roche, 1996; Driancourt, 2001; Weeb et al., 2003). La emergencia está precedida de un incremento de los niveles de FSH, cuyo pico se alcanza, cuando los folículos reclutados tienen un diámetro de alrededor de 4 mm (Adams, 1999). Posteriormente, en las células de la granulosa de folículos de 4 a 6 mm, se da la expresión de mRNA para la P450scc y la P450 aromatasas, evento importante para que continúen su desarrollo (Mc Natty et al., 1999; Webb et al., 2003).

En la fase de selección se ha observado en las células de la teca, una mayor expresión de mRNA para receptores de LH y para las enzimas esteroidogénicas, 3 β -HSD y la proteína transportadora del colesterol (StAR); conforme el tamaño folicular es mayor, la expresión del mRNA para StAR se incrementa (Bao et al., 1998; Fortune et al., 2001). También, en las células de la teca y de la granulosa, se detecta la expresión de mRNA para las subunidades alfa y beta de activina e inhibina (Driancourt, 2001). La activina en las células tecales ejerce una regulación autócrina y parácrina negativa sobre la expresión génica de la enzima P450 17c y por ende, en la producción de androstenediona. Mientras que en las células de la granulosa incrementa la síntesis de receptores para FSH en las granulosas (Findlay, 1993; Mihm et al., 1998; Ethier y Findlay, 2001) y potencializa la aromatización de los andrógenos, estimulada por la FSH (Ethier y Findlay, 2001).

Varios estudios han confirmado la importancia de la LH en la fase de selección. Esta comienza de 36 a 48 h después del inicio de la emergencia de la onda folicular (Bao et al., 1998; Ginther et al., 2001) y se caracteriza por una mayor diferencia en la tasa de crecimiento de los dos folículos de mayor tamaño, y por una interrupción del crecimiento del resto de los folículos (Ginther et al., 1996). En esta fase, es donde se da la transferencia de la dependencia de FSH a LH, característica de los folículos dominantes. Cuando ocurre este cambio, la secreción pulsátil de LH es indispensable para continuar el desarrollo folicular y mantener la competencia ovulatoria de los folículos seleccionados. El nadir de la concentración de FSH, se da después de la selección, y entonces la cantidad circulante de esa hormona es insuficiente para mantener el crecimiento de los folículos pequeños, pero suficiente para continuar el crecimiento de los folículos seleccionados (Gong et al., 1996; Mihm et al., 1998; Bao et al., 1998; Adams, 1999; Ginther et al., 2000; Driancourt, 2001; Ginther et al., 2001; Webb et al., 2003).

Ginther et al. (2001) observaron en vacas, que tratamientos con progesterona (P₄) después de la fase de selección, tienen un efecto negativo sobre las

concentraciones de FSH y LH, por lo que se reduce el diámetro del folículo de mayor tamaño y las concentraciones de E_2 y de IGF-I en el fluido folicular. Eso denota el papel importante de la LH en el crecimiento y función de los folículos seleccionados. En esa fase, la mayor frecuencia de pulsos de LH promueve el aumento de la concentración de E_2 e IGF-I libre en el fluido folicular (Savio et al., 1990; Ireland y Roche, 1993; Evans et al., 1997; Yuan et al., 1998; Fortune et al., 2001; Ginther et al., 2001; Webb et al., 2003) y la síntesis de cantidades importantes de inhibina. El E_2 y la inhibina disminuyen las concentraciones circulantes de FSH y por lo tanto se evita la emergencia y el crecimiento de ondas foliculares subsecuentes (Findlay, 1993; Roche, 1996; Evans et al., 1997; Driancourt, 2001; Ginther et al., 2001).

3.1.3. Fase de dominancia

La dominancia se ha definido como el proceso donde se dan una serie de mecanismos, a través de los cuales el folículo dominante sufre un rápido desarrollo y suprime el crecimiento de otros folículos. En esta fase, en las células de la teca, por acción de LH y E_2 , se da la expresión de mRNA para receptores de LH (Roche, 1996; Driancourt, 2001) y para las enzimas esteroideogénicas, P450 alfa hidroxilasa, StAR y 3β -HSD. Mientras, en las células de la granulosa, se expresa el mRNA para P450arom. Durante la fase de dominancia se reduce la unión de IGF-I a proteínas ligadoras del IGF (IGFBP), y por ende, hay mayor biodisponibilidad del factor de crecimiento. De hecho, en esta fase del folículo se inicia el bloqueo de expresión de los genes que codifican las IGFBP (Monget y Monniaux, 1995; Roche, 1996; Mihm et al., 1998; Yuan et al., 1998; Lucy, 2000; Driancourt, 2001).

Varios estudios han observado que la cauterización del folículo dominante, en el día 3 ó 5 del ciclo estral (Adams et al., 1992; Ginther et al., 2000) o su aspiración (Díaz et al., 2001), incrementa las concentraciones de FSH horas después, siendo este evento el responsable del re-establecimiento del crecimiento de los folículos subordinados de la primera onda folicular, del retraso de la atresia de otros

(Adams et al., 1992) y del incremento del número de folículos medianos dos días después del tratamiento (Díaz et al., 2001). Esto es parte de la evidencia que demuestra, que el folículo dominante suprime el crecimiento de los folículos subordinados, a través de la secreción de estradiol, inhibina y otros factores intraováricos, que reducen la secreción de FSH (Ginther et al 1989 a; Adams et al., 1992; Ginther et al., 2000; Díaz et al., 2001; Driancourt, 2001).

En la esteroidogénesis intervienen una serie de reguladores extra e intraováricos. La LH, apoyada por efectos parácrinos de IGF-I e inhibina, estimula la síntesis de P450 17 α hidroxilasa, con lo que se incrementa la producción de androstenediona (Driancourt, 2001; Webb et al., 2003). En las células de la granulosa, por acción de FSH, se incrementa la síntesis de follistatina y la actividad de las proteasas, que hidrolizan las IGFBP, con lo que la biodisponibilidad de IGF-I es mayor. El IGF-I incrementa la sensibilidad de las células de la teca y de la granulosa a las gonadotropinas, a través de la inducción de síntesis de receptores para FSH y LH. La FSH actúa sinérgicamente con el IGF-I para aumentar la esteroidogénesis y la síntesis de inhibina (Monget y Monniaux, 1995; Roche, 1996; Lucy, 2000; Driancourt, 2001; Webb et al., 2003).

Los reguladores extraováricos, como la insulina y la hormona del crecimiento, a través de la síntesis de IGF-I estimulan la proliferación de las células de la teca y de la granulosa y la esteroidogénesis. Hormonas como el factor de crecimiento epidermal, el factor de crecimiento de los fibroblastos, citocinas e IGF-I regulan la diferenciación de las células de la teca y de la granulosa, de manera coordinada con los mecanismos determinados por el AMPc como segundo mensajero, inducidos por las gonadotropinas (Monget y Monniaux, 1995; Roche, 1996; Lucy, 2000; Driancourt, 2001).

Se ha demostrado, que la maduración del folículo dominante es bloqueada por niveles altos de progesterona, que suprimen la secreción de la LH (Sirois y Fortune, 1988; Savio et al., 1988; Savio et al., 1990 a; Evans et al., 1997; Adams,

1999). En varios estudios, se ha observado que la tasa de crecimiento del folículo dominante de una segunda onda folicular es menor en la fase lútea, que la observada en los folículos dominantes de la primera y tercera onda folicular; lo anterior, debido al efecto de retroalimentación negativa de la progesterona sobre la secreción de las gonadotropinas (Sirois y Fortune, 1988; Savio et al., 1988; Savio et al., 1990 a; Savio et al., 1990 b; Evans et al., 1997; Ginther et al., 2001).

Al momento de la luteólisis, se incrementa la frecuencia de pulsos de LH, el folículo dominante inicia una fase de crecimiento final con mayor producción de estradiol (Savio et al., 1988; Roche, 1996; Evans et al., 1997; Mihm et al., 1998) e incrementa su capacidad para ser ovulado (Savio et al., 1990). Así mismo, se ha observado que el tamaño del folículo ovulatorio tiene una relación negativa con el intervalo luteólisis - onda de secreción de la hormona luteinizante, lo que ha sugerido que la longitud del proestro y el intervalo entre el tratamiento con un luteolítico y la manifestación del estro, están determinados por el tamaño del folículo preovulatorio (Sirois y Fortune, 1989).

La atresia del folículo dominante se inicia entre el 4^o y 6^o día de la dominancia. En ese momento, en las células de la granulosa y de la teca todavía es alta la síntesis de mRNA para receptores de LH y para las enzimas esteroideogénicas (P450 aromatasa, P450scc, 3 β -HSD, P450c17, P450 aromatasa y StAR). En el proceso de atresia declina la actividad de esas enzimas y se pierde la actividad esteroideogénica de los folículos (Monget y Monniaux, 1995; Roche, 1996; Evans et al., 1997; Bao et al., 1998; Driancourt, 2001; Webb et al., 2003), al tiempo que se incrementa la síntesis de las IGFBP (Monget y Monniaux, 1995; Yuan et al., 1998).

3.2. Efecto del estrés calórico sobre el desarrollo y la calidad folicular

Se ha descrito un efecto del estrés calórico sobre la emergencia, selección y dominancia folicular; así como sobre la calidad de los folículos ovulatorios. Estudios realizados durante el verano en Florida, E.U., e Israel, en los primeros ocho (Badinga et al., 1993) y 12 días del ciclo estral (Wolfenson et al., 1995) de

vacas Holstein en su última fase de lactancia (11 a 13.5 meses en ordeña, y de 12.7 a 16 l de leche / d) (Badinga et al, 1993; Wolfenson et al., 1995) y en su lactancia temprana (2 meses en ordeña y 36 l / d) (Wolfenson et al., 1995), mostraron una reducción del diámetro y del fluido folicular del folículo dominante y un incremento del diámetro del folículo subordinado (Badinga et al., 1993); el diámetro máximo del folículo dominante se alcanzó más rápidamente y se detectó una emergencia más temprana del folículo que finalmente ovuló (Wolfenson et al., 1995).

En estudios realizados en vacas lactantes con 60 a 110 días en leche, llevadas a estrés calórico en cámaras climáticas, del 11° al 21° (Trough et al., 1998) o del 13° al 21° (Wilson et al., 1998 a) día del ciclo estral, se observó un incremento en el número de folículos pequeños entre los días 11 y 15, y del 20 al 21 del ciclo estral (Trough et al., 1998), una reducción de la tasa de crecimiento del folículo dominante emergido de la segunda onda folicular y del tamaño del folículo dominante preovulatorio (Wilson et al., 1998 a). También se ha descrito una reducción del porcentaje de vacas que mostraron ovulación del folículo dominante de la segunda onda folicular, en comparación con lo observado en las vacas mantenidas en termoneutralidad (Wilson et al., 1998 a). Los datos anteriores, fueron interpretados como un efecto del estrés calórico que comprometió la función del folículo dominante, la ovulación y el mecanismo luteolítico (Trough et al., 1998; Wilson et al., 1998 a). Además de asociarse la pérdida de dominancia folicular con un mayor número de ondas foliculares y con un ciclo estral más extendido (Trough et al., 1998).

El efecto del estrés calórico sobre la dominancia folicular se ha observado también en vacas no lactantes (Guzeloglu et al., 2001) y vaquillas Holstein (Wilson et al., 1998 b), ocasionando una reducción del diámetro del folículo dominante, el incremento del número de folículos pequeños y grandes en el ciclo folicular subsecuente (Guzeloglu et al., 2001), al igual que el tamaño del folículo subordinado entre los días 14 a 22 del ciclo estral (Wilson et al., 1998 b). El estrés

calórico reduce la dominancia folicular (Guzeloglu et al., 2001) y la calidad folicular (Wilson et al., 1998 a), quizá debido a una menor secreción de inhibina (Guzeloglu et al., 2001). Aparentemente la lactancia amplifica el efecto del estrés calórico sobre el desarrollo folicular (Wilson et al., 1998 b).

Recientemente, en vacas con promedio de 90 días post-parto y producción de 35 kg de leche/d, expuestas a radiación solar directa sin sistemas de mitigación, durante un ciclo estral completo se observó una emergencia temprana de la segunda onda folicular, como resultado de la reducción de la dominancia del folículo dominante emergido de la primera onda folicular (Roth et al., 2000). La emergencia temprana del folículo dominante de la segunda onda folicular se ha relacionado con un incremento del número de folículos mayores de 10 mm de la primera onda folicular, con una reducción del número de folículos de 6 a 9 mm entre los 7 y 10 días del ciclo estral (Wolfenson et al., 1995) y con un incremento de la concentración sérica de FSH del 8º al 13º día del ciclo estral (Roth et al., 2000). Se ha sugerido que la emergencia temprana del folículo dominante preovulatorio, da como resultado la ovulación de folículos de mayor edad (Wolfenson et al., 1995; Roth et al., 2000).

Se ha demostrado un efecto retrasado del estrés calórico, con un marcado incremento de la secreción de FSH y de la reducción del número de folículos de tamaño medio en los primeros 10 días del siguiente ciclo estral en condiciones de termoneutralidad, lo que fue relacionado con las bajas concentraciones plasmáticas de inhibina cuando estuvo presente el estrés calórico en un ciclo estral previo (Roth et al., 2000).

En la época cálida se ha incrementado la proporción de vacas que presentaron dos o más cuerpos lúteos, comparado con lo observado en vacas de época templada, lo que puede ser resultado de una falla de la dominancia del folículo preovulatorio en las épocas cálidas (Ryan et al., 1993). Esto, pudiera estar relacionado con lo observado en vacas en condiciones de estrés calórico, las

cuales presentaron crecimiento de dos o más folículos grandes y altas concentraciones de FSH durante la primera onda folicular y la última fase del ciclo estral (Roth et al., 2000).

En vacas bajo condiciones de estrés calórico se puede afectar la función folicular y lútea (Rosenberg et al., 1982; Wolfenson et al., 1993; Howell et al., 1994), por las alteraciones que sufren las células de la teca y de la granulosa, y el mismo ovocito (Badinga et al., 1993; Wolfenson et al., 1997; Roth et al. 2000; Guseloglu et al., 2001). En vacas (Wilson et al., 1998) y vaquillas (Gwasdauskas et al., 1981) mantenidas en condiciones de estrés calórico en cámaras climáticas, se ha observado una menor concentración sérica de E₂ durante el proestro y el estro, lo que posiblemente esta relacionado con cambios en las enzimas esteroidogénicas (Wilson et al., 1998).

3.3. Efecto acarreado del calor sobre la esteroidogénesis folicular y la calidad del folículo preovulatorio

Si se toma en cuenta que el período requerido para que un folículo antral pequeño (0.13 mm) llegue a un estado preovulatorio (8.5 mm) es de aproximadamente de 41.5 días (Lussier, 1987), es muy probable que en condiciones normales, muchos folículos preovulatorios del inicio del otoño pudieron ser afectados en su desarrollo inicial por las altas temperaturas del verano, y que sean inferiores en calidad a los que completan todo su desarrollo en confort térmico.

Se han realizado estudios con la finalidad de evaluar los posibles efectos de acarreo del estrés calórico sobre la esteroidogénesis folicular. En vacas Holstein lactantes con producción láctea entre 10 y 15 l / d expuestas al calor durante el verano, se observó en el día siete del ciclo estral una menor concentración de estradiol y androstenediona en el fluido folicular del folículo dominante, que lo observado en vacas que no estuvieron expuestas al calor. Los autores concluyeron que esta diferencia estacional en la esteroidogénesis, puede deberse a un efecto directo del estrés sobre el ovario, o indirecto a través de una reducción

del consumo de alimento o a modificaciones en la secreción de las gonadotropinas (Wolfenson et al., 1997).

En vacas Holstein lactantes expuestas a estrés calórico en un ciclo estral, se observó, en los primeros 10 días del siguiente ciclo estral en condiciones de termoneutralidad, un marcado incremento de la secreción de FSH y una reducción del número de folículos de tamaño medio, lo que fue asociado con las bajas concentraciones de inhibina observadas en el ciclo previo. Los autores proponen que los efectos inmediatos y la respuesta retrasada al estrés calórico en la fertilidad de las vacas, podrían ser explicados por este mecanismo (Roth et al., 2000).

En estudios realizados, en vacas Holstein lactantes (Roth et al., 2001 b) y no lactantes (Guzeloglu et al., 2001) expuestas a estrés calórico durante todo el verano (Roth et al., 2001 b) o solamente durante un ciclo folicular (Guzeloglu et al., 2001), se observó un incremento de los folículos no saludables (Guzeloglu et al., 2001), una reducción de la calidad del cúmulo ovigero (Roth et al., 2001 b) y del desarrollo embrionario (Roth et al., 2001 b; Guzeloglu et al., 2001). Así mismo, se demostró, que la eliminación de los folículos que tuvieron parte de su desarrollo en condiciones de estrés calórico, mediante tratamientos repetidos con factor liberador de las gonadotropinas (GnRH) o mediante la aspiración frecuente de los folículos mayores de 5 mm (Gozeloglu et al., 2001) y de 3 a 7 mm (Roth et al., 2001 b) durante varios ciclos estrales, permitió el desarrollo de folículos de mejor calidad y mejoró el porcentaje de embriones que, derivados de ellos en condiciones *in vitro*, llegaron hasta el estadio de blastocito, en comparación con lo observado en los folículos del grupo de vacas no tratadas.

No se sabe el mecanismo exacto por el cual el estrés calórico puede afectar a los folículos y a los ovocitos, pero se ha descrito, que se produce un daño en la comunicación intercelular entre las células granulosas, del cúmulo y el ovocito (Roth et al., 2001a; Al-Katananni et al., 2002), se afecta la competencia del ovocito

para ser fertilizado (Sartori et al., 2002; Al-Katananni et al., 2002), se altera el contenido proteico del fluido folicular (Ambrose et al., 1999), la viabilidad de las células de la granulosa y de la teca interna, y se producen cambios en la esteroidogénesis (Wolfenson et al., 1993; Wolfenson et al., 1997; Roth et al., 2001a).

Se sugiere que la capacidad biosintética de las células foliculares es susceptible al estrés calórico, y aunque la diferencia en la respuesta al calor entre las células de la granulosa y de la teca se desconoce, puede estar relacionada a la diferenciación temprana de las células tecales, ya que la androstenediona puede ser producida aún en folículos antrales pequeños (Wolfenson et al., 1997), mientras que la actividad de la aromatasa de las células granulosas la adquieren en folículos de tamaño medio (McNatty et al., 1984).

Por la información anterior, se deduce que algunos folículos pudieran ser afectados aún antes de su reclutamiento por el estrés calórico, y que esto pueda ser el mecanismo para que se prolonguen los efectos del calor, aún a los meses con condiciones ambientales más confortables.

4. CONDICIONES ANOVULATORIAS EN BOVINOS

Como se describió en el capítulo de foliculogénesis, la emergencia de la onda folicular y el crecimiento hasta antes de la selección son principalmente regulados por FSH. La concentración de FSH disminuye paulatinamente, hasta que alcanza el nadir al momento de la desviación del crecimiento folicular; en este momento, el crecimiento y la producción de estradiol del folículo requieren de la secreción de LH. El folículo dominante continúa desarrollándose y produciendo estradiol hasta alcanzar niveles suficientes para inducir una onda de LH y la ovulación. Se ha descrito un modelo de crecimiento folicular para clasificar las condiciones anovulatorias en vacas. Cada clasificación se asocia con un patrón diferente de desarrollo folicular.

4.1. Anovulación de folículos en crecimiento

En ganado Cébú en los primeros meses después del parto, en un porcentaje alto de vacas, el diámetro máximo de los folículos apenas alcanza 6 mm de diámetro, pero con períodos de dominancia relativamente largos (Ruiz y Olivera, 1999), por lo que las vacas tienen períodos anovulatorios con folículos pequeños. En esta condición, los tratamientos con GnRH no tienen efecto alguno; sin embargo, los tratamientos con FSH generan incrementos en el crecimiento folicular, por lo que se especula de una posible deficiencia de FSH (Kulick et al., 1999).

4.2. Anovulación de folículos en crecimiento hasta la desviación, sin alcanzar un tamaño ovulatorio

Esta condición ocurre frecuentemente en vaquillas prepúberes (Evans et al., 1994; Melvin et al., 1999) y en vacas lecheras lactantes en el posparto temprano (Beam y Butler, 1997; Beam y Butler, 1998). Al diagnóstico clínico, los ovarios son pequeños, con ausencia de un cuerpo lúteo o de folículos ovulatorios; sin embargo, se dan los patrones de ondas de crecimiento folicular.

En el post-parto temprano de vacas lecheras, se da un aumento de la concentración de FSH, causado probablemente por la disminución de la concentración de estradiol. El aumento de FSH induce la emergencia de una onda folicular en la primera semana post-parto (Ginther et al., 1996). Si los requerimientos nutricionales de las vacas lecheras en ésta etapa, son debidamente satisfechos, el primer folículo dominante del post-parto ovula en alrededor del 75% (Savio et al., 1990 c). Sin embargo, éste porcentaje, generalmente es menor en hatos lecheros, ya que la primera ovulación se da alrededor de los 30 días post-parto, cuando la mayoría de las vacas están en BEN (Beam y Butler, 1998). En vacas lecheras, el folículo dominante de la primera onda folicular después del parto generalmente no alcanza el tamaño ovulatorio. Cuando se acerca el momento de la primera ovulación post-parto, el diámetro máximo del folículo dominante se incrementa (Stagg et al., 1995).

Un balance de energía negativo o problemas patológicos pueden prolongar el período del parto a la primera ovulación en vacas lecheras, y esto generalmente se asocia con la disminución del diámetro máximo del folículo dominante (Short et al., 1990; Butler, 2000). En vacas lecheras lactantes se tiene un período de BEN durante las primeras semanas post-parto, y el tiempo de la primera ovulación está relacionado con el momento del nadir del BEN (Staples et al., 1990; Beam y Butler, 1998). Un bajo consumo de materia seca y el BEN pueden causar un estado en que los niveles bajos de estradiol observados durante la desviación del crecimiento folicular, inhiben la secreción pulsátil de GnRH hipotálmica, y por ende la secreción de LH, lo que evita la ovulación (Mackey et al., 1999; Beam y Butler, 1997; Butler, 2000; Bossis, 2000).

Es claro el efecto limitativo del BEN sobre el desarrollo folicular y la ovulación. Un balance de energía positivo, se relaciona con el incremento de la secreción de LH (Beam y Butler, 1997), el aumento del diámetro máximo del folículo dominante y la producción de E₂ (Butler, 2000; Bossis, 2000). Sin embargo, existen otros factores sistémicos o locales que pueden jugar un papel muy importante sobre las células foliculares, como son el IGF-I, la insulina, la glucosa y la leptina, que son regulados por el estado nutricional del animal (Lucy, 2000; Spicer et al., 2000; Driancourt, 2001). Se ha demostrado, que en vacas lecheras que un aumento del consumo de energía, incrementa la concentración de LH, insulina e IGF-I, la frecuencia de pulsos de LH, la respuesta del folículo a la LH, la esteroidogénesis, la probabilidad de ovulación de los folículos dominantes y el número de folículos pequeños (Staples et al., 1990; Beam y Butler, 1998).

4.3. Anovulación de folículos ovulatorios

Los folículos que alcanzan diámetros mayores a 25 mm de diámetro y que persisten por más de 10 días, generalmente se denominan quistes foliculares y coexisten con concentraciones bajas de P₄ (Garverick, 1997). En estas condiciones puede darse el crecimiento de otros folículos, que no alcanzan el tamaño de uno quístico, pero que también son anovulatorios (Gutiérrez, 1999).

Las ondas de crecimiento folicular existen en vacas con quistes foliculares, que son precedidas por elevaciones de la concentración de FSH, como se observa en condiciones fisiológicas normales (Hamilton et al., 1995). Trabajos realizados con programas de sincronización del estro y la ovulación en vaquillas con quistes foliculares, han demostrado que la falta de ovulación se debe a la falla de la secreción pulsátil de GnRH y LH (Pursley et al., 1995 b).

La concentración media y la frecuencia y amplitud de pulsos de FSH no difieren entre vacas con procesos ovulatorios o no (Cook et al., 1991; Ribadu et al., 2000; Driancourt, 2001), pero en vacas que solo desarrollan folículos no ovulatorios es mayor la concentración de estradiol circulante (Hamilton et al., 1995; Yoshioka et al., 1998). En este tipo de vacas, la concentración promedio, la amplitud y la frecuencia de pulsos de LH son mayores a lo observado en vacas con folículos ovulatorios (Cook et al., 1991; Hamilton et al., 1995). La etiología de los grandes folículos anovulatorios parece deberse a la falta de una gran onda de secreción pulsátil de LH, en respuesta a las altas concentraciones de estradiol (Ribadu et al., 1999; Gumen y Wiltbank, 2000).

4.4. Anovulación en vacas lecheras en condiciones de estrés calórico

Varios trabajos han documentado un efecto del estrés calórico sobre el número de embriones colectados en vacas Holstein superovuladas (Monniaux et al., 1983; Monty y Racowsky, 1987; Bernal et al., 1999) o no (Ayalon et al., 1988; Ryan et al., 1993).

En un estudio realizado en Arabia Saudita, en vacas Hostein no superovuladas bajo condiciones de estrés calórico y con un promedio 110 días en leche, se observó una menor tasa de recuperación embrionaria (6 a 7 días de edad) en la época cálida (44.7%), que lo mostrado en la época templada (54.0%), lo que fue relacionado con una posible falla en la colecta de los ovocitos en la fimbria y con un incremento de vacas que presentaron doble ovulación (Ryan et al., 1993). Esto mismo, fue observado en otro estudio, donde además los autores infirieron que

menor colecta de embriones podría deberse a una posible degeneración del ovocito en el oviducto o a un disturbio en su transporte (Ayalon et al., 1988).

En vacas superovuladas expuestas a condiciones de estrés calórico se observó un menor número de embriones colectados en la época cálida, aún cuando tuvieron una respuesta superovulatoria aceptable. Se infirió que la menor colecta podría estar relacionada con una mayor tasa de anovulación, con ovulaciones retrasadas (Monty y Racowsky, 1987) y con una elevada respuesta superovulatoria (Monniaux et al., 1983).

Se ha demostrado que la función tiroidea juega un papel importante en el proceso de ovulación. En vacas Brahman superovuladas e inducidas a tener un hipotiroidismo, se observó una reducción de los porcentajes de colección embrionaria y un incremento en el número de folículos luteinizados, sin afectar la calidad de los embriones. Los autores concluyeron que la maduración folicular y la ovulación son afectadas en vacas con una menor concentración de las hormonas tiroideas, y que esto puede interferir con la secreción de la hormona luteinizante y con la respuesta ovárica a esa hormona (Bernal et al., 1999). Lo anterior, se confirmó al evaluar la calidad folicular en vacas con hipotiroidismo, las cuales mostraron en folículos anovulatorios de todos los tamaños un aumento de la relación $P_4 : E_2$ en el fluido folicular (Burrow, 1978, Bernal et al, 1999).

5. MECANISMOS DE CONTROL DE LA FUNCIÓN LÚTEA

5.1. Acciones de la progesterona en rumiantes

La mayoría de las acciones de P_4 , se regulan a través de la transcripción de genes específicos de receptores, que modulan la expresión de los elementos de respuesta en el ADN (Karus y Katzendlenbom, 1993; Alberts, 1998; Karp, 1998; Ing y Tomesi, 1997).

La P_4 inhibe la expresión génica para receptores de E_2 , con lo que se minimizan las acciones de esa hormona (West et al., 1987), además la P_4 actúa como un

factor de diferenciación del endometrio (Cummings y Yochim, 1984). La P₄ durante la fase lútea incrementa los patrones de secreción de proteínas del endometrio, que apoya el desarrollo del embrión en su fase temprana (Maslar et al., 1986; Strinden y Shapiro, 1983) e inhiben la mitosis de las células endometriales (Padykula et al., 1989). Así mismo, la P₄ induce la quiescencia del miometrio a través de una disminución de la expresión de genes que codifican subunidades de canales dependientes de calcio (Tezuka, et al., 1995).

Durante la fase lútea, la P₄ disminuye la frecuencia pulsátil y la concentración de LH. En el hipotálamo, la P₄ bloquea la secreción de GnRH (Attardi y Happe, 1986), mientras en la hipófisis, reduce la expresión génica de los receptores para GnRH (Bauer et al., 1995), la secreción de LH en respuesta a GnRH (Janovick y Conn, 1996), la expresión de genes que codifican la subunidad β de LH y de FSH (Brann et al., 1993) y de la subunidad α , común para estas gonadotropinas (Brann et al., 1993; Attardi et al., 1997).

5.2. Desarrollo del cuerpo lúteo

Además de las células esteroideogénicas, el cuerpo lúteo está compuesto de células endoteliales, sanguíneas y fibroblastos (Channig, 1969). Una característica en su desarrollo temprano es su crecimiento acelerado y la rápida proliferación de las células que lo forman (Farin et al., 1986; Jablonka et al., 1993), donde las células granulosas dan lugar a las células lúteas grandes (CLG), y las de la teca forman a las células lúteas pequeñas (CLP). La LH (Grazul et al., 1995), la hormona del crecimiento (HC) (Juengel et al., 1995), los factores de crecimiento de fibroblastos y de crecimiento endotelial – vascular (Karp, 1998) regulan el crecimiento y la multiplicación de las células lúteas. El crecimiento es resultado del incremento del volumen de las CLG, y un incremento del número de las CLP, de los fibroblastos y de las células endoteliales (Farin et al., 1986).

5.3. Esteroidogénesis lútea

El colesterol, substrato para la esteroidogénesis, es transportado en forma de lipoproteínas de alta (LPA) y de baja (LPB) densidad a los tejidos esteroideogénicos

(Pate y Condon, 1982). Las células luteas internalizan las LPB a través de endocitosis mediada por receptores (Brown y Golstein, 1986; Karp, 1998). Dentro de la célula, los lisosomas disocian el complejo receptor - LPB y hacen disponible el colesterol para ser procesado.

El colesterol puede utilizarse directamente en la esteroidogénesis, en la formación de esteres de colesterol o para integrarse a la membrana celular (Alberts, 1998; Karp, 1998). El paso de la esteroidogénesis controlado por la proteincinasa A (PKA) para proveer de colesterol libre a la célula, es la hidrólisis de los esteres de colesterol por la colesterol esterasa (Caffrey et al., 1979; Alberts, 1998; Karp, 1998).

El transporte del colesterol de la membrana externa a la membrana interna de la mitocondria (Stevens et al., 1993) es regulado por un segundo mensajero (Simpson y Waterman, 1983) y se requiere de una proteína reguladora de la esteroidogénesis (StAR) (Lin et al., 1995). Así mismo, se requiere de receptores mitocondriales y ligandos endógenos para este receptor (Papadopoulos et al., 1997).

En la matriz mitocondrial, el colesterol a través de la acción de las enzimas esteroidogénicas, P450 scc y adrenodoxina reductasa es transformada a pregnenolona que es transportada al retículo endoplásmico liso, en donde por acción de la 3 β -HSD es transformada a P₄ (Karp, 1998). Se ha descrito, que la concentración de P₄ depende de la cantidad del tejido esteroidogénico y de su capacidad de síntesis, y se asocia a cambios de la expresión génica de receptores para LPB, LPA, LH, HC, IGF-I, prostaglandinas (PG) y para la síntesis de las proteínas esteroidogénicas (StAR, P450 scc y 3 β -HSD) (Niswender et al., 2000).

5.4. Regulación trópica de la función lútea

La secreción pulsátil de LH, indispensable para una adecuada función lútea, activa la adenilciclase e incrementa la concentración de AMP c, que a su vez activa la

(PKA) (Hoyer et al., 1984; Davis et al., 1996; Alberts, 1998; Karp, 1998). La LH actúa en tres frentes: 1). La PKA activa la colesterol esterasa y la proteína StAR, incrementando el colesterol libre y el transporte del mismo a la membrana interna de la mitocondria. 2). Facilita el transporte del colesterol y la síntesis de P_4 , al inducir la síntesis de StAR, P450 scc y 3β -HSD. 3). Se asocia a la síntesis de receptores de benzodiazipina en la membrana mitocondrial, que internaliza el colesterol a la matriz mitocondrial (Karp, 1998; Niswender et al., 2000).

La HC (Liebermann y Schams, 1994) e IGF-I (McArdle y Holtorf, 1989; Parmer et al., 1991; Sauerwien et al., 1992) son importantes para el mantenimiento de la producción de cantidades altas de P_4 en las células lúteas. La HC puede actuar a través de sus receptores de membrana asociados a tirosina cinasa (Argentsinger et al., 1993; Karp 1998; Alberts, 1998) e incrementa la expresión de mRNA de receptores para IGF-I en las células lúteas (Perks, et al., 1995; Juengel et al., 1997). El IGF-I incrementa la actividad del inositol trifosfato (IP3), que actúa como segundo mensajero para la secreción de P_4 , al modificar el funcionamiento del citoesqueleto (Alberts, 1998; Karp, 1998).

En el cuerpo lúteo se producen grandes cantidades de PG, de las series I y E durante la fase lútea temprana. La PGI_2 se une a sus receptores presentes en las células lúteas grandes e incrementa el AMP c. La PGE_2 incrementa el AMP c y probablemente activa la PKA, aún cuando sus efectos no son del todo conocidos (Niswender et al., 2000).

5.5. Efecto del estrés calórico sobre la función y esteroidogénesis lútea

En vacas Holstein expuestas a estrés calórico durante el verano (Howell et al., 1994) o en cámaras climáticas (Wilson et al., 1998) se ha observado una menor concentración sérica de P_4 del 6º al 18º día del ciclo estral (Howell et al., 1994) y una mayor extensión de la fase lútea (Wilson et al., 1998).

Se han realizado estudios para evaluar el efecto de acarreo del estrés calórico, del verano al otoño, sobre la función lútea. En un estudio realizado en vacas Holstein expuestas durante dos meses a condiciones climáticas del verano, se observó que los cuerpos lúteos colectados los días 11 y 16 del ciclo estral, tenían un menor número de células lúteas y que éstas tuvieron una menor producción de P_4 cuando fueron incubadas con LH, en comparación con lo observado en los cuerpos lúteos de vacas que se mantuvieron en las condiciones climáticas del invierno. La menor capacidad de síntesis de progesterona de los cuerpos lúteos en el verano, pudiera reducir la capacidad de mantenimiento de la preñez en esas condiciones (Wolfenson et al. 1993).

6. MADURACIÓN Y COMPETENCIA DEL OVOCITO

El estado dictiatio en que se mantiene el ovocito es extremadamente importante, ya que es en éste, cuando el ovocito crece, madura y adquiere la capacidad para reanudar la meiosis (Sorensen y Wassarman, 1976), requisitos indispensables para la fertilización y el inicio del desarrollo embrionario (First et al, 1988). El ovocito en la adquisición de su competencia para sea fertilizado y se de el inicio del desarrollo embrionario ocurren diversos cambios citoplasmáticos, como la transcripción de mensajeros de ácido ribonucleico (mRNA) (Farin y Yang, 1992), modificaciones post-transduccionales (Levesque y Sirard, 1995) y cambios estructurales (Hyntell et al., 1986). Durante el crecimiento del ovocito dentro del folículo, muchos genes se expresan (Schultz, 1996) y algunos de sus productos están involucrados en la progresión meiótica, el control del ciclo celular y la activación del genoma embrionario (Watson et al., 1999).

6.1. Relación ovocito – células foliculares

Se ha sugerido que las proteínas secretadas por los ovocitos y las células foliculares están involucradas en un ciclo regulatorio granulosa-ovocito (Taft et al., 2002), donde las proteínas secretadas por las células foliculares son importantes para la maduración y el desarrollo de la competencia del ovocito para ser fertilizado, y las derivadas de los ovocitos son requeridas para el desarrollo

folicular (Buccione et al., 1990; Dong, 1996; Arlotto et al., 1996; Moor y Dai, 2001; Vozzi et al., 2001).

Las células de la granulosa y el ovocito se comunican entre sí, a través de uniones comunicantes (Anderson y Albertini, 1976; Vozzi et al., 2001). La pérdida de comunicación puede ser la responsable del reinicio de la meiosis, ya que las células foliculares son fuente importante de AMP c, que incrementa la síntesis de ácido hialurónico y la interrupción del contacto entre las células foliculares y el ovocito (Larsen et al., 1986).

El factor de crecimiento de diferenciación-9 (GDF-9) producido por el ovocito, tiene un efecto parácrino que estimula el desarrollo del folículo primario y suprime la expresión del gen Kilt en las células de la granulosa, que codifica el mRNA kit ligando (KL), importante regulador de la ovogénesis y la foliculogénesis. La FSH estimula la expresión de Kilt en las células de la granulosa del folículo preantral y antral temprano, donde su producto KL promueve el crecimiento del ovocito y su maduración citoplasmática (Driancourt et al. 2000; Reynaud et al., 2000).

Se ha descrito que el factor de crecimiento Bmp15 producido por el ovocito, exhibe una expresión similar a GDF-9 y es importante para el desarrollo folicular (Davis et al., 1992), por lo que podría darse un sinergismo de GDF-9 y Bmp15 durante el desarrollo del folículo y del ovocito (Yan et al., 2001). En los ovocitos completamente desarrollados, se ha demostrado que la secreción de uno o más factores parácrinos como GDF-9 y Bmp15, promueven la proliferación de las células de la granulosa de folículos antrales pequeños (Li et al., 2000).

La onda preovulatoria de las gonadotropinas induce una cascada de procesos que permiten habilitar la ovulación del folículo. Los ovocitos completamente desarrollados secretan un factor habilitador de la expansión del cúmulo (CEEf), que habilita a las células de la granulosa a responder a la FSH para producir ácido hialurónico (Eppig, 2001), que a su vez permite que se inicie la hidratación de los

espacios entre las células del cúmulo (Chen et al., 1993; Chen et al., 1996). Otro estudio, describió que el GDF-9 promueve la expansión del cúmulo, por lo que probablemente la GDF-9 y CEEF son idénticos (Elvin et al., 1999). Los factores parácrinos del ovocito (Joyce et al., 2001) y el GDF-9 (Elvin et al., 1999) incrementan la expresión del gene prostaglandina-sintetasa 2 (Ptgs2) de las células de la granulosa y del cúmulo.

6.2. Reinicio de la meiosis

La meiosis es en esencia la segregación de los cromosomas para producir gametos haploides. El proceso consiste en dos ciclos de separación de los cromosomas: la primera división meiótica separa el par de cromosomas; mientras, en la segunda son producidos los gametos haploides (Karp, 1998).

La onda preovulatoria de las gonadotropinas es la responsable de la reanudación de la meiosis del ovocito. Adicionalmente, se inducen cambios en el complejo de las células del cúmulo ovígeno y el ovocito (COC), donde éste último avanza hasta la metafase II, proceso llamado maduración nuclear (Karp, 1998). El factor promotor de la maduración (FPM) es el disparador de la maduración del ovocito y está estructurado por dos subunidades: una catalítica, la cinasa dependiente de las ciclinas (P34^{cdc2}) y otra reguladora, la proteína ciclina. El heterodímero P34^{cdc2} - ciclina induce la mitosis de las células. Sin embargo, la asociación de P34^{cdc2} - ciclina no es suficiente para desarrollar su actividad cinasa. El FPM requiere de la fosforilación de la ciclina y la actividad de cinasas y fosfatasa que modifican la P34^{cdc2} (Lee y Nurse, 1987; Karp, 1998). La proteína fosfatasa cdc25 juega un papel importante en la activación y la modulación del FPM en la fase M del ciclo celular (Liebfried, 1996; Karp, 1998).

Los mecanismos que explican la maduración meiótica no están completamente entendidos. La mayoría de las hipótesis indican que la maduración inducida por las gonadotropinas es estimulada por un incremento de mensajeros intracelulares, AMP c o calcio (Ca²⁺). En la maduración meiótica del ovocito, el adenosin trifosfato

promueve el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, el cual es liberado de los almacenes intracelulares (Webb et al., 2002). Otros estudios, describen un incremento transitorio de fosfatidilinositol (PPI), del que se deriva el fosfatidil inositol trifosfato (IP3), evento relacionado con la ruptura de la envoltura nuclear del ovocito (Deguchi y Osani, 1995; Ciapa et al., 1994). Lo anterior, sugiere que con la movilización de calcio por sistemas PPI se regula la entrada a la meiosis.

En estudios realizados *in vitro* se ha observado que el COC cultivado con factores de crecimiento, como el de desarrollo epidermal y el similar a la insulina tipo I por un período de 16 horas, una aceleración del ciclo celular meiótico de los ovocitos y la extrusión del primer corpúsculo polar, lo que puede estar relacionado con una mayor actividad de la cinasa H1 y de la actividad de la MAP cinasa durante el estadio temprano de la maduración (Sakaguchi et al., 2002).

Es posible que el segundo arresto meiótico, que ocurre entre la ovulación y la fertilización, sea mantenido por un factor citostático (CSF) en la metafase II. El oncogene *mos* se expresa en la fase de transición G2 / M, cuyo producto es una proteína, que tiene el mismo efecto del CSF, el cual desaparece inmediatamente después de la fertilización (Sagata et al., 1989; Minshull, 1993). El oncogene *mos* puede ser activado por la MAP cinasa, que tiene por si misma cierta actividad de CSF (Haccard et al., 1995).

La MAP cinasa es activada por factores de crecimiento (Marshall, 1995) durante la maduración del ovocito, y su actividad se mantiene durante el arresto de la segunda división meiótica (Kubiak et al., 1993). Se ha sugerido que la MAP cinasa es responsable de que se mantenga condensada la cromatina, y se suprima la fase S durante la segunda división meiótica. A *mos* y MAP cinasa se les han atribuido dos funciones: suprimir la fase S y generar en la metafase II un bloqueo de los mecanismos endógenos que generan incrementos transitorios de Ca^{2+} (Ciapa et al., 1994; Whitaker, 1996; Karp, 1998).

La fertilización incrementa transitoriamente el calcio intracelular, que es el disparador de la liberación del arresto meiótico (Deguchi y Osani, 1994). El incremento de calcio activa la calmodulina, y ésta a la CaM cinasa II, que a su vez regula la degradación de la ciclina y de mos (Lu y Means, 1993; Whitaker, 1996; Karp, 1998). Otra teoría, que se maneja en torno a la degradación de las ciclinas, es que éste proceso es activado por la P34^{cdc2} (Felix et al., 1990).

6.3. Expresión génica durante el desarrollo embrionario y la fase de transición de la dependencia del genoma de la madre a la del cigoto

La expresión génica en el desarrollo embrionario temprano se divide en dos fases: la primera se caracteriza por la dependencia de macromoléculas maternas heredadas del ovocito. Los mecanismos post-traduccionales de la expresión génica son principalmente utilizados por los ovocitos maduros y el embrión en su fase temprana, para llevar a cabo las funciones necesarias en estos períodos. La segunda fase se caracteriza por la activación del genoma embrionario (Leibfried, 1996). Estas dos fases están separadas en un punto crítico durante el desarrollo del embrión, el cuál ocurre en el estadio de ocho células en bovinos y ovinos (Barnes y First, 1991).

El ovocito, durante la ovogénesis, adquiere un programa materno de almacén de moléculas de información. Después que el ovocito primario sale del grupo de las células germinales, se inicia una síntesis y acumulación intensiva de mRNA, proteínas y organelos celulares, que serán empleados para la complementación de la meiosis, la fertilización, inicio de la división celular y probablemente para la activación del genoma embrionario (Leibfried, 1996; De Souza et al., 1998).

Los mRNA y las proteínas almacenadas por el ovocito son degradados durante el desarrollo embrionario temprano, por lo que el embrión necesita empezar a utilizar su propia información genética (Barnes y Eyestone, 1990). Los mRNA o las proteínas derivados del programa materno son los causantes de la transición materno – cigoto de la expresión génica, donde la regulación post-traducciona

RNA polimerasa o de factores de transcripción pueden permitir la activación del genoma embrionario (Hartl et al., 1993).

Cuando el embrión entra al lumen del útero, ya éste se encuentra en la fase de transición materno-cigoto de la expresión génica. Los factores liberados por las células epiteliales secretoras del útero pueden influir en dicha transición, ya que se han encontrado ligandos y receptores de factores de crecimiento en el embrión y en las células uterinas (Schultz et al., 1993). A los que el embrión responde incrementando la síntesis de DNA, mRNA y proteínas (Erickson, 1995). El embrión bovino incorpora algunos mecanismos que regulan el inicio de su expresión génica, como se ha evidenciado por la secreción de la proteína α -amanitin, que alarga el período G2 en la fase de cuatro células, que es seguido por el incremento de nuevas transcripciones en la fase de ocho células (Barnes y First, 1991).

Se ha descrito que la competencia del ovocito para ser fertilizado puede estar en función de la presencia o abundancia de transcritos específicos de mRNA maternos (Sylvie, 2002) y que el tiempo de la primera división celular está relacionado con el estado de poliadenilación de los transcritos (Brevini et al., 2000).

6.4. Competencia del ovocito

La competencia es la última prueba de calidad del ovocito, que se ha definido por la habilidad del ovocito para ser fertilizado, se desarrolle el embrión hasta el estadio de blastocito y se establezca la preñez (Lonergan et al., 2001). El desarrollo de la competencia es adquirido durante la foliculogénesis y en el período de maduración del ovocito (Krisner, 2004), y se ha relacionado con una serie de cambios estructurales y moleculares (Assey et al., 1994; Hyttel et al., 1997).

La adquisición de la competencia se logra hasta que esté completamente formado el antrum de la unidad folicular (Arlotto et al., 1996; Pavlok et al., 1992; Lonergan et al., 1994). Se ha informado que en los ovocitos aspirados de folículos dominantes, antes de darse la onda de LH, se dan alteraciones en la morfología nuclear y citoplasmática (Assey et al., 1994) y se tiene una menor expresión transcritos (Knijn et al., 2002). Los autores han inferido, que los ovocitos de folículos pequeños no han complementado la maduración citoplasmática y esto puede reflejar las deficiencias en la acumulación de mRNA y proteínas, que se han considerado como requisitos indispensables para la adquisición del desarrollo de la competencia (Pavlok et al., 1992; Lonergan et al., 1994; Assey et al., 1994; Abe et al., 1999; El Razeck et al., 2000; Hnijn et al., 2002),

En los ovocitos madurados y fertilizados *in vivo*, se ha demostrado un alto porcentaje de desarrollo embrionario hasta la fase de blastocito, comparado con lo observado en ovocitos madurados y fertilizados *in vitro*. Esto ha sugerido que los eventos alrededor de la fertilización pueden ser importantes para el desarrollo de la competencia (Rizos et al., 2002). El envejecimiento del ovocito puede ocurrir en el folículo o después de la ovulación, en el arresto de la segunda división meiótica. Si los eventos de ovulación y fertilización no se dan en un tiempo determinado, se puede inhabilitar la expresión del programa materno almacenado, reducir el desarrollo embrionario y la habilidad del embrión para mantener la gestación (Aktas et al., 1995; Leibfried, 1996).

6.5. Efecto del estrés calórico sobre la competencia del ovocito, la fertilización y el desarrollo embrionario

Estudios de fertilización *in vitro* con gametos de bovinos, han descrito que los eventos que ocurren antes y durante la fertilización son sensibles a las altas temperaturas, estos eventos incluyen: la reacción acrosómica, la maduración nuclear de los óvulos y la fertilización (Lenz, 1983). En ovocitos bovinos, la exposición al estrés calórico por un período de 12 a 24 horas altera la maduración

citoplasmática y la distribución de los gránulos corticales en el citoplasma (Payton et al., 2001).

Zeron et al. (2001) encontraron que durante el verano las células de la granulosa y los ovocitos de vacas Holstein, tienen un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados, en comparación con el invierno, cuando los ácidos grasos polinsaturados y monoinsaturados fueron los que predominaron. Estas observaciones indican que las altas temperaturas cambian las propiedades de la membrana y alteran la maduración citoplasmática, lo que podría explicar, al menos en parte, la menor habilidad del ovocito para ser fertilizado y para desarrollar un embrión hasta el estadio de blastocito en los meses cálidos del verano.

La exposición de ovocitos a 41 ° C durante nueve horas al momento de la fertilización, reduce la proporción de los que se fertilizan, de los inician la división celular y de los que tienen un desarrollo embrionario hasta blastocito. Sin embargo, estos efectos sobre el ovocito y el desarrollo embrionario no se observaron cuando la exposición al calor fue de 40 ° C (Rivera y Hansen, 2001). No se ha descrito un mecanismo preciso por el cual el estrés calórico pueda afectar el cúmulo ovigero y como este efecto pueda persistir del verano al otoño. Se ha demostrado, que temperaturas críticas durante la maduración del ovocito con su cúmulo ovigero, no altera el inicio de la división celular, pero si reduce el número de ovocitos fertilizados que se desarrollan a blastocito (Edwards, 1996).

Varios estudios *in vitro*, han indicado un posible efecto acarreado del estrés calórico sobre la maduración y capacitación del ovocito, que afecta la tasa de fertilización y el desarrollo posterior del embrión. En vacas Holstein, que durante el verano tuvieron acceso a tecnología para aminorar el estrés calórico 42 días antes del sacrificio, se observó que la competencia de los ovocitos colectados de los dos folículos de mayor tamaño, no fue afectada para ser fertilizados ni para completar las primeras divisiones embrionarias, pero si se afectó el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocito. Esto mismo, se observó en ovocitos colectados de

folículos de menor tamaño. La depresión de la calidad del ovocito fue evidente en las vacas Holstein durante el verano, por lo que el estrés calórico pudo haber comprometido la capacidad del ovocito para su desarrollo temprano, involucrando la reducción de la síntesis y almacenamiento de proteínas, y una alteración en la activación de los sistemas intracelulares necesarios para apoyar el desarrollo embrionario (Al-Katanani et al. 2002 b).

En folículos de 0.5 a 1 mm de diámetro se ha encontrado un efecto acarreado del estrés calórico, del verano al otoño, sobre la esteroidogénesis de las células de la teca y de la granulosa, y se infiere que se produce un daño en la comunicación intercelular entre las células de la granulosa, del cúmulo y el ovocito, que puede dañar la competencia de éste último para ser fertilizado (Roth et al., 2001 a), alterándose el contenido de proteínas de unión del factor de crecimiento parecido a la insulina – I (Ambrose et al., 1999 a) o de las hormonas esteroideas del fluido folicular (Wolfenson et al., 1997).

Sartori et al. (2002) observaron, en vacas Holstein no superovuladas mantenidas en condiciones de estrés calórico durante el verano, una pérdida de la competencia del ovocito para ser fertilizado, ya que al evaluar los ovocitos no fertilizados colectados en el día siete post-inseminación, éstos tuvieron un número suficiente de accesorios espermáticos en la zona pelúcida, similar a lo observado en vacas mantenidas en termoneutralidad.

Cuando se estudió el efecto del estrés calórico en vaquillas Holstein superovuladas y expuestas a 41 ° C por un período de 10 h al inicio del estro, se observó una tasa de fertilización y recuperación embrionaria similar con respecto a lo observado en vacas mantenidas en termoneutralidad, pero se incrementó el porcentaje de embriones retrasados en su desarrollo y disminuyó la calidad de los mismos (Putney et al., 1989). Aparentemente, en las vacas en condiciones de estrés calórico, se reduce la viabilidad y capacidad de los ovocitos para cumplir sus funciones normales, lo se relaciona con una menor tasa de fertilización (Rivera

y Hansen, 2001; Sartori et al., 2002) y con un menor desarrollo y calidad de los embriones, que a partir de ellos se producen (Putney et al., 1989; Rivera y Hansen, 2001).

Se ha observado, en vacas *Bos taurus* expuestas a estrés calórico, una declinación de la calidad de los ovocitos y del desarrollo embrionario. Incluso, ovocitos que fueron considerados como normales, presentaron una menor tasa de fertilización y de desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocito, que lo observado en ovocitos de razas con una adaptación conocida a regiones de clima cálido, lo que puede ser indicativo de la existencia de un factor intrínseco del ovocito, que pueda explicar las diferencias entre las razas tolerantes y las menos tolerantes al calor (Rocha et al., 1998).

6.6. Efecto de la dominancia folicular sobre la competencia del ovocito, la tasa de fertilización, el desarrollo y la recuperación embrionaria

En vacas lecheras en condiciones de estrés calórico se altera la eficiencia de selección folicular y se presenta una emergencia temprana del folículo preovulatorio, que puede comprometer su calidad al dar lugar a la ovulación de folículos de mayor edad emergidos de una segunda onda folicular (Badinga et al., 1993; Wolfenson et al., 1995; Trough et al., 1998; Wilson et al., 1998; Roth et al., 2000). Se ha establecido, tanto en vaquillas *Bos taurus* especializadas para la producción de carne (Breuel et al., 1993; Sanchez et al., 1993; Mihm et al., 1994; Sánchez et al., 1995; Revah y Butler, 1996) como en vacas lactantes y vaquillas Holstein (Cooperative Regional Research Project NE-161, 1996; Ahmad et al., 1995) una relación negativa de la dominancia folicular con la tasa de fertilidad.

La inducción de un folículo persistente en ausencia de un cuerpo lúteo, se acompaña de un incremento de la concentración de 17β -estradiol (Sánchez et al., 1993; Savio et al., 1993; Sanchez et al., 1995), de la secreción media y de la frecuencia pulsátil de la hormona luteinizante, y del diámetro del folículo ovulatorio (Savio et al., 1993; Sánchez et al., 1995). Otros estudios, han mostrado una

relación negativa de las concentraciones plasmáticas (Breuel et al., 1993) y del fluido folicular (Smith et al., 1996) de E_2 con la tasa de crecimiento del folículo y una relación positiva del E_2 con el diámetro del folículo preovulatorio.

En vacas con folículos persistentes inducidos por más de seis u ocho días se ha observado una reducción de la tasa de concepción y del porcentaje de ovocitos que fueron fertilizados y desarrollados hasta el estadio de blastocito (Breuel et al., 1993; Sánchez et al., 1993; Savio et al., 1993; Sánchez et al., 1995; Smith et al., 1996), que en aquellas que presentaron un folículo pre-ovulatorio de 7.5 mm y niveles bajos y no prolongados de E_2 (Breuel et al., 1993). Por lo que la competencia del ovocito y los embriones producidos a partir de ellos se afectan en los folículos estrogénicamente más activos (Smith et al., 1996).

En folículos con un mayor período de crecimiento, se ha observado una expansión de las células del cúmulo ovígero y la dispersión de la cromatina en el citoplasma del ovocito por la ruptura de la envoltura nuclear. Características que difieren de las observadas en folículos en crecimiento, que presentaron el cúmulo compacto y una vesícula germinal intacta (Revah y Butler, 1996). Lo anterior, se asocia con las observaciones de que en vacas con folículos persistentes, hay un incremento de la muerte embrionaria en estadios entre dos y ocho células (Ahmad et al., 1995).

Los defectos adquiridos en el ovocito por un incremento de la frecuencia pulsátil de LH y por las altas concentraciones de estradiol, pueden alterar su maduración e inducir la reanudación prematura de la meiosis, con lo que el ovocito, aunque retiene la capacidad de ser fertilizado, reduce su competencia para desarrollar un embrión normal después de la fertilización (Ahmad, 1995; Breuel et al., 1993; Smith et al., 1996; Revah y Butler, 1996).

En vacas productoras de carne no lactantes inducidas a tener un folículo persistente y altas concentraciones de estradiol seis días antes del estro, se observó una reducción de la tasa de recuperación de óvulos y embriones

comparado a lo observado en las vacas con folículos en crecimiento (Ahmad et al., 1995). En modelos superovulatorios en vacas Holstein, la remoción del folículo dominante 48 horas antes de iniciar los tratamientos con FSH, ha demostrado un efecto benéfico al promover el crecimiento folicular e incrementar la tasa de ovulación y la producción de embriones, mediado quizá por la eliminación de la retroalimentación negativa ejercida por la inhibina del folículo dominante a nivel de la hipófisis y por acciones directas de factores intra-ováricos (Kim et al., 2001). Cuando se utilizan tratamientos superovulatorios con FSH aparentemente se anula cualquier efecto inhibitorio sistémico que pudiera ejercer el folículo dominante, ya que la respuesta ovulatoria y la cantidad de embriones colectados fue similar en vacas con o sin presencia de un folículo dominante (Diaz et al., 2001).

Entre los factores que podrían ser responsables de la reducción de la tasa de fertilidad conforme se prolonga la dominancia folicular, se encuentran: 1. La mayor producción de E_2 podrían causar cambios intrafoliculares que influyen sobre la maduración y la capacitación del ovocito, e impiden que los ovocitos puedan ser fertilizados o que se presenten alteraciones en el desarrollo embrionario temprano. 2. La mayor producción de E_2 determina un incremento de la frecuencia pulsátil de la hormona luteinizante, que se asocia con la reanudación de la meiosis y la ovulación de un ovocito con mayor estado de madurez que lo normal (Epigg, 1991; Breuel et al., 1993; Sanchez et al., 1993; Mihm et al., 1994; Ahmad et al., 1995; Sánchez et al., 1995; Cooperative Regional Research Project NE-161., 1996; Revah y Butler, 1996).

6.7. Efecto del estrés calórico sobre la fertilización y el desarrollo embrionario, en modelos de vacas superovuladas

Uno de los modelos utilizados para investigar los efectos del estrés calórico sobre la fertilización en vacas, ha sido la colección y evaluación embrionaria en ciclos normales o después de tratamientos superovulatorios. Estudios realizados en vaquillas Holstein superovuladas expuestas a 41° C por 10 h al inicio del estro en

cámaras climáticas, no mostró efecto alguno sobre el número de cuerpos lúteos, el número de embriones colectados o las tasas de fertilización y de recuperación embrionaria (Putney et al., 1989b). Esto mismo se ha observado en vaquillas Holstein superovuladas provistas de sombra durante el verano de Florida (Putney et al., 1989a), y en vacas Holstein no superovuladas que se mantuvieron durante el verano con dispositivos modernos para aminorar el estrés calórico en Arabia Saudita (Ryan et al., 1993).

El estrés calórico al inicio del estro (Putney et al., 1989b) o cuando la temperatura máxima registrada en los primeros siete días post-inseminación fue superior a 32.2 ° C (Putney et al., 1989 a) incrementa el porcentaje de embriones retrasados en su desarrollo y reduce la calidad de los mismos. Lo anterior, indica que aparentemente la exposición al estrés calórico antes de la fertilización y durante los tratamientos superovulatorios, no afecta la tasa de fertilización pero compromete el desarrollo embrionario. No obstante, en otro estudio realizado en vacas Holstein superovuladas sometidas a estrés calórico se informó una menor tasa fertilización, lo que fue atribuido por los autores a posibles ovulaciones retrasadas (Monty y Racowsky, 1987).

7. MORTALIDAD EMBRIONARIA

La mortalidad embrionaria se refiere a las pérdidas en el período comprendido de la fertilización hasta el final de la diferenciación de los distintos órganos y tejidos, lo que en vacas ocurre aproximadamente a los 42 días. Se ha aceptado que la tasa de fertilización es mayor del 90% y que la mayor parte de las pérdidas de la gestación son por muerte embrionaria temprana (Ealy et al., 1993; Rivera y Hansen, 2001) o en una etapa tardía entre el 7° y 14° día (Biggers, et al., 1987; Ryan et al., 1995; Dunne et al., 2000), e inclusive más allá de 24 días de edad del embrión (Markette et al., 1985; Putney et al., 1989 a; Drost et al., 1999; Cartmill et al., 2001).

7.1. Efecto del estrés calórico durante el desarrollo embrionario temprano

La exposición del embrión a un incremento de la temperatura en forma moderada (40 ° C) durante una hora en los primeros tres días de edad del embrión, genera cambios de la expresión génica y del sistema bioquímico intracelular. Estos cambios están relacionados con la síntesis de proteínas de estrés al calor en el endometrio bovino (Malayer et al., 1988; Malayer y Hansen, 1990), que también se observan en óvulos no maduros de ratón (Edwards, 1995) y en embriones de dos células de bovinos (Edwards y Hansen, 1996). Otra respuesta al estrés térmico es la síntesis de glutatona en el embrión de ratón (Arechiga et al., 1995). Esas respuestas limitan el efecto de los radicales libres generados durante el estrés calórico sobre la función celular. La respuesta celular – embrionaria para mitigar el efecto de las altas temperaturas se ha definido como inducción de la termotolerancia.

La síntesis de las proteínas de estrés calórico y glutatona en el ovocito y en el embrión, confieren mayor capacidad al ovocito para ser fertilizado y mejoran la viabilidad del embrión para su desarrollo (Aréchiga et al., 1995, Edwards y Hansen, 1996; Edwards et al., 2001). Los niveles de glutatona son altos durante el proceso de maduración de los ovocitos, después de la fertilización se reducen drásticamente en los embriones de dos células y continúan a la baja hasta el estadio de blastocito, que cuando se recupera la capacidad de síntesis de este antioxidante y el embrión adquiere una mayor resistencia al estrés calórico (Ealy et al., 1992). Es por esto que la etapa de mayor sensibilidad al estrés calórico de los embriones se da en los primeros tres días de edad (Edwards y Hansen, 1996). Entre el 2º y 3º día de edad del embrión con la inducción de la termotolerancia se incrementa la síntesis de las proteínas de estrés calórico (Chandolia et al., 1999), período en que se activa el genoma embrionario en bovinos (Barnes y First, 1991; Leibfried, 1996) y por ende los embriones incrementan su resistencia al estrés calórico, al aumentar la reducción de los radicales libres generados.

Estudios *in vitro* (Ealy et al., 1992; Ealy y Hansen, 1994; Ealy et al., 1995; Edwards

y Hansen, 1997) e *in vivo* (Ealy et al., 1993) han determinado que la mayor susceptibilidad del embrión al estrés calórico se da en los primeros tres días de edad, etapa donde se presenta la mayor tasa de mortalidad embrionaria. Conforme el embrión adquiere un mayor desarrollo la resistencia al estrés calórico se incrementa (Ealy et al., 1993). Se ha establecido *in vitro* que la inducción de la termotolerancia con glutatona y taurina incrementa la sobrevivencia de los embriones de ratón (Aréchiga et al., 1992; Aréchiga et al., 1995; Ealy y Hansen, 1994) y de bovino (Ealy et al., 1992; Ealy et al., 1995) en su fase de desarrollo temprano.

La sensibilidad de los embriones al estrés calórico es variable, dependiendo de la adaptabilidad de la raza a esa condición. Se ha observado en embriones de cuatro días de desarrollado *in vitro* de razas tropicales de *Bos indicus* y *Bos taurus* una mayor tolerancia al estrés calórico, que lo observado en vacas de razas de *Bos taurus* no adaptadas a climas calurosos (Hernández et al., 2004).

7.2. Efecto del estrés calórico sobre la mortalidad embrionaria tardía

El efecto del estrés calórico sobre la mortalidad embrionaria continúa más allá de los primeros tres días de edad del embrión, ya que por esa causa se ha observado una mayor incidencia de embriones retrasados (Putney et al., 1989a; Rivera y Hansen, 2001) y una mayor mortalidad embrionaria, que se ha documentado entre los días 7° y el 14° (Biggers, et al., 1987; Ryan et al., 1995; Dunne et al., 2000), 27° (Cartmill et al., 2001) e incluso más allá de los 30 días de edad del embrión (Putney et al., 1989a; Drost et al., 1999).

En vaquillas superovuladas y expuestas a estrés calórico agudo en cámaras climáticas durante siete días post-inseminación, se incrementó la incidencia de embriones retrasados en su desarrollo, dando como resultado una asincronía entre el embrión y el microambiente uterino al momento de la transferencia, lo que reduce la probabilidad de gestación (Putney et al.; 1989a). Se ha descrito en estudios *in vitro* que quizá las temperaturas aplicadas a los embriones han sido

demasiado altas y que no reflejan la realidad de las temperaturas corporales de las vacas durante el verano. En embriones que fueron expuestos a patrones de temperatura durante 24 h (de 52 a 84 h post-inseminación) similares a los observados en vacas lactantes durante los días de verano, no se observó un efecto sobre su desarrollo. Pero cuando estos patrones se prolongaron durante ocho días post-inseminación, el porcentaje de embriones que se desarrollaron hasta el estadio de blastocito fue menor a lo observado en las vacas del grupo testigo. Esto demostró que los patrones de temperatura fluctuantes a que están expuestas las vacas durante el verano, fueron suficientes para afectar la sobrevivencia de los embriones cuando la exposición es más prolongada (Rivera y Hansen, 2001). Por otra parte, también se ha demostrado *in vitro*, que el tejido uterino del lado ipsilateral al cuerpo lúteo cuando se expone a estrés calórico produce menos proteínas durante los primeros ocho días del ciclo estral. Esto pudiera asociarse con la aparente asincronía entre el útero y el embrión por efecto del estrés térmico (Malayer et al., 1988; Malayer y Hansen., 1990).

Un embrión viable entre 15 y 17 días de edad produce la proteína trofoblástica bovina, también conocida como Interferon tau (IFN-t). El IFN-t es considerado una señal bioquímica que el embrión utiliza para inhibir la síntesis uterina de prostaglandina y se de el reconocimiento materno de la gestación (Demmers et al., 2001). En vacas Holstein (Ryan et al., 1993) y Hereford (Biggers et al., 1987) expuestas a estrés calórico se ha observado entre el 8° y 16° día del ciclo estral un menor peso del tejido lúteo y del embrión (Biggers et al., 1987) y una reducción del 32 % de embriones viables entre el 7° y el 13° día de edad (Ryan et al., 1993), lo que sugiere una reducción de la capacidad del embrión para producir IFN-t que podría ayudar a comprender la pérdida embrionaria asociada a condiciones de estrés calórico (Biggers et al., 1987).

Otro indicio de la susceptibilidad del embrión a la hipertermia materna por efectos de estrés calórico más allá del 7° día de edad del embrión, se ha demostrado tanto en vacas receptoras de embriones como en vacas con servicio de inseminación

artificial. En ambos casos se ha experimentado una reducción del 15 al 40 % de la tasa de gestación de las vacas en condiciones de estrés calórico, a 40 y 42 días de edad de los embriones (Putney et al., 1989 a; Drost et al., 1999). Algunos estudios han descrito una menor sobrevivencia embrionaria en vacas lactantes por efecto de la hipertermia materna, debido probablemente a una alta producción de calor interno asociado a la lactancia (Putney et al., 1989 a; Ambrose et al., 1999 b; Al-Katanani et al., 2002 a; Chagas et al., 2002).

8. FACTORES QUE AFECTAN LA GESTACIÓN EN VACAS RECEPTORAS DE EMBRIONES

A través de los años se han evaluado una gran cantidad de factores relacionados con los embriones y con las vacas receptoras que afectan la tasa de preñez. Entre estos destacan los efectos de región geográfica, el día de la transferencia con relación al ciclo estral de la vaca, el técnico que ejecuta la transferencia (Ellington et al., 1991; Smith et al., 1996 b; Dochi et al., 1998), la estación del año, las razas de las vacas (Smith et al., 1996; Hasler, 2001), la condición corporal de la vaca (Smith et al., 1996; Ambrose et al., 1999 b), el tiempo que requirió ejecutar la transferencia, la tasa de congelación del embrión (Dochi et al., 1998), el estadio y la calidad del embrión (Hasler et al., 1985; Markette et al., 1985; Putney et al., 1989a; Ling et al., 1989; Payas et al., 1989; Ellington et al., 1991; Dochi et al., 1998; Dalton et al., 2000; Hasler et al., 2001; Spell et al., 2001), la sincronía del embrión y la vaca receptora (Linder et al., 1983; Putney et al., 1989 a; Geisert et al., 1991; Sreenan and McDough, 1979; Hasler et al., 2001; Spell et al., 2001), la paridad (Dochi et al., 1998; Hasler et al., 2001), el origen de producción del embrión (fresco, congelado o in vitro) (Ellington et al., 1991; Ambrose et al., 1999 b; Al-Katanani et al., 2002 a), el estado productivo y fin zootécnico del animal (Hasler et al., 1987; Ambrose et al., 1999 b; Hasler et al., 2001; Chagas et al., 2002; Al-Katanani et al., 2002 a), las concentraciones plasmáticas de progesterona en el día de la transferencia (Red et al., 1985; Hasler et al., 1987; Payas et al., 1989; Ellington et al., 1991; Farin y Farin, 1995; Ambrose et al., 1999 b; Hasler et al., 2001; Chagas et al., 2002), las condiciones de estrés calórico

durante la transferencia (Putney et al., 1989 a; Ambrose et al., 1999 b, Drost et al., 1999; Rutledge, 2001, Al-Katanni et al., 2002a) y los altos niveles de producción láctea de las vacas receptoras (Ambrose et al., 1999 b; Al-Katanani et al., 2002 a; Chagas et al., 2002).

8.1. Efecto del estrés calórico sobre la tasa de gestación de vacas receptoras de embriones

En estudios *in vitro* (Ealy et al., 1992; Ealy et al., 1994; Ealy et al., 1995) e *in vivo* (Ealy et al., 1993) se ha demostrado que los embriones en sus primeros tres días son sensibles al estrés calórico, lo que reduce la viabilidad y el desarrollo embrionario, por lo que aparentemente después del tercer día de edad los embriones adquieren termotolerancia. Es por esto que para reducir el efecto del estrés calórico sobre la fertilidad se ha propuesto el uso de la transferencia embrionaria, en lugar de la inseminación artificial. Trabajos realizados en vacas Holstein receptoras de embriones de siete días de edad en condiciones de estrés calórico han mostrado una tasa de preñez más alta, que en vacas que fueron inseminadas en las mismas condiciones ambientales, lo que confirma que los embriones transferidos habían superado la etapa del desarrollo embrionario con mayor sensibilidad al estrés calórico (Putney et al., 1989 a; Ambrose et al., 1999 b, Drost et al., 1999; Rutledge, 2001, Al-Katanni et al., 2002 a).

Sin embargo, estos estudios fueron realizados en épocas de estrés calórico para comparar la tasa de gestación entre las técnicas de transferencia de embriones versus inseminación artificial, y no fueron diseñados para obtener respuestas específicas para diferenciar la contribución del estrés de la madre al momento de producir el embrión y sus repercusiones en éste, y del que tendría la receptora al momento de recibirlo. Algunos estudios han evaluado estos efectos en forma parcial y con resultados inconsistentes. Drost et al. (1999) observaron en vacas receptoras expuestas a condiciones de estrés calórico un mayor porcentaje de gestación, cuando se transfirieron embriones colectados y congelados de vacas superovuladas mantenidas en condiciones de termoneutralidad, pero la

metodología empleada no permite estimar un posible efecto del estrés calórico en la vaca durante la producción del embrión y en el momento de la transferencia del mismo. Contrario a lo anterior, en otro estudio se observó un mayor porcentaje de gestación de las vacas receptoras en condiciones de estrés calórico, cuando el origen de los embriones fueron de vacas superovuladas mantenidas en los primeros siete días del desarrollo del embrión, a una temperatura máxima superior a 32 ° C, que lo observado en vacas mantenidas en temperaturas menores a 32° C (Putney et al., 1989 a).

Cuando se analizó la información de la tasa de gestación de vacas receptoras en condiciones de estrés calórico con respecto al tipo de embrión transferido, se observó una mayor probabilidad de gestación de las vacas receptoras cuando fueron transferidos embriones frescos y congelados desarrollados *in vivo* (Putney et al., 1989; Drost et al., 1999), que lo observado en los producidos *in vitro* (Drost et al., 1999; Al-Katanani et al., 2002a). Incluso, se ha observado una reducción sensible de la tasa de gestación de las vacas receptoras, cuando los embriones producidos *in vitro* son congelados, en comparación a vacas receptoras que recibieron un embrión fresco (Al-Katanani et al., 2002a), lo que sugiere que los embriones producidos *in vitro* son más susceptibles al estrés calórico, que los desarrollados en vacas superovuladas.

9. ESTRATEGIAS PARA EFICIENTAR LA REPRODUCCIÓN Y FAVORECER EL MANTENIMIENTO DE LA PREÑEZ EN VACAS LECHERAS

El manejo reproductivo en condiciones de estrés calórico forma parte de un programa integral que incluye aspectos de la nutrición, salud y mitigación del estrés calórico para mejorar la fertilidad y asegurar la sobrevivencia embrionaria.

9.1. Incremento de la fertilidad por servicio

Sincronización del estro y la ovulación

En condiciones de estrés calórico, la tasa de detección del estro es baja (Cartmill et al., 2001), por lo que es recomendable un esquema de sincronización que

permite dar un servicio programado, como lo es el Ovsynch. En este esquema, el GnRH causa la ovulación o luteinización de los folículos grandes y sincroniza el reclutamiento de una nueva onda folicular. Siete días después, la administración de prostaglandina induce la regresión del o los cuerpos lúteos permitiendo la maduración final del folículo dominante (Schmitt et al, 1996; Driancourt, 2001). Una segunda aplicación de GnRH 48 horas después de la administración de prostaglandina induce la ovulación del folículo dominante (Pursley et al., 1995; Stevenson et al., 1999; Driancourt, 2001), por lo que se programa la inseminación artificial entre 16 a 20 h después.

Este protocolo, en vacas lecheras bajo condiciones de estrés calórico reduce los días al primer servicio, los días abiertos e incrementa la tasa de concepción del primer servicio y de la preñez acumulada a 120 días post-parto (Thatcher, 1996; Aréchiga et al., 1998; De la Sota et al., 1998; Cartmill et al., 2001; Risco, et al., 2002). Sin embargo, la tasa de concepción del primer servicio y de preñez acumulada observada en condiciones de estrés calórico, dista mucho de alcanzar los niveles observados en vacas en épocas de confort térmico (Stevenson et al., 1999; Peters y Pursley, 2002).

Otros esquemas, que han resultado exitosos son los que utilizan una sincronización del estro previa al Ovsynch. Así, se ha demostrado en vacas lecheras con un alto nivel de producción que una pre-sincronización con un luteolítico y GnRH (Peters y Pursley, 2002; Borman et al., 2003), aumentan en más del 40% la tasa de ovulación de un folículo apto para ser fertilizado (Borman et al., 2003), y se incrementa el porcentaje de vacas con mayor concentración circulante de P_4 tres días después de haber iniciado el Ovsynch (Peters y Pursley, 2002), comparado con esquemas donde las vacas no fueron pre-sincronizadas. En protocolos de Ovsynch, La suplementación con progesterona en vacas lecheras a través de la aplicación de un dispositivo intravaginal que libera esta hormona (CIDR) ha incrementado la tasa de concepción, en comparación a lo

observado en el grupo de vacas que recibieron solamente el tratamiento tradicional de Ovsynch (Pursley et al., 2001; Diskin et al., 2002).

Uso de la somatotropina bovina

La somatotropina bovina (bST) se ha asociado con una menor eficiencia reproductiva. Cuando la bST se emplea para incrementar la producción láctea y mantener la persistencia de la lactancia en vacas con un alto nivel productivo, a partir de la 9^o a 10^o semana post-parto y posteriormente cada 14 días, se ha observado una disminución de la expresión del estro (Kirby et al., 1997), un retraso del primer servicio post-parto y una reducción de la tasa de preñez acumulada a 180 días post-parto, aun cuando la tasa de concepción no se afecta (Collier et al., 1997; Luna et al., 2000). Se ha sugerido que la bST contribuye a que el período de balance de energía negativo permanezca por mayor tiempo y con ello afecte la reproducción de las vacas. Los autores recomiendan un período de espera voluntario más extendido, para incrementar la tasa de gestación acumulada del hato lechero en programas de aplicación de bST (Luna et al., 2000).

Sin embargo, con el protocolo de inseminación artificial programada (Ovsynch) se ha eliminado el factor limitante que representa la falta de manifestación del estro en épocas cálidas, y se ha podido evaluar el efecto de la bST sobre la concepción en vacas lecheras. En un trabajo realizado en vacas Holstein en buenas condiciones de salud, se observó un incremento del porcentaje de concepción del primer servicio sincronizado y el porcentaje de vacas gestantes acumulados a 120 y 365 días post-parto, cuando se administraron la bST y el protocolo de Ovsynch en forma simultánea a los 63 días post-parto y con la aplicación programada de bST cada 14 días, que lo observado en vacas que iniciaron el tratamiento de bST a los 105 días post-parto. Lo que ha sugerido un efecto benéfico de la bST sobre el desarrollo de los folículos pre-ovulatorios, que incluye ovocitos más saludables (Moreira et al., 2000).

Varios estudios han observado en vacas con tratamientos de bST al inicio del celo (Moreira et al., 2000) y 10 días después del servicio (Bilby et al., 1998; Morales-Roura et al., 2001), un incremento en la tasa de preñez de las vacas repetidoras y de las vacas receptoras de embriones (Moreira et al., 2002). El efecto favorable de bST también se ha manifestado aumentando el porcentaje de embriones transferibles y disminuyendo el número de ovocitos no fertilizados en vacas superovuladas (Moreira et al., 2000; Moreira et al., 2001; Moreira et al., 2002). Este efecto benéfico de la bST, que involucra al IGF-I, parece estar asociado con el proceso de la maduración final del ovocito y del desarrollo folicular (Moreira et al., 2000; Morales-Roura et al., 2001).

El uso de bST después de la inseminación, tiene un efecto positivo sobre la tasa de preñez, mejora el desarrollo del cuerpo lúteo e incrementa la producción de P₄ (Moreira et al., 1999; Moreira et al. 2000). En vacas no gestantes la bST puede adelantar la emergencia de una segunda onda folicular (Kirby et al., 1997) e incrementar la incidencia de una tercera onda durante el ciclo estral, la cual está asociada a una mayor concepción (Ahmad et al. 1997; Townson et al., 2002).

Mejora de la calidad folicular y del ovocito

En vacas Holstein se ha demostrado un efecto retrasado del estrés calórico sobre la calidad folicular, que quizá sea responsable de la baja fertilidad observada en el verano tardío y el otoño. Tratamientos con GnRH y la remoción de los folículos desarrollados en condiciones de estrés calórico, permite la emergencia de nuevos folículos saludables, en menos tiempo e incrementa de embriones que se desarrollan al estadio de blastocito, en comparación con lo observado en vacas testigo no sujetas a estrés calórico (Guzeloglu et al., 2001; Roth et al., 2001b).

En vacas que presentaron folículos emergidos de una tercera onda folicular con crecimientos más rápidos y con menor diámetro se ha observado un mayor porcentaje de ovulación, que lo observado en vacas con dos ondas foliculares (Wilson et al., 1998). Varios estudios, han descrito que la ovulación de folículos

procedentes de un tercer desarrollo folicular, parece ser benéfico para incrementar la fertilidad en vacas lecheras, ya que el crecimiento rápido de los folículos ovulatorios evitan los efectos detrimentales que se dan en los ovocitos con un desarrollo folicular prolongado (Mihm et al., 1994; Revah y Butler, 1996; Townson et al., 2002). Tratamientos con gonadotropina coriónica humana (hCG) en el día cinco del ciclo estral, además de estimular la función lútea, también inducen una nueva onda de crecimiento folicular e incrementan los ciclos de tres ondas foliculares, con lo que disminuye la probabilidad de tener folículos grandes persistentes y altamente estrogénicos y contribuye a tener una mayor tasa de gestación (Díaz et al. 1998; Santos et al., 2001).

Uso de antioxidantes

La vitamina E y el β -caroteno son antioxidantes liposolubles, cuya principal función biológica es proteger a los ácidos grasos polinsaturados de la membrana celular, de la peroxidación lipídica por parte de las especies reactivas de oxígeno. En estudios *in vitro*, se ha observado un incremento del 63 % del área de la superficie de los embriones que fueron cultivados con vitamina E, cuando son recuperados siete días después de su transferencia a vacas no lactantes o a vaquillas, que lo observado en los embriones testigo (Olson y Seidel, 2000). In vivo se ha observado en vacas superovuladas, que con la terapia de cinco aplicaciones de vitamina E y selenio se mejoró la calidad y el desarrollo de embriones al séptimo día de edad (Martín-Castañeda, 2004).

Resultados de estudios de campo realizados en vacas lecheras, han mostrado que los efectos beneficios de la vitamina E sobre la tasa de gestación han sido variables. La administración de vitamina E, en vacas Holstein lactantes al momento del servicio, incrementó la tasa de gestación en épocas cálidas (Ealy et al., 1994; Lozano et al., 1999). Sin embargo, en otros estudios no encontraron este efecto al momento del servicio (Ealy et al., 1994 b), ni a los 30 días después del parto (Aréchiga et.al. 1998 a), a lo que los autores argumentan que la cantidad

administrada de vitamina E no fue suficiente para incrementar la concentración de esta vitamina en el folículo para proteger el embrión o el óvulo.

En vacas Holstein se han observado efectos positivos de la suplementación de β -caroteno durante el post-parto temprano al obtener un útero más saludable (Rodríguez et al., 2002) y cuerpos lúteos con una mayor concentración de P_4 (Pérez et al., 2004). En estudios de campo la suplementación de β -caroteno por más de 90 días en vacas lecheras durante la época de estrés calórico incrementó 14 % la tasa de gestación a los 120 días post-parto, con respecto al grupo de vacas sin suplementación (Aréchiga et al., 1998 b). Sin embargo, en otro estudio realizado en las mismas condiciones climáticas se observó que la oferta de β -caroteno 15 días antes del primer servicio no tuvo ningún impacto sobre la tasa de concepción, lo que pudo ser debido a un período insuficiente de suplementación (Aréchiga et al., 1998 a). Esta falta de respuesta del último trabajo también podría ser debido a que generalmente la concepción del primer servicio en vacas lecheras es baja, independientemente de las condiciones de clima imperantes, ya que es en este período cuando las vacas se encuentran aún en un balance de energía negativo y en su mayor nivel de producción, por lo que se tienen menos folículos de gran tamaño y se incrementan las fallas de la ovulación (Mackey et al., 1999; Bossis et al., 2000).

9.2. Mantenimiento de la gestación

Incremento de las concentraciones plasmáticas de progesterona

En vacas lecheras en condiciones de estrés calórico, la respuesta al empleo de GnRH en el día del servicio o en el 7° u 11° día de edad del embrión ha sido variable. Sin embargo, la mayoría de los estudios han demostrado que con esto hay una reducción de riesgo de que se establezca el mecanismo luteolítico en vacas que llevan un embrión y se incrementen las concentraciones séricas de P_4 y la tasa de gestación (Wolfenson et al., 1994; Ullah et al., 1997; Lozano et al., 1999).

Varios estudios, han corroborado el beneficio de incrementar las concentraciones de progesterona y estimular la función lútea para mantener la gestación. En vacas repetidoras un incremento de la concentración sérica de progesterona, a través de la administración diaria de P₄ del 6° al 10° día del ciclo estral, se ha asociado con una mayor tasa de gestación (Thuemmel et al., 1992). En vacas Holstein mantenidas en estrés calórico y en programas de sincronización del estro y de la ovulación, la administración de 100 µg de GnRH en los días 5 y 11 del ciclo estral incrementó la cantidad de tejido lúteo, la concentración plasmática de progesterona en el día 17 post-inseminación y el porcentaje de vacas gestantes (Willard et al., 2003), que concuerda con lo observado en otros estudios (Thatcher et al., 1996).

Así mismo, en vacas lecheras con un alto nivel productivo la administración de gonadotropina coriónica humana en el día cinco del ciclo estral, induce la ovulación de la primera onda folicular y causa la formación de cuerpos lúteos funcionales accesorios, con lo que se incrementa la concentración sérica de P₄ en la fase lútea y la tasa de gestación (Sianangama et al., 1992; Díaz et al., 1998). La presencia de un cuerpo lúteo adicional en vacas lactantes disminuye el riesgo de que se presente una mortalidad embrionaria entre los 38 y 90 días de gestación (Thatcher et al., 1996; Binelli et al., 2001; López-Gatius et al., 2002), y se incrementa en .25 puntos porcentuales la viabilidad del embrión por cada unidad de incremento en el número de cuerpos lúteos (Thuemmel et al., 1992). Sin embargo, en vacas altas productoras de leche se han observado menores concentraciones circulantes de P₄ que pudiera parcialmente explicar la baja fertilidad en este grupo de vacas, en comparación con otras con un menor nivel de producción (Vasconcelos et al., 2001).

9.3. Empleo de la transferencia embrionaria

Se ha propuesto que para reducir el efecto del estrés calórico sobre la fertilidad, se utilice la transferencia embrionaria en lugar de la inseminación artificial. Varios trabajos realizados en vacas Holstein receptoras de embriones en condiciones de

estrés calórico han observado una tasa de preñez más alta, que la de vacas que fueron inseminadas en las mismas condiciones ambientales, lo que confirma que los embriones transferidos habían superado la etapa de desarrollo embrionario con mayor sensibilidad al estrés calórico (Putney et al., 1989 a; Ambrose et al., 1999 a, Drost et al., 1999; Rutledge, 2001, Al-Katanni et al., 2002 a). Las vacas receptoras de embriones frescos han mostrado una mayor tasa de gestación, comparado a la observada en vacas que recibieron embriones congelados. Los embriones generados por fertilización *in vitro* han sido los que han tenido una menor tasa de gestación de receptoras (Ambrose et al., 1999 a; Drost et al., 1999).

Algunos autores han descrito, que la introducción de esquemas para la sincronización de la ovulación en las vacas receptoras de embriones frescos, producidos *in vivo* o *in vitro* y expuestas a estrés calórico incrementa el porcentaje de gestación (Ambrose et al., 1999; Bo et al., 2001; Al-Katananni et al., 2002).

Se ha sugerido que los niveles de progesterona en vacas receptoras podrían tener una influencia sobre la tasa de gestación, ya que se ha encontrado una relación positiva entre la concentración sérica de progesterona en el día siete (Farin y Farin, 1995) y en el día 21 (Chagas et al., 2002). En vacas receptoras de embriones, con una asincronía de - 72 horas entre la edad del embrión y la fase del ciclo estral de la receptora, tratadas diariamente en los primeros cinco días del ciclo estral con 100 mg de progesterona, se observó una mayor concentración plasmática de progesterona y un efecto benéfico sobre la tasa de gestación, ya que ésta fue similar a lo encontrado en vacas receptoras de embriones sincronizados (Geisert et al., 1991).

No obstante, otro estudio no encontró un efecto positivo de la administración de P₄ como dosis única al momento de la transferencia del embrión sobre la tasa de preñez de vacas receptoras, debido probablemente a que un solo tratamiento pudiera ser insuficiente para tener niveles adecuados de P₄ que incrementen la tasa de gestación (Smith et el., 1996). Así mismo, tratamientos de GnRH a vacas

receptoras al momento de la transferencia de embriones de menor calidad han mostrado resultados muy variables sobre la tasa de preñez, lo que indica que quizá el momento de tratamiento, la dosis y la potencia del análogo de GnRH afectan la capacidad de incrementar en forma suficiente las concentraciones de P₄ en las vacas receptoras (Ellington et al., 1991; Smith y Grimmer, 2002).

9.4. Manejo nutricional

El estrés calórico es crítico para la producción láctea cuando las vacas son expuestas a una temperatura ambiente entre 27° a 40° C (Brody, 1954; Johnson, 1983; McGuire, 1989; Wilson et al., 1998). En estas condiciones se observa una reducción del consumo de materia seca de entre el 10 y el 33 % (Johnson, 1983; McGuire, 1989; Wilson et al., 1998) y de la producción láctea de entre 10.7 y 43 % (Brody, 1954; Roman et al., 1977; Schneider, 1984; Wilson et al., 1998).

El proceso de digestión de la fibra es una fuente importante de producción de calor y mayor que la generada por la de las grasas o de los carbohidratos no fibrosos. Así, la alimentación con dietas altas en fibra durante el verano puede aumentar significativamente el calor generado por la vaca. Uno de los objetivos en épocas de estrés calórico es alimentar con una mínima pero adecuada cantidad de fibra, lo que mejora el consumo de materia seca, la producción de leche y ayuda a reducir la producción de calor, cuidando al mismo tiempo la alta calidad de la fibra, ya que es indispensable para el mantenimiento de la función normal del rumen y el incremento de la producción de leche (Shearer, 1996).

El mejoramiento del estatus energético durante el período de transición y durante la fase de lactancia temprana tiene como objetivo mover a las vacas a un balance positivo de energía (Beam y Butler, 1997; Butler, 2000). Se ha demostrado que al aumentar la densidad energética de la dieta se incrementa la concentración circulante de LH, insulina e IGF-I y la frecuencia de pulsos de LH. También aumenta la respuesta del folículo a la LH, la esteroidogénesis y la probabilidad de

ovulación de los folículos dominantes (Staples et al., 1990; Beam y Butler, 1997; Beam y Butler, 1998).

La deficiencia de proteína reduce la digestibilidad de la dieta, mientras que el exceso incrementa los requerimientos de energía para la síntesis y excreción de urea del cuerpo. Estudios realizados en vacas lecheras en condiciones de estrés calórico en Arizona (Hubber, 1994) y Missouri, E.U. (Hubber, 1993) han observado que cuando se alimenta con un alto contenido de proteína cruda (PC) (18.5 %) y con una alta proporción de proteína degradable (PD) en la dieta (65% de la PC), se presenta una reducción del consumo de materia seca y de la producción de leche (Hubber, 1993; Hubber, 1994). Basado en lo anterior, se recomienda que la alimentación de las vacas lecheras en épocas con estrés calórico no debiera exceder del 61% de PD (Hubber, 1993; Hubber, 1994). Los autores explican que cuando se dan dietas altas en PD, la motilidad y la tasa de pasaje del alimento por el rumen declinan, con lo que se incrementa el tiempo de estancia de la proteína y su degradación a amoníaco, que tiene un costo energético para su eliminación y provoca un aumento en la producción de calor.

El agua es el nutriente más importante en vacas lecheras. Dado y Allen (1994) informaron de una correlación de 0.94 y 0.96 entre el consumo de agua y la producción de leche y el consumo de materia seca, respectivamente. Se ha descrito que en un medio ambiente caluroso las vacas reducen su consumo de agua, porque reducen también el consumo de materia seca y la actividad física (West, 1996). Como estrategia, el agua, además de limpia y fresca, debe de estar cerca del área de alimentación para que se estimule el consumo del alimento y del agua misma (Sterner, 1986; Wilkes, 1990).

Entre otras estrategias de alimentación se encuentran incrementar la frecuencia de la oferta de alimento, ofrecer alimento fresco después de la ordeña y cuando las vacas han sido enfriadas con aspersores, ya que estas prácticas estimulan el consumo de materia seca. Al agregarle entre el 3 y 5% de agua al alimento

integral se aumenta su gustocidad. Así mismo, la adición de amortiguadores a la dieta como el bicarbonato de sodio durante el estrés calórico, previenen la reducción del pH ruminal y estimula el consumo de materia seca y por ende de la producción de leche (Linn, 1997).

9.5. Modificaciones al medio ambiente

Una estrategia comúnmente utilizada para reducir el efecto del calor en los animales ha sido el proveer sombreaderos, rociadores o nebulizadores de agua y ventiladores (Flamenbaum et al., 1986; Flamenbaum et al., 1995). Las ventajas de los sombreaderos se han documentado desde hace medio siglo (Ittner y Nelly, 1951; Johnson and Yeck, 1964) y se han generado y evaluado diseños mejorados en cuanto a su eficiencia (Bucklin et al., 1992; Armstrong 1993; Turner et al., 1994; West, 1995).

El uso de rociadores asociados con ventilación se ha generalizado en las explotaciones intensivas modernas de las zonas áridas. Cuando este tipo de enfriamiento se utiliza con una frecuencia de cinco veces al día la temperatura corporal de los animales se ha mantenido en un rango aceptable, entre 38.2 y 38.8° C (Flamenbaum et al., 1986), y ha incrementado el porcentaje de vacas gestantes (Stott, 1961; Thatcher, 1974; Wolfenson et al., 1988). Otro aspecto a tomar en cuenta son las acciones de refrescamiento alrededor del día del servicio que conlleva a tener una mayor tasa de fertilización, desarrollo y viabilidad del embrión, ya que se ha demostrado que tres días antes del servicio y 10 días después del mismo son las etapas críticas del embrión (Ealy et al., 1995; Hansen, 1997).

En un estudio realizado en Texas, E.U. en 119 hatos con 30,358 primeros servicios se observó que el uso de sombreaderos redujo el efecto del estrés calórico sobre la fertilidad, sobre todo cuando se ubicaron en el lugar donde las vacas pasan la mayor parte de las horas con luz solar, no así en los comederos (Thompson et al., 1996).

9.6. Aspectos genéticos

En la práctica, los enfoques genéticos para mejorar la fertilidad bajo estrés térmico han sido incipientes. En ganado de carne, la heredabilidad de la habilidad de mantener la temperatura rectal ha arrojado valores entre 0.25 y 0.65 (Finch, 1986), lo que denota la posibilidad de que esta característica se mejore a través de la selección, aún cuando seleccionar por tolerancia al calor puede conducir a preferir vacas con menor consumo voluntario de alimento y menor producción de leche.

La cantidad de calor absorbido por un animal expuesto a la radiación solar directa está relacionada con el color de la capa (Becerril et al., 1994; Hansen, 1994). En bovinos Holstein, los animales con mayor proporción de color blanco son más tolerantes al calor que los negros (Becerril et al., 1994). Existen otras líneas acerca de la mayor adaptabilidad al estrés calórico de algunas razas de bovinos, *Bos indicus* y *Bos taurus* en relación a la competencia del ovocito para ser fertilizado (Rocha et al., 1998; Hernández et al., 2004). Sin embargo, ninguna de esas razas cubriría los requisitos de producción de leche que los sistemas intensivos actuales exigen a los animales.

CAPÍTULO 3

FACTORES ASOCIADOS AL ESTRÉS CALÓRICO Y SU INTERACCIÓN CON LOS NIVELES DE PRODUCCIÓN DE LECHE SOBRE LA TASA DE GESTACIÓN EN SISTEMAS INTENSIVOS EN EL NORTE DE MÉXICO

RESUMEN

Los objetivos del estudio fueron determinar los efectos del estrés calórico, la producción láctea, y sus interacciones con las prácticas de manejo, sobre la tasa de gestación (GEST) de vacas Holstein. Se analizaron 23,926 registros de inseminación artificial de nueve hatos lecheros de Cd. Delicias, Chihuahua. Por cada unidad de incremento del índice temperatura – humedad promedio del mes, GEST disminuyó en 0.7 % ($P < 0.01$). La GEST se redujo a partir del mes de mayo y hasta octubre, con relación a lo observado de noviembre a abril ($P < 0.01$). Las vacas con producción de leche estimada a 305 días (PROD) superior a 11,000 l tuvieron menor GEST ($P < 0.01$). De junio a octubre las vacas con PROD superior a 10,000 l mantuvieron GEST por debajo a lo observado en vacas con menor nivel de PROD ($P < 0.01$). La GEST se redujo con índices temperatura – humedad en el día del servicio (THIS) de 72 y mayores ($P < 0.01$), lo que fue más severo cuando el THIS fue superior a 78 ($P < 0.01$), excepto en vacas con PROD menor a 7,000 l ($P > 0.05$). Las vacas multíparas tuvieron menor GEST a THIS superiores a 72, que las primíparas ($P < 0.01$). No hubo efecto en GEST de tamaño de hato; tampoco de BST u ordeños / d y de sus interacciones con THIS ($P > 0.05$). La PROD fue mayor en multíparas, BST, tres ordeños / d y hatos grandes ($P < 0.01$). La reducción de GEST fue más prolongada en vacas con PROD mayor a 10,000 l ($P < 0.01$).

INTRODUCCIÓN

En el ganado lechero se ha observado en los meses calurosos una reducción de la tasa de gestación (Avendaño et al., 1990; Fernández, 1997; Cartmill et al., 2001). El período crítico del estrés calórico sobre la fertilidad y el desarrollo embrionario se ha observado dos días antes del servicio (Ingraham et al., 1975; Ravagnolo y Misztal, 2002) y el día del mismo (Cartmill et al., 2001; Ravagnolo y

Misztal, 2002). Se ha calculado que por cada unidad de incremento del índice temperatura – humedad en el día del servicio se da una reducción de 0.5 % en la tasa de no retorno al estro a los 45 días post-servicio (Ravagnolo y Misztal, 2002).

Se ha demostrado en estudios *in vitro*, que la exposición del ovocito y de embriones de dos a ocho células a altas temperaturas reduce la tasa de fertilización y el desarrollo embrionario. Adicionalmente, la exposición de los embriones a patrones de temperatura similares a los experimentados en las vacas lactantes durante los días de verano (38.6 a 40.5 °C) en los primeros ocho días post-fertilización, redujo el porcentaje en la viabilidad y el desarrollo embrionario (Rivera y Hansen, 2001). En estudios *in vivo* se ha confirmado que los embriones en sus primeros tres días de edad son sensibles al estrés calórico (Ealy et al., 1993).

La industria lechera especializada cada vez impone mayor exigencia fisiológica a las vacas con lactaciones de mayor cuantía. Se ha calculado que en los últimos 25 años el incremento de la producción de leche por vaca, ha implicado la reducción en la tasa de fertilidad del primer servicio entre 0.5 y 1 % anual (Beam y Butler, 1999; Roche et al., 2000; Royal et al., 2000a; Royal et al., 2000b). Recientemente, se determinó que la magnitud de la depresión de la tasa de no retorno al estro a 45 (Ravagnolo y Misztal, 2002) y 90 días (Al-Katanani et al., 1999) fue más acentuada en las vacas con un mayor potencial de producción. Sin embargo, la tasa de no retorno al estro es un indicador poco preciso, por lo que resulta difícil llegar a conclusiones sin analizar otros factores.

A pesar de conocer la relación negativa del estrés calórico y el incremento en la producción láctea sobre la tasa de gestación, se desconoce el efecto de interacción de los niveles de producción láctea y de manejo con el estrés calórico sobre la tasa de fertilidad en los sistemas intensivos de producción comercial. Es por esto que los objetivos del estudio fueron determinar los efectos del estrés calórico, el nivel de producción láctea, la paridad de las vacas, el uso de la

somatotropina bovina, el número de ordeños y sus interacciones sobre la tasa de gestación en vacas Holstein de hatos lecheros comerciales, con un alto nivel productivo y tecnológico en la cuenca lechera de Cd. Delicias, Chihuahua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Registro y cálculo de las variables climáticas

La temperatura ambiente (° C) y la humedad relativa (HR) de los años de estudio 1999 y 2000 se obtuvo de una estación computarizada de Ciudad Delicias, Chihuahua, dependiente del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias de la SAGARPA, ubicada a 20 km de los hatos lecheros en estudio. La temperatura ambiente fue convertida a grados Fahrenheit (° F). Se estimó el índice temperatura – humedad (THI) según lo establecido (Ingraham et al., 1975).

$$\text{THI} = ^\circ \text{F} - [(0.55 - ((\text{HR} / 100) \times 0.55)) * (^\circ \text{F} - 58)]$$

Características generales de los hatos lecheros

Los nueve hatos lecheros en estudio se encuentran en Cd. Delicias, Chihuahua. La cuenca lechera se caracteriza por ser un área de riego importante para la producción de forrajes y el mantenimiento del sistema de producción de leche intensiva. Las unidades de producción en estudio fueron de un alto nivel tecnológico y productivo, que están en una organización que procesa, comercializa y distribuye los productos lácteos. Las vacas que fueron incluidas en el estudio tuvieron en promedio 2.4 ± 1.6 partos, 145.3 ± 131.2 días en leche y 2.9 ± 2.4 servicios. La producción de leche estimada a 305 días fue de $9,525.9 \pm 1,971.6$ l. En todos los hatos, las vacas fueron alimentadas con una dieta integral de acuerdo a su estado productivo. Los programas de manejo de medicina preventiva y de los aspectos reproductivos fueron similares entre los hatos.

Registro de la información productiva

Se utilizaron 23,926 registros de inseminación artificial de vacas lactantes de la raza Holstein mayor a los 20 días post-parto. De cada registro, se tomó la siguiente información: número de la vaca, número de parto (NP), fechas de parto, día, mes (MS) y año de servicio, número de servicio, los días en leche al momento del servicio (DEL), el número de ordeños (NORD), la producción láctea estimada a 305 días (PROD), el resultado del diagnóstico de gestación de 45 a 60 días posteriores al servicio, si al vaca estaba o no en un programa de administración de somatotropina bovina (BST) y de información general como el número de ordeños, tipo de alimentación y número de vacas por hato.

Las vacas se clasificaron de acuerdo a la producción de leche estimada a 305 días en cinco niveles (PL):

- PL1.- menor de 7,000 l (n = 2384).
- PL2.- entre 7,000 y 8,499 l (n = 4135).
- PL3.- entre 8,500 y 9,999 l (n = 7313).
- PL4.- entre 10,000 y 10,999 l (n = 4646).
- PL5.- mayor a 11,000 l (n = 5372)

Independientemente del mes de servicio, el índice temperatura – humedad en el día del servicio (THIS) se agrupó en seis rangos:

1. Menor a 60 (n = 1272).
2. Entre 60 y 65.9 (n = 2038).
3. Entre 66 y 71.9 (n = 5498).
4. Entre 72 y 77.9 (n = 5850).
5. Entre 78 y 83.9 (n = 7914).
6. Mayor a 84 (n = 1354).

Las vacas se clasificaron de acuerdo al número de partos en tres grupos:

1. Vacas de primer parto (n = 8318).
2. Vacas de dos partos (n = 7224).

3. Vacas de tres o más partos (n = 8384).

El tamaño del hato por el número de vientres (NVIE) se dividió en:

1. Hatos con menos de 500 vacas (n = 9616).
2. Hatos con más de 500 vacas (n = 14312).

Análisis de la información.

La variable evaluada fue la tasa de gestación (GEST). El modelo general al cual se atribuyó el total de la variación fue:

$$Y_{mijkl} = \mu + B_m + \delta_{(m)} + MS_i + NP_j + MS \times NP_{ij} + BST_k + BST \times MS_{ik} + b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}}) + E_{(mijk)l}$$

Donde:

Y_{mijkl} = es la variable de respuesta de la l-ésima observación, de la k-ésima administración de somatotropina bovina, del j-ésimo número de parto y del i-ésimo mes de servicio.

μ = es la media general.

B_m = es el efecto de año de servicio hato lechero.

$\delta_{(m)}$ = es el error de restricción, NID $(0, \sigma^2_e)$.

MS_i = es el efecto del i-ésimo mes de servicio (1...12).

NP_j = es el efecto del j-ésimo número de parto (1,2,3).

$MS \times NP_{ij}$ = es el efecto de la interacción de i-ésimo mes de servicio con el j-ésimo número de parto.

BST_k = es el efecto del k-ésimo programa de administración de somatotropina bovina (0,1).

$BST \times MS_{ik}$ = es el efecto de la interacción del i-ésimo mes de servicio con el k-ésimo programa de administración de BST.

$b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}})$ = es el efecto de la covariable de los días en leche al momento del servicio en su forma lineal.

$E_{(mijk)l}$ = es el error NID $(0, \sigma^2_e)$.

Las fuentes de variación que no fueron significativas fueron removidas.

Se realizó un segundo análisis para evaluar el efecto de interacción del MS con la PL sobre la GEST, cuyo modelo al que se atribuyó la variación fue:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + \delta_{(i)} + MS_i + PL_j + MS \times PL_{ij} + b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}}) + E_{(ij)k}$$

Donde:

Y_{ijk} = es la variable de respuesta de la k-ésima observación, del i-ésimo nivel de producción láctea y el j-ésimo mes de servicio.

μ = es la media general.

B_i = es el efecto de año de servicio hato lechero.

$\delta_{(i)}$ = es el error de restricción, NID $(0, \sigma^2_e)$.

MS_i = es el efecto de i-ésimo mes de servicio (1..12).

PL_j = es el efecto del j-ésimo nivel de producción (1,2,3,4,5).

$MS \times PL_{ij}$ = es el efecto de la interacción de i-ésimo mes de servicio con el j-ésimo nivel de producción.

$b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}})$ = es el efecto de la covariable de los días en leche al momento del servicio en su forma lineal

$E_{(ij)k}$ = es el error NID $(0, \sigma^2_e)$.

Para evaluar la interacción del THIS con los efectos de paridad y la aplicación o no de somatotropina bovina sobre la GEST se realizó un análisis cuyo modelo al que se atribuyó la variación fue:

$$Y_{mijkl} = \mu + B_m + \delta_{(m)} + THIS_i + NP_j + THIS \times NP_{ij} + BST_k + THIS \times BST_{ik} + b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}}) + E_{(mijk)l}$$

Donde:

Y_{mijkl} = es la variable de respuesta de la l-ésima observación, del k-ésimo programa de administración de somatotropina bovina, el j-ésimo número de parto y el i-ésimo índice temperatura – humedad en el día de servicio.

μ = es la media general.

B_m = es el efecto de año de servicio hato lechero.

$\delta_{(m)}$ = es el error de restricción, NID $(0, \sigma^2_e)$.

THIS_i = es el efecto del i-ésimo nivel del índice temperatura – humedad del día de servicio (1,2,3,4,5,6).

NP_j = es el j-ésimo número de parto (1,2,3).

THIS x NP_{ij} = es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel de THIS con el j-ésimo número de parto.

BST_k = es el efecto del k-ésimo programa de administración de somatotropina bovina (0,1).

THIS x BST_{ik} = es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel de THIS con el k-ésimo programa de administración de BST.

b₁(del - μ_{del}) = es el efecto de la covariable de los días en leche en su forma lineal.

E_{(mijkl)m} = es el error NID (0, σ²_e).

Para evaluar la producción de leche estimada a 305 días se realizó un análisis cuyo modelo al que se atribuyó la variación fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + NP_i + BST_j + NORD_k + E_{(ijkl)}$$

Donde:

Y_{ijkl} = es la variable de respuesta de la l-ésima observación, del k-ésimo número de ordeños, el j-ésimo programa de administración de somatotropina bovina y el i-ésimo número de parto.

μ = es la media general.

NP_i = es el efecto del i-ésimo número de parto (1,2,3).

BST_j = es el efecto del j-ésimo programa de administración de somatotropina bovina (0,1).

NORD_k = es el efecto del k-ésimo número de ordeños (2,3).

E_{(ijk)l} = es el error NID (0, σ²_e).

Se evaluaron la GEST y la PROD a través de un análisis de varianza donde el efecto principal fue el NVIE. Se realizó un análisis de regresión para determinar la relación entre las medias mínimo cuadráticas de la GEST mensual y el promedio

mensual del índice temperatura – humedad. Los datos se analizaron por el método de mínimos cuadrados por el procedimiento de GLM de SAS (SAS, 1988).

RESULTADOS

En la Gráfica 1 se muestran las medias mínimo cuadráticas de la tasa de gestación y las medias mensuales del índice temperatura – humedad registradas a lo largo del año. En ésta se observa una relación lineal negativa entre las dos variables ($P < 0.01$), cuya ecuación tuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.895; por cada unidad de incremento del THI, la GEST disminuyó en 0.7 %. Una notoria reducción de la GEST se observó a partir del mes de mayo y se mantuvieron esos niveles hasta el mes de octubre, con valores que fueron inferiores a los de noviembre a abril ($P < 0.01$).

En el Cuadro 1 se observa que la reducción de la GEST de las vacas inicia cuando el THI fue mayor a 66 ($P < 0.01$), agudizándose cuando el THI fue superior a 72 ($P < 0.01$). La GEST de las vacas con dos o más partos fue menor que en las vacas primíparas ($P < 0.01$). Las vacas con PROD superior a 11,000 l tuvieron una menor GEST ($P < 0.01$). Mientras que las vacas con una PROD entre 8,500 y 11,000 l y menores de 7,000 l mostraron una menor GEST, que las vacas con una PROD entre 7,000 y 8,499 l ($P < 0.01$).

El efecto de la interacción del THI con el número de partos sobre GEST se muestra en el Cuadro 2. Las vacas con dos o más partos presentaron mayor reducción de la GEST en todos los rangos de los THI superiores a 72, que lo observado en las vacas primíparas ($P < 0.01$).

La GEST observada en las vacas con diferentes niveles de PROD se detalla en la Gráfica 2. A partir del mes de junio, la GEST en las vacas con PROD mayor a 11,000 l fue la más afectada ($P < 0.01$). En los meses de julio a octubre las vacas con PROD superior a 10,000 l mantuvieron una GEST por debajo de lo observado en las de menor PROD ($P < 0.01$). En el mes de diciembre, la GEST en las vacas

con PROD mayor a 11,000 l fue menor que lo observado en las vacas con PROD menor a 10,000 l ($P < 0.05$), excepto con las que produjeron menos de 7,000 l ($P > 0.05$). En el mes de febrero, la menor GEST ocurrió en grupos con PROD menores de 7,000 l y mayores a 11,000 l ($P < 0.01$).

El efecto del THIS sobre la GEST de las vacas con diferentes niveles de producción se presenta en la Gráfica 3. Las vacas con mayor PROD tuvieron menor GEST a THIS superiores a 66 que las de PROD entre 7,000 y 8,500 l ($P < 0.01$), y se acentuó la reducción en las vacas con mayor PROD a THIS mayor a 72 ($P < 0.01$). Las vacas con PROD de 7,000 a 10,000 l mostraron una reducción de la GEST a THIS entre 72 y 84 ($P < 0.01$). En las vacas con PROD menor de 7,000 l no hubo diferencias debidas a THIS con valores inferiores a 84 ($P > 0.05$); este grupo mostró en general baja GEST.

En el Cuadro 3 se presenta la PROD y los efectos de paridad, de BST, del número de ordeños y del tamaño del hato. Las vacas multíparas mostraron mayor PROD que la observada en las vacas primíparas ($P < 0.01$). Las vacas tratadas con BST, las de tres ordeños y aquellas en hatos con más de 500 vientres tuvieron una mayor PROD ($P < 0.01$).

Los efectos de BST, del número de ordeños, del tamaño del hato y la interacción de THIS con BST y con el número de ordeños no fueron significativos sobre GEST ($P > 0.05$).

DISCUSIÓN

Los sistemas intensivos en el norte de México se caracterizan por tener una dinámica constante en el incremento de la producción de leche por vaca vientre. En estas regiones se tiene un índice de temperatura – humedad elevada en los meses calurosos, con fluctuación promedio mensual de alrededor de 20 puntos a lo largo del año. La reducción de la GEST en los meses cálidos ha sido informada en otros estudios en vacas de sistemas intensivos de producción de leche en

México (Avendaño et al., 1990; Fernández, 1997); sin embargo, estos estudios fueron realizados en un solo hato (Avendaño et al., 1990) o representan medias generales de la fertilidad registrada en una región (Fernández et al., 1997), sin un análisis que hubiese ajustado los datos de fertilidad a otras variables importantes.

La reducción de 0.7 % de la GEST por unidad de incremento del THI promedio del mes muestra la misma tendencia informada por Ravagnolo y Misztal (2002), donde ellos observaron una reducción de 0.5 % de la tasa de no retorno al estro (TNRE) a 45 días por unidad de incremento de THI del día del servicio de cada vaca. Sin embargo, la TNRE es menos precisa como estimador de la fertilidad, que la tasa de GEST del presente estudio. La información disponible demuestra un efecto crítico del estrés calórico en el día del servicio sobre la fertilización y la sobrevivencia embrionaria temprana (Putney et al., 1989) y tardía (Cartmill et al., 2001) y sobre la tasa de no retorno al estro (Ravagnolo y Misztal, 2002).

Independientemente del mes de servicio, la GEST de las vacas por efecto del THIS se tornó crítico cuando éste fue superior a 66, y se agudizó a THIS mayores a 72, por lo que aparentemente la reproducción no se vio afectada a niveles de THIS iguales o menores a 66. Este resultado es muy similar a lo encontrado por Ravagnolo y Misztal (2002), quienes observaron en vacas en lactancia, que a partir de THI de 68 en el día del servicio se inició un decremento de la TNRE a 45 días, y que la magnitud de la depresión de ésta fue del 15 % aproximadamente, con un mayor impacto negativo en la vacas con más producción láctea.

El hecho de que las vacas con PROD superior de 11,000 l siempre tuvieron menor GEST en todos los rangos de THIS estudiados, y que la reducción de la GEST en éstas se agudizó en THIS superiores a 78, con respecto a lo observado en vacas con un menor nivel de PROD, indica que la menor GEST a THIS inferiores a 72 es debido al estrés fisiológico de producción, en tanto que a THIS mayores el efecto del estrés calórico se agrega al de producción.

Algunos estudios han estimado en el transcurso de los últimos 25 años una reducción anual entre 0.5 y 1 % de la fertilidad al primer servicio, donde el factor que ha contribuido a la declinación de la fertilidad ha sido el incremento de la producción láctea (Beam y Butler, 1999; Roche et al., 2000; Royal et al., 2000a; Royal et al., 2000b), que además se ha asociado con retraso en el re-inicio de la actividad ovárica posparto (Opsomer et al., 2000; Royal et al., 2000b; Cartmill et al., 2001) y con una tendencia a tener un primer servicio retrasado (Faust et al., 1988). En el presente estudio, la depresión de la GEST fue considerablemente mayor en las vacas con más PROD (43.2 al 50 %), que en las vacas con una PROD menor a 10,000 litros (25 a 36.3 %), y presenta las mismas tendencias observadas en otro estudio (Al-katanani et al. 1999), donde se determinó una mayor depresión de la tasa de no retorno al estro (TRNE) a 90 días (alrededor del 90%) en las vacas con mayor producción en los meses calurosos del año.

La lenta recuperación de los niveles de GEST de las vacas con mayor PROD, puede estar relacionada con un efecto acarreado del estrés calórico del verano sobre el desarrollo y la calidad folicular, del ovocito y de la función lútea, que juegan un papel importante en la fertilidad y el desarrollo embrionario temprano. Se ha observado en vacas Holstein lactantes (Roth et al., 2001 a) y no lactantes (Gozeloglu et al., 2001) expuestas a estrés calórico durante el verano (Roth et al., 2001a) o en un ciclo folicular (Gozeloglu et al., 2001) un incremento de folículos no saludables (Gozeloglu et al., 2001), y una reducción en el desarrollo embrionario (Roth et al., 2001a; Al-Katanani et al., 2002); y se ha demostrado que tratamientos repetidos con factor liberador de las gonadotropinas y la aspiración frecuente de los folículos mayores de 5 mm (Gozeloglu et al., 2001) y entre 3 y 7 mm (Roth et al., 2001a) durante varios ciclos estrales dispuso el efecto detrimental al estrés calórico de los meses previos sobre el desarrollo folicular y permitió el reclutamiento de folículos de mejor calidad, que se reflejó incluso en el desarrollo embrionario en comparación con lo observado en el grupo de vacas no tratadas.

No se ha descrito un mecanismo preciso por el cual el estrés calórico afecta la fertilidad, pero se sugiere que se produce un daño en la comunicación intercelular entre las células de la granulosa, del cúmulo y del ovocito (Roth et al., 2001b; Al-Katanani et al., 2002), se afecte la competencia del ovocito (Al-Katanani et al., 2002; Sartori et al., 2002), se altera el contenido proteico (Ambrose et al., 1999) y la viabilidad de las células de la granulosa y de la teca interna y se modifica la esteroidogénesis (Wolfenson et al., 1993; Wolfenson et al., 1997; Roth et al., 2001b).

Los valores de la GEST de las vacas con PROD menores a 7,000 l, pueden indicar que en este grupo posiblemente se encontraban animales con algunos problemas metabólicos o infecciosos, que limitaron su producción y reproducción, como lo han descrito otros estudios (Scott et al., 1999; Grohn y Rajala, 2000). En contraste, en las vacas con una producción intermedia (entre 7,000 y 10,000 l), aún cuando se observó una reducción de la GEST en condiciones de estrés calórico, la depresión de ésta fue menor (rango de 25 a 36.3 %), lo que puede indicar que en este rango de producción, los animales mantuvieron mejor estado de salud y fueron menos susceptibles al estrés de THIS.

Las vacas que recibieron BST no mostraron un efecto positivo sobre GEST, como lo ha sido informado en otros estudios con vacas de primer servicio (Mendoza, 2000; Morales Roura, 2001) y con vacas repetidoras (Mendoza, 2000; Morales-Roura et al., 2001). En vacas superovuladas el uso de la BST ha mejorado la sobrevivencia de los embriones recuperados y la tasa de preñez de vacas receptoras (Moreira et al., 2000; Moreira et al., 2001; Moreira et al., 2002). A diferencia del presente estudio, esos autores aplicaron la BST en el día del servicio o en proceso de superovulación o de la transferencia de los embriones, en tanto que el uso rutinario para mejorar la producción no considera los eventos asociados con la reproducción.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES.

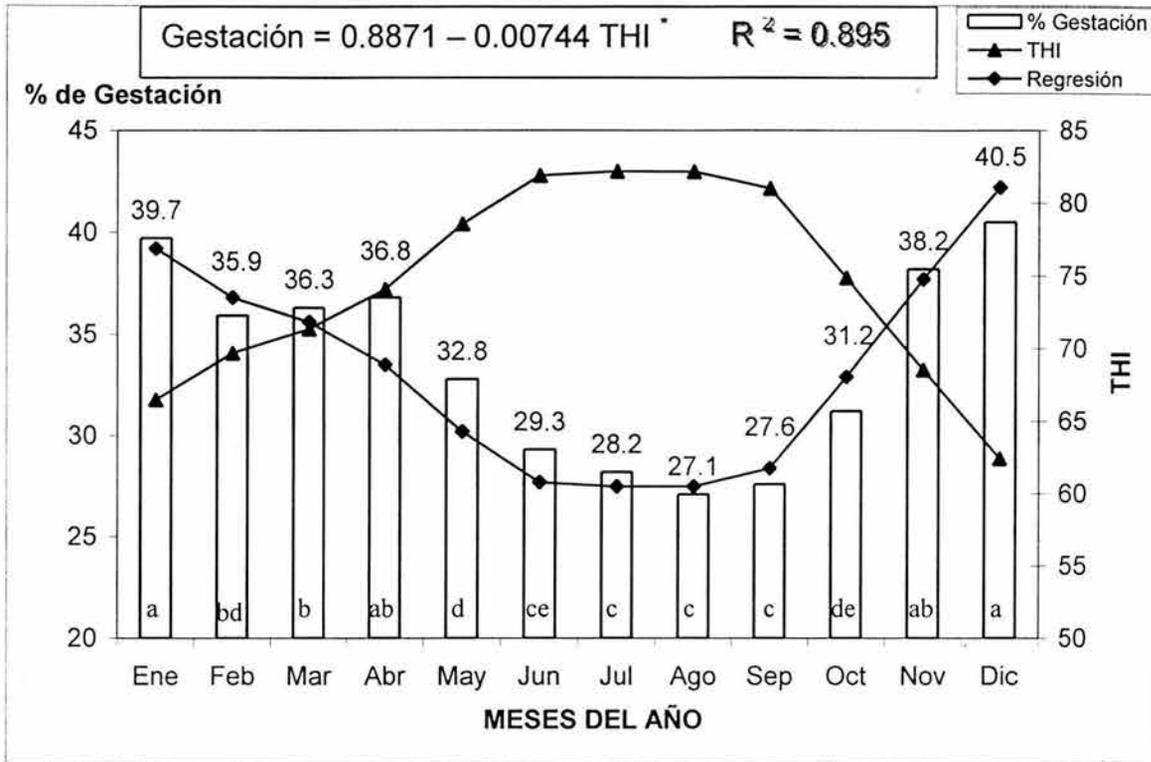
La reducción de fertilidad en el verano necesariamente establece una estacionalidad de los partos y de la producción en los meses de junio a diciembre del siguiente ciclo productivo, que implica tener en esos meses una mayor producción, que se sumará a la producida en sistemas tradicionales y de doble propósito, con lo que se incrementa la oferta regional de leche con la consecuente reducción del precio, y la dificultad para su comercialización.

En la cuenca lechera de Cd. Delicias, Chihuahua, cada vez se intensifican más los sistemas de producción con la adopción de componentes tecnológicos modernos, incluida la constante mejora en el mérito genético de los animales, por ello se mantiene un incremento de la producción por vaca. En esas condiciones es de esperarse que el estrés calórico siga siendo un problema no resuelto y que tendrá cada vez mayor vigencia. Sin embargo, el uso de tecnologías como la aplicación de BST y el ordeño tres veces al día, no agregaron reducción de la fertilidad al efecto del estrés calórico.

Por el hecho de que en los animales de mayor producción se retrasa la recuperación de la fertilidad, y se presume que esto puede deberse a un efecto acarreado en la calidad de los folículos que iniciaron su desarrollo en condiciones de estrés, resulta interesante evaluar el efecto de inducir, desde inicios del otoño, el recambio folicular acelerado con tratamientos como los empleados para sincronizar el estro y la ovulación. Otra opción para incrementar la gestación en la épocas calurosas de los hatos lecheros es optar por la transferencia de embriones de 6 a 7 días de edad: Adicionalmente, en las condiciones ambientales del área de estudio, el establecimiento de sistemas de enfriamiento alrededor del día del servicio y los subsecuentes es una práctica que amerita ser analizada, para mejorar la tasa de gestación en vacas de la raza Holstein.

GRÁFICA 1

Medias mínimo cuadráticas del porcentaje de gestación, y las medias mensuales del índice temperatura – humedad (THI) registradas a través del año

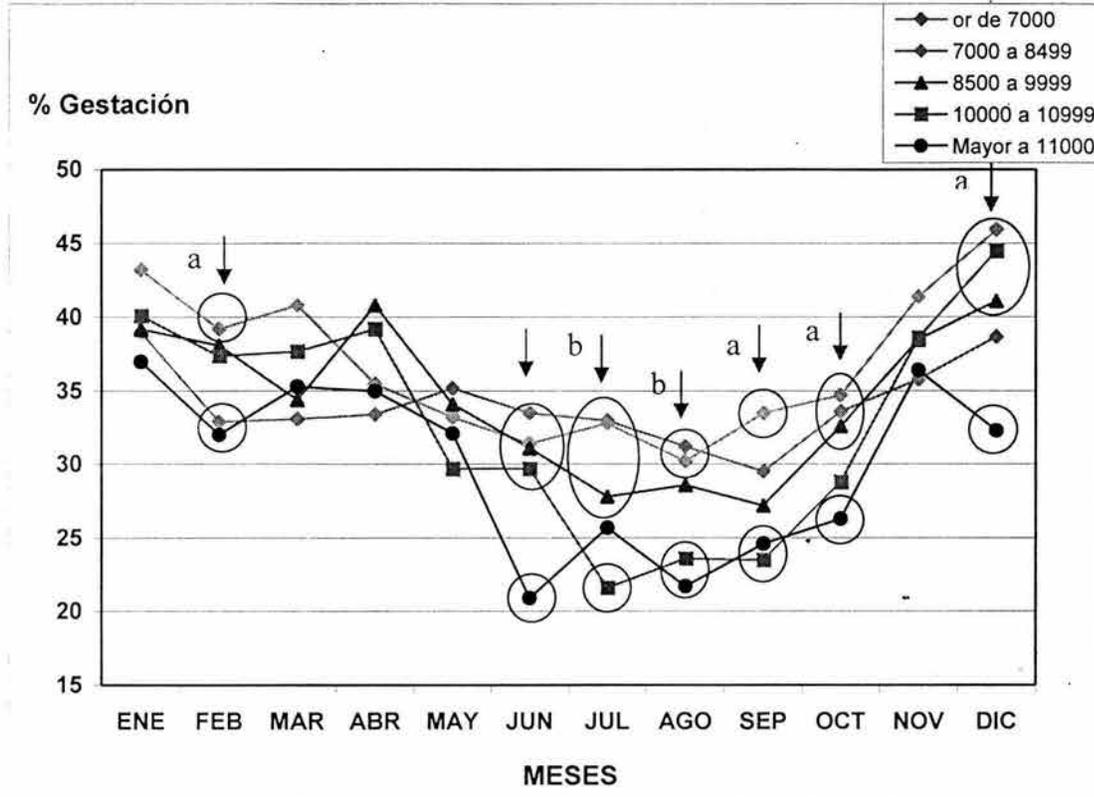


(a, b), (b, d) (d, e) / Distintas literales por columna indican diferencia significativa (P<0.05)

(a, c), (a, d), (b, c), (c, d) / Distintas literales por columna indican diferencia significativa (P<0.01)

GRÁFICA 2

Porcentaje de gestación por efecto del nivel de producción láctea en vacas lecheras de la raza Holstein a través del año en sistemas intensivos de producción en el altiplano del centro – norte de México.

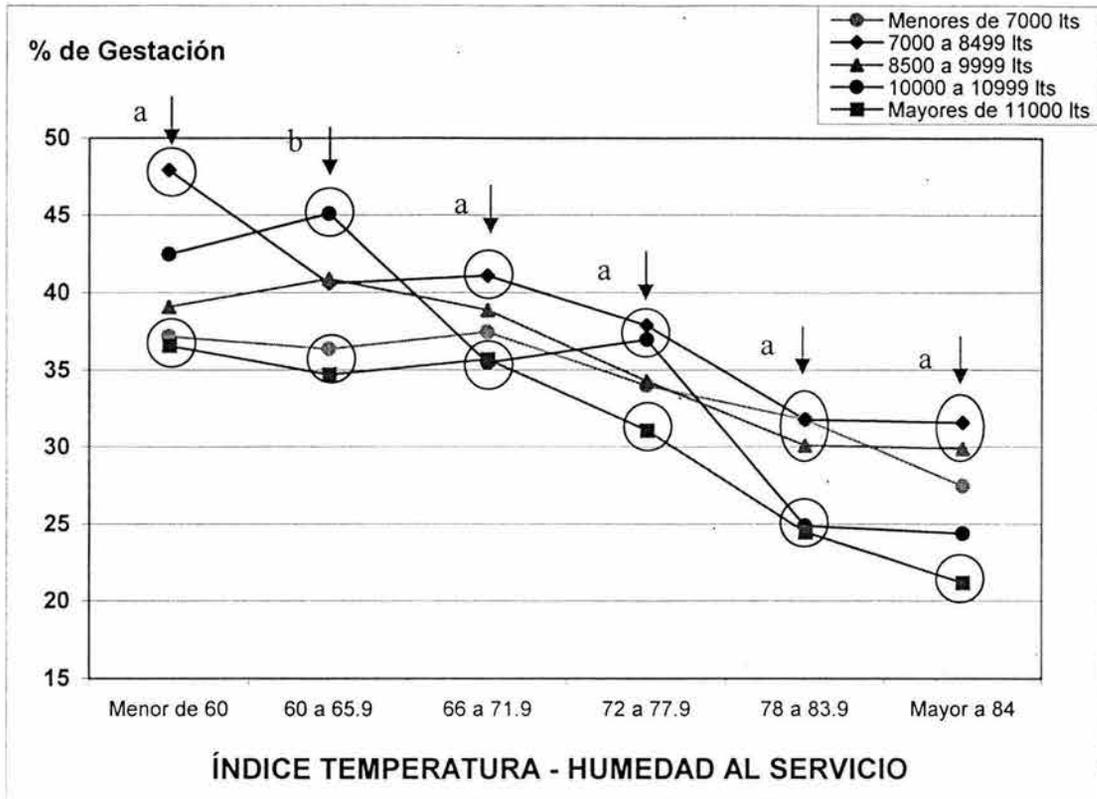


a ↓ Diferencias dentro del mes entre datos circulados indican diferencia ($P < 0.01$).

b ↓ Diferencias dentro del mes entre datos circulados indican diferencia ($P < 0.05$).

GRÁFICA 3

Efecto del índice temperatura – humedad en el día del servicio sobre la tasa de gestación de vacas Holstein con diferente producción animal en Delicias, Chihuahua, México.



a ↓ Dentro del rango de THI indica diferencia entre círculos ($P < 0.01$)

b ↓ Dentro del rango de THI indica diferencias entre círculos ($P < 0.05$)

CUADRO 1. Efecto del índice temperatura – humedad en el día del servicio (THIS), el número de partos, la administración de somatotropina bovina y el nivel de producción de leche estimada a 305 días (PROD) sobre tasa de gestación en vacas lecheras Holstein en el altiplano del centro – norte de México.

THIS	n	% Gestación
Menor a 60	1272	40.8 a
60 a 65.9	2038	40.1 ab
66 a 71.9	5498	37.8 b
72 a 77.9	5850	35.0 c
78 a 83.9	7914	28.4 d
Mayor a 84	1354	27.1 d
Número de Parto		
1	8318	37.1 a
2	7224	34.0 c
3 o más	8384	33.4 c
Somatotropina Bovina		
NO	15348	34.6 a
SI	8578	35.1 a
PROD (l)		
Menor a 7,000	2384	34.1 ac
7,000 a 8,499	4135	36.8 b
8,500 a 9,999	7313	34.5 ac
10,000 a 10,999	4646	32.9 c
Mayor a 11,000	5372	29.9 d

a, b / Distintas literales por columna dentro de cada efecto principal (P<0.05).

a, c / Distintas literales por columna dentro de cada efecto principal (P<0.01).

b, c, d / Distintas literales por columna dentro de cada efecto principal (P<0.01).

CUADRO 2. Efecto de la interacción del índice de temperatura – humedad en el día del servicio (THIS) con la paridad de la vaca (NP) sobre la tasa de gestación de vacas Holstein lactantes en sistemas intensivos de producción en el altiplano del centro – norte de México

THIS	n	NP	GESTACIÓN
Menor a 60	434	1	42.3 a
Menor a 60	404	2	42.6 a
Menor a 60	434	3 o más	37.5 a
60 a 65.9	654	1	40.6 a
60 a 65.9	602	2	39.7 a
60 a 65.9	782	3 o más	39.9 a
66 a 71.9	1892	1	38.1 a
66 a 71.9	1537	2	38.6 a
66 a 71.9	2069	3 o más	36.7 a
72 a 77.9	2043	1	37.6 a
72 a 77.9	1757	2	33.4 b
72 a 77.9	2050	3 o más	34.1 b
78 a 83.9	2815	1	32.1 a
78 a 83.9	2462	2	25.4 b
78 a 83.9	2637	3 o más	27.7 b
Mayor a 84	480	1	31.9 a
Mayor a 84	462	2	24.6 b
Mayor a 84	412	3 o más	24.8 b

a, b / Distintas literales por columna dentro de cada segmento de THIS indican diferencia significativa (P<0.01).

CUADRO 3. Medias mínimo cuadráticas de la producción de leche estimada a 305 días por efecto del número de partos, la administración o no de somatotropina bovina, número de ordeños y el tamaño de hato lechero, en vacas Holstein del altiplano centro – norte de México.

Número de Parto	n	$\bar{x} \pm e.e.$
1	8281	8,622.2 \pm 20.7 a
2	7209	9,841.1 \pm 22.4 b
3 o más	8337	9,971.5 \pm 20.6 c
Somatotropina Bovina		
NO	15300	9,264.6 \pm 15.7 a
SI	8527	9,692.0 \pm 20.0 b
Número de Ordeños		
Dos ordeños	8648	9,018.8 \pm 20.1 a
Tres ordeños	15179	9,937.8 \pm 15.4 b
Número de vacas por hato lechero		
Menor a 500 vacas	9540	9,176.1 \pm 19.9 a
Mayor a 500 vacas	14312	9,761.2 \pm 16.3 b

a, b / Distintas literales por columna dentro de cada efecto principal (P<0.01).

a, c / Distintas literales por columna dentro de cada efecto principal (P<0.01).

b, c / Distintas literales por columna dentro de cada efecto principal (P<0.01).

LITERATURA CITADA.

Al-Katanani YM, Webb DW and Hansen PJ. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J dairy Sci* 1999;(82):2611-2616.

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):390-396.

Ambrose JD, Guzeloglu A, Thatcher MJ, Kassa T, Díaz T. and Thatcher WW. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to heat-stress. *J Reprod Fert* 1999;54:503-504.

Avendaño RL, Molina RL y Correa CA. Factores ambientales que influyen sobre la eficiencia reproductiva en un hato Holstein de Baja California. *Reu Nal de Inv Pec* 1990:447.

Beam SW and Butler WR. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J Reprod Fert* 1999;54 (Supl):411-424.

Cartmill JA, El-Zarkouny SZ, Hensley BA, Rozell TG, Smith JF and Stevenson JS. An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperatures before or after calving or both. *J Dairy Sci* 2001;(84):799-806.

Ealy AD, Drost M and Hansen PJ. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J Dairy Sci* 1993 (76): 2899.

Faust MA, Mc Daniel BT, Robinson OW and Britt JH. Environmental and yield effects on reproduction in primiparous Holstein. *J Dairy Sci* 1998;(71):3092-3099.

Fernández DLJ. Evaluación de parámetros reproductivos en hatos de la comarca lagunera. Unión Ganadera 1997;12-14.

Grohn YT and Rajaal-Schultz PJ. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. Anim Reprod Sci 2000(60-61):605-614.

Guzeloglu A, Ambrose JD, Kassa T, Diaz T, Thatcher MJ and Thatcher WW. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. Anim Reprod Sci 2001;(66):15-34.

Ingraham RH, Stanley RW and Wagner WC. Relationship of temperature and humidity to conception rate of hosltein cows in Hawai. J Dairy Sci 1975;59(12):2086-2090.

Mendoza MG. Efecto de una dosis de 500 mg de somatropina bovina recombinante (rbST) en la fertilidad de vacas Holstein al primer servicio y repetidoras. Tesis de Maestría. UNAM 2000.

Morales-Roura JS, Zarco L, Hernández-Cerón J and Rodríguez G. Effect of short-term teatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. Theriogenology 2001;(55):1831-1841

Moreira F, Risco CA, Pires MF, Ambrose JD, Drost M and Thatcher, WW. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. J Dairy Sci 2000;(83):1237-1247.

Moreira F, Badinga L, Burnley C and Thatcher WW. Effects of bovine somatotropin on embryo transfer in lactating dairy cows. Theriogenology 2001(55):535.

Moreira F, Badinga L, Burnley C and Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-

transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*, 2002;57(4):1371-1387.

Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H and de Kruif A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 2000;(53):841-857.

Putney DJ Mullins S, Thatcher WW Drost M and Gross TS. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim Reprod Sci* 1989;(19): 37.

Ravagnolo O and Misztal I. Effect of heat stress on nonreturn rate in Holsteins: fixed-model analyses. *J Dairy Sci* 2002;(85):3101-3106.

Rivera RM and Hansen PJ. Development of culture bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *J Reprod and Fert* 2001;(121):107-115.

Roche JF, Mackey FD and Diskin MD. Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci* 2000;60(61):703-712.

Roth Z, Arav A, Zeron Y, Braw-Tal R and Wolfenson D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* 2001a;122(5):737-744.

Roth Z Meidan R, Shaham-Albalancy A, Braw-Tal R and Wolfenson D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 2001b;(121):745-751.

Royal M, Mann GE and Flint AP. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *The Veterinary Journal* 2000a;(160): 53-60.

Royal MD, Darwash AO, Flint APF Webb R, Williams JA and Lamming GE. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility *Anim Sci* 2000b;(70): 487-501.

Sartori S, 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):2803-2812.

SAS. SAS/STAT User's Guide (Release 6.03). Cary NC, USA: SAS Inst Inc 1988.
Scott H L, Meint J de Vries and Ynte HS. The effects of time of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. *J Dairy Sci* 1999(82):2589-2604.

Wolfenson D, Luft O, Berman A and Meidan R. Effect of season, incubation temperature and cell age on progesterone and prostaglandin f2 alpha production in bovine luteal cells. *Anim Reprod Sci* 1993(32):27-40.

Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y and Meidan R. 1997. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim Reprod Sci* 1997;(47):9-19.

CAPITULO 4

EFECTO DEL ESTRÉS CALÓRICO Y SU INTERACCIÓN CON OTRAS VARIABLES DE MANEJO Y PRODUCTIVAS SOBRE LA TASA DE GESTACIÓN DE VACAS LECHERAS EN AGUASCALIENTES, MÉXICO

RESUMEN

Los objetivos del estudio fueron determinar los efectos del estrés calórico, producción láctea estimada a 305 d (PROD), prácticas de manejo y sus interacciones, sobre la tasa de gestación (GEST) en vacas Holstein. El estudio se realizó en siete hatos de Aguascalientes. Se analizaron 20,606 registros de inseminación artificial en dos años. Cada unidad de incremento del índice temperatura – humedad promedio del mes de servicio, redujo GEST en 1.03 % ($P < 0.01$). La GEST fue menor de mayo a septiembre que en octubre ($P < 0.05$) y de noviembre a abril ($P < 0.01$). Las vacas con mayor PROD tuvieron menor GEST en noviembre, diciembre ($P < 0.01$), enero y octubre ($P < 0.05$), que las de PROD menor a 7,000 l. Índices temperatura – humedad en el día del servicio (THIS) mayores a 74, afectaron negativamente la GEST; el efecto se agudizó cuando el THIS fue superior a 76 ($P < 0.01$). Las vacas primíparas mostraron mejor GEST que las multíparas ($P < 0.01$). La administración de somatotropina bovina (BST), y la interacción de THIS con paridad, BST y número de ordeños (2 o 3 / d), no afectaron GEST ($P > 0.05$). Las vacas en tres ordeños / d y las de hatos con más de 1000 vacas presentaron menor GEST ($P < 0.01$). El estrés calórico afectó la GEST de las vacas, independientemente de su PROD; sin embargo, el efecto es mayor y más perdurable a mayor PROD. No hubo interacción entre distintas prácticas de manejo y estrés calórico para GEST.

INTRODUCCIÓN

Los programas reproductivos en los sistemas intensivos de producción de leche se han establecido para obtener un óptimo intervalo entre partos, lo que representa una mayor utilidad (Call, 1978; Funk et al., 1987). Si el intervalo entre partos es superior a la meta óptima, la posibilidad de que el período seco se amplíe es alta,

y se dé una menor producción de leche en la siguiente lactancia (Funk et al., 1987), lo que representa una pérdida en el potencial productivo de la vaca a mediano y largo plazo.

La subfertilidad se ha definido como una condición que impide el establecimiento de la preñez después de haberse completado la involución uterina (Royal et al., 2000). Esta característica es afectada por una gran cantidad de factores como son: la condición física, enfermedades durante el posparto, mastitis, producción láctea, épocas de parto, entre otras (Scott et al., 1999; Grohn y Rajala, 2000).

Las altas temperaturas y la humedad relativa del ambiente, que son comunes en el verano en la mayor parte de las cuencas lecheras de México, con frecuencia rebasan la capacidad de los mecanismos normales de los animales para la disipación del calor, provocando condiciones de estrés que afectan su fisiología y homeostasis, que se reflejan con una disminución del consumo voluntario de alimentos, de la producción láctea (Barash et al., 2001; West et al., 2003) y de la eficiencia reproductiva (Hansen et al., 2000; Wolfenson et al., 2000).

En México existen algunas observaciones preliminares sobre la reducción de la fertilidad en los meses calurosos del año, que se limitan a un hato (Avendaño et al., 1990) o son informes de valores promedio de la fertilidad (Fernández et al., 1997). El estrés calórico afecta la reproducción cuando tiene lugar días antes, durante y después de la ovulación (Ingraham et al., 1975; Cartmill et al., 2001; Ravagnolo y Misztal, 2002). Así mismo, se ha observado un efecto negativo del estrés calórico sobre la viabilidad embrionaria en los primeros días de su desarrollo (Ealy et al., 1993; Ryan et al., 1993).

La intensificación de los sistemas de producción de leche se ha acompañado con una disminución de la eficiencia reproductiva de los hatos. Se ha descrito que el incremento en la producción de leche se ha asociado con una reducción de la fertilidad del primer servicio entre 0.5 y 1.0 % anual en los últimos 25 años (Butler

et al., 1998; Roche et al., 2000; Royal et al., 2000); así mismo, se ha observado un incremento en los días abiertos (Washburn et al. 2002; Osen et al., 2003), un retraso en el re-inicio de la actividad ovárica post-parto (Opsomer et al., 2000; Cartmill et al., 2001) y una tendencia a tener un primer servicio retrasado (Faust et al., 1988).

A pesar de conocer la relación negativa de la fertilidad con el estrés calórico y el incremento en la producción de las vacas lecheras, se desconoce si el efecto de interacción de la producción individual y el estrés calórico puede deprimir aún más la fertilidad en los meses calurosos del año. En un estudio reciente, se observó que la magnitud de la depresión de la tasa de no retorno al estro a 90 días (TNRE) fue más acentuada en las vacas con un mayor potencial de producción láctea (Al-Katanani et al., 1999); sin embargo, la TNRE sobreestima la tasa de preñez y no se analizan otros factores que pueden influir sobre esta variable. Por otro lado, los actuales sistemas intensivos de producción utilizan tecnologías como la administración de somatotropina bovina y el aumento en el número de ordeños al día, cuya interacción con el efecto del estrés calórico en la reproducción tampoco se ha estimado.

Los objetivos del estudio fueron estimar el efecto de la temperatura y humedad del ambiente y su interacción con el nivel de producción láctea, con la paridad, con el número de ordeños y con el uso de la somatotropina bovina sobre la tasa de gestación; y determinar la asociación de ésta última con el índice temperatura – humedad promedio del mes, en siete hatos comerciales de producción intensiva en el estado de Aguascalientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Registro y cálculo de las variables climáticas

Durante el período de estudio, en los años de 1999 y 2000, se obtuvo la información climática de los registros diarios de temperatura ambiente (° C) y la humedad relativa (HR) de la estación de la Comisión Nacional del Agua de

Aguascalientes, ubicada a menos 30 Km de los hatos lecheros en estudio. La temperatura ambiente se transformó a grados Fahrenheit (° F). Se calculó el índice temperatura – humedad (THI) de acuerdo a lo establecido por Ingraham et al. (1975), mediante la siguiente ecuación:

$$\text{THI} = \text{° F} - (0.55 - (((\text{HR} / 100) \times 0.55)) * (\text{° F} - 58))$$

Características generales de los hatos lecheros

La cuenca lechera de Aguascalientes se encuentra dentro de una área de riego. Los hatos lecheros están ubicados en un radio menor a 30 km de distancia entre ellos. Las siete unidades de producción en estudio utilizan dos y tres ordeños al día y forman parte de una organización empresarial integrada hasta el proceso y distribución de los productos lácteos y sus derivados. Todas las explotaciones en estudio tenían sombra en los corrales y en el área del pesebre, ninguna tenía métodos de mitigación del calor adicionales. Las características productivas promedio de las vacas fueron: 2.4 ± 1.5 partos, 3.2 ± 2.7 servicios, 146.6 ± 113.9 días en leche y 8436.7 ± 2326.7 l de producción de leche estimada a 305 días. Las vacas en todas las explotaciones fueron alimentadas con una dieta integral de acuerdo a su estado productivo. Los programas de manejo de medicina preventiva y de reproducción fueron similares.

Registro de la información productiva

Se realizaron evaluaciones de campo con apoyo de un sistema de cómputo. Se capturaron 20,606 registros de inseminación artificial de vacas lactantes de la raza Holstein, con intervalo al servicio mayor a 20 días post-parto. Cada registro contenía la siguiente información: número de la vaca; número de parto (NP), fecha del parto inmediato anterior, día, mes (MS) y año del servicio, número del servicio, los días en leche al momento del servicio (DEL), la producción láctea estimada a 305 días (PROD) de la lactancia en curso, resultado del diagnóstico de gestación del servicio, si la vaca estaba o no en un programa de administración de somatotropina bovina (BST) para incrementar y mantener la persistencia de

producción y de información general del hato, como: el número de ordeños (NORD) y número de vacas.

La producción de leche estimada a 305 días de las vacas se agrupo en tres niveles (PL):

PL1. Menor de 7,000 l (n = 3592).

PL2. Entre 7,000 y 8,500 l (n = 3515).

PL3. Mayor a 8,500 l (n = 7895).

El índice temperatura – humedad registrado en el día del servicio (THIS) fue subclasificado en cinco grupos:

1. Menor a 72 (n = 5621).

2. Entre 72 y 73.9 (n = 2524).

3. Entre 74 y 75.9 (n = 3737).

4. Entre 76 y 77.9 (n = 3814).

5. Mayor a 78 (n = 4910).

El número de parto en las vacas se subclasificó en:

1. Vacas de primer parto (n = 7540).

2. Vacas con dos partos (n = 5072).

3. Vacas con tres o más partos (n = 7994).

El número de ordeños por día:

1. Dos ordeños (n = 4760).

2. Tres ordeños (n = 15846).

El tamaño del hato lechero (NVIE):

1. Hatos con más de 1000 vacas (n = 8660).

2. Hatos con menos de 1000 vacas (n = 11946).

Análisis de la información

La variable evaluada fue la tasa de gestación (GEST). El modelo general al que se atribuyó el total de la variación fue:

$$Y_{mijkl} = \mu + B_m + \delta_{(m)} + MS_i + NP_j + MS \times NP_{ij} + BST_k + BST \times MS_{ik} + b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}}) + E_{(mijk)l}$$

Donde:

Y_{mijkl} = es la variable de respuesta de la l-ésima observación, de la k-ésima administración de somatotropina bovina, del j-ésimo número de parto y del i-ésimo mes de servicio.

μ = es la media general.

B_m = es el efecto de año de servicio hato lechero.

$\delta_{(m)}$ = es el error de restricción, NID $(0, \sigma^2_e)$.

MS_i = es el efecto del i-ésimo mes de servicio (1...12).

NP_j = es el efecto del j-ésimo número de parto (1,2,3).

$MS \times NP_{ij}$ = es el efecto de la interacción de i-ésimo mes de servicio con el j-ésimo número de parto.

BST_k = es el efecto del k-ésimo programa de administración de somatotropina bovina (0,1).

$MS \times BST_{ik}$ = es el efecto de la interacción del i-ésimo mes de servicio con el k-ésimo programa de administración de BST.

$b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}})$ = es el efecto de la covariable de los días en leche al momento del servicio en su forma lineal.

$E_{(mijk)l}$ = es el error NID $(0, \sigma^2_e)$.

En análisis preliminares las fuentes de variación que no fueron significativas fueron removidas.

Se realizó un segundo análisis para evaluar el efecto de interacción del MS con los diferentes niveles de producción (PL) sobre la tasa de gestación. El modelo al cual se atribuyó la variación fue:

$$Y_{ijk} = \mu + B_l + \delta_{(l)} + MS_i + PL_j + MS \times PL_{ij} + b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}}) + E_{(lij)k}$$

Donde:

Y_{ijk} = es la variable de respuesta de la k-ésima observación, del j-ésimo nivel de producción láctea y el i-ésimo mes de servicio.

μ = es la media general.

B_i = es el efecto de año de servicio hato lechero.

$\delta_{(i)}$ = es el error de restricción, NID $(0, \sigma^2_e)$.

MS_i = es el efecto de i-ésimo mes de servicio (1..12)

PL_j = es el efecto del j-ésimo nivel de producción (1,2,3).

$MS \times PL_{ij}$ = es el efecto de la interacción de i-ésimo mes de servicio con el j-ésimo nivel de producción.

$b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}})$ = es el efecto de la covariable de los días en leche al momento del servicio en su forma lineal

$E_{(lij)k}$ = es el error NID $(0, \sigma^2_e)$.

Para evaluar el efecto de interacción del THIS con los efectos de paridad, el número de ordeños y la aplicación o no de somatotropina bovina sobre la tasa de gestación, se realizó un análisis cuyo modelo al que se atribuyó la variación fue:

$$Y_{mijkln} = \mu + B_m + \delta_{(m)} + \text{THIS}_i + \text{NP}_j + \text{THIS} \times \text{NP}_{ij} + \text{BST}_k + \text{THIS} \times \text{BST}_{ik} + \text{NORD}_l + b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}}) + E_{(mijkl)n}$$

Donde:

Y_{mijkln} = es la variable de respuesta de la n-ésima observación, del l-ésimo ordeño, del k-ésimo programa de administración de somatotropina bovina, el j-ésimo número de parto y el i-ésimo índice temperatura – humedad en el día de servicio.

μ = es la media general.

B_m = es el efecto de año de servicio hato lechero.

$\delta_{(m)}$ = es el error de restricción, NID $(0, \sigma^2_e)$.

THIS_i = es el efecto del i-ésimo nivel del THIS (1,2,3,4,5).

NP_j = es el j-ésimo número de parto (1,2,3).

$\text{THIS} \times \text{NP}_{ij}$ = es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel de THIS con el j-ésimo número de parto.

BST_k = es el efecto del k-ésimo programa de administración de BST (0,1).

THIS x BST $_{ik}$ = es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel de THIS con el k-ésimo programa de administración de BST.

NORD I = es el efecto del I-ésimo ordeño (2,3).

$b_1(\text{del} - \mu_{\text{del}})$ = es el efecto de la covariable de los días en leche en su forma lineal.

$E_{(mijkl)n}$ = es el error NID $(0, \sigma^2_e)$.

Para evaluar los factores que modifican la producción de leche estimada a 305 días, el modelo al cual se le atribuyó la variación fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + NP_i + BST_j + NORD_k + E_{(ijkl)}$$

Donde:

Y_{ijkl} = es la variable de respuesta de la I-ésima observación, del k-ésimo número de ordeña, del j-ésimo programa de administración de somatotropina bovina y el i-ésimo número de parto.

μ = es la media general.

NP_i = es el i-ésimo número de parto (1,2,3).

BST_j = es el efecto del j-ésimo programa de administración de somatotropina bovina (0,1).

$NORD_k$ = es el efecto del k-ésimo número de ordeños (2,3).

$E_{(ijkl)}$ = es el error NID $(0, \sigma^2_e)$.

Para evaluar la GEST y la PROD se realizaron análisis de varianza donde el efecto principal fue NVIE. Se realizó un análisis de regresión para determinar la relación entre las medias mínimo cuadráticas de la tasa de gestación mensual y el índice temperatura – humedad promedio del mes. Los datos se analizaron por el método de mínimos cuadrados por el procedimiento de GLM de SAS (SAS, 1988).

RESULTADOS

La Gráfica 1 muestra una relación lineal negativa entre la tasa de gestación y la media mensual de THI ($P < 0.01$), cuya ecuación tuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.786. Por cada unidad de cambio de THI, la GEST se modifica en 1.03 %. La GEST se redujo en los meses de mayo a septiembre, cuyos valores fueron inferiores a lo observado en los meses de octubre ($P < 0.05$) y de noviembre a abril ($P < 0.01$).

En el Cuadro 1 se observa que las vacas expuestas a THIS mayor a 74 tuvieron una menor GEST ($P < 0.01$). La depresión de la GEST se acentuó cuando el THIS fue superior a 76 ($P < 0.01$). Las vacas primíparas mostraron mayor GEST, que las vacas de dos o más partos ($P < 0.01$). En las vacas con tres ordeños al día la GEST fue menor que en aquellas con dos ordeños ($P < 0.01$). Las vacas con PROD mayor a 8,500 l mostraron menor GEST ($P < 0.01$). La GEST en hatos con menos de 1000 vacas fue mayor que la de los hatos más grandes ($P < 0.01$). Los efectos de administración de BST y de las interacciones del THIS con NP, BST y NORD no fueron significativos sobre GEST ($P > 0.05$).

La Gráfica 2 muestra una reducción de la GEST en los meses de mayo a septiembre, que afectó por igual a las vacas de todos los niveles de PROD. Sin embargo, las vacas con PROD superior a 8,500 l tuvieron menor GEST en los meses de enero, octubre ($P < 0.05$), noviembre y diciembre ($P < 0.01$), que las vacas con PROD menor a 7,000 l. En el mes de diciembre, la GEST de las vacas con mayor nivel de PROD también fue inferior a lo observado en las vacas con PROD entre 7,000 y 8,500 l ($P < 0.05$).

La interacción entre THIS y nivel de PROD sobre la GEST se muestra en la Gráfica 3. Las vacas con mayor PROD tuvieron una menor GEST aún a valores de THIS que no afectaron la GEST de los otros dos grupos ($P < 0.01$); la reducción de la GEST en estas vacas fue evidente a THIS mayores a 76 ($P < 0.01$). En las vacas con producciones de 8,500 l o menores, la reducción de la GEST fue significativa

cuando se sirvieron a THIS con valores de 74 o mayores ($P < 0.01$). A valores de THIS de 74 o más, la GEST fue igual para los diferentes grupos de PROD ($P > 0.05$).

En el Cuadro 2 se observa que las vacas con dos o más partos, las que recibieron somatotropina bovina, las sujetas a tres ordeños al día y las de hatos con 1000 ó más vacas tuvieron una mayor PROD ($P < 0.01$).

DISCUSIÓN

Uno de los objetivos principales de este estudio fue generar información específica para una dinámica e importante cuenca lechera de México, donde se valoró la magnitud de la depresión de la tasa de gestación asociada con cambios en el índice temperatura – humedad, cuya fluctuación promedio mensual fue de 12 puntos entre los meses del año. El efecto detrimental del estrés calórico sobre la tasa de gestación era esperado, y demuestra que el clima es una variable de importancia que afecta a las vacas lecheras de regiones áridas y semi-áridas de México. Esto se ha documentado previamente en otros estudios realizados en sistemas intensivos de producción de leche en vacas Holstein (Avendaño et al., 1990; Fernández, 1997). Sin embargo, esos estudios han sido realizados en un solo hato (Avendaño et al., 1990) o son medias generales de la fertilidad registrada en varias explotaciones de una región (Fernández et al., 1997) sin que la información se haya ajustado a otros factores que pueden influir en la gestación.

La reducción del promedio mensual de 1.03 % de la gestación por cada unidad de incremento del THI promedio del mes, coincide con lo informado por Ravagnolo y Misztal (2002) en cuanto a tendencia, aunque los valores absolutos observados por ellos sean menores (0.5 % de no retorno al estro a 45 días por unidad de incremento de THI), la diferencia estriba, probablemente, en que en su caso el THI está referido al del día del servicio de cada vaca y su variable de respuesta es no retorno al estro, que es menos precisa como estimador de la fertilidad que la tasa de gestación. La reducción de la gestación en las vacas expuestas a un THIS

superior a 74 fue evidente, por lo que parece que la GEST se ve poco afectada hasta alrededor de este nivel de estrés calórico. Cuando el THIS alcanzó un nivel superior a 76 la reducción de la GEST de las vacas se agudizó, incluso en aquellas con producciones mayores a 8,500 l, que por su menor GEST en general, no habían experimentado cambios con THIS menores a 76. Varios estudios han demostrado que cuando las condiciones de confort de los animales para tener una fertilidad adecuada no habían sido cubiertas, y se expusieron a temperatura y humedad ambiental elevadas dos días antes del servicio (Ingraham et al., 1975) y al momento del servicio (Cartmill et al., 2001; Ravagnolo y Misztal, 2002) se afectaron la tasa de fertilización y el desarrollo embrionario. Al respecto, se ha descrito que el estrés calórico afecta el desarrollo final del folículo ovulatorio y la maduración y competencia del ovocito, que repercuten negativamente en la tasa de fertilización y en la sobrevivencia embrionaria temprana (Putney et al., 1989; Sartori et al., 2002) y tardía (Cartmill et al., 2001).

A pesar de no haberse observado diferencias en la GEST debida a los distintos niveles de PROD en los meses calurosos y con THIS superiores a 74, la recuperación de la tasa de GEST observada antes del inicio del estrés calórico, se alcanzó en forma más tardía en las vacas con PROD mayor a los 8,500 l. Por otra parte, es importante destacar que los niveles de GEST de las vacas altas productoras fue inferior en todos los rangos de THIS estudiados, con o sin estrés calórico, lo que permite inferir que el estrés fisiológico vinculado al nivel de producción es un factor de gran importancia y que hace más sensibles a las vacas al estrés calórico, cuyo efecto se acarrea por varios meses, lo que impide la recuperación de los niveles de GEST en el otoño y el invierno temprano en vacas con mayor PROD.

La lenta recuperación de la GEST en las vacas con mayor nivel de PROD puede estar relacionado a un efecto retrasado del calor del verano sobre el desarrollo y la calidad folicular y del ovocito, la función lútea, el desarrollo del embrión y el ambiente uterino que juegan un papel importante en la fertilidad de las vacas

lecheras durante el verano y el otoño. Se ha observado en vacas Holstein lactantes (Roth et al., 2001a) y no lactantes (Guzeloglu et al., 2001) expuestas a estrés calórico durante el verano (Roth et al., 2001a) o en un ciclo folicular (Guzeloglu et al., 2001) un incremento de folículos no saludables (Guzeloglu et al., 2001), una menor calidad morfológica del cúmulo ovígeno y una reducción en el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocito (Roth et al., 2001a). El daño causado a los folículos se ha demostrado, ya que la inducción del recambio acelerado de folículos, mediante tratamientos repetidos con factor liberador de las gonadotropinas y la aspiración frecuente de los folículos mayores de 5 mm (Guzeloglu et al., 2001) y entre 3 y 7 mm (Roth et al., 2001a) durante varios ciclos estrales, dispuso el efecto detrimental del estrés calórico sobre el desarrollo folicular, reduciendo el grupo de folículos dañados y permitiendo el reclutamiento de folículos saludables, lo que mejoró la calidad del cúmulo ovígeno y del desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocito, en un período más corto, que lo observado en el grupo de vacas no tratadas.

No se sabe el mecanismo exacto por el cual el estrés calórico puede afectar a los folículos y a los ovocitos, pero se ha descrito que se produce un daño en la comunicación intercelular entre las células de la granulosa, del cúmulo y del ovocito (Roth et al., 2001b; Al-Katanani et al., 2002), se afecta la competencia del ovocito para ser fertilizado (Al-Katanani et al., 2002; Sartori et al., 2002), se altera el contenido proteico (Ambrose et al., 1999) y la viabilidad de las células de la granulosa y de las de la teca interna y se producen cambios en la esteroidogénesis (Wolfenson et al., 1993; Wolfenson et al., 1997; Roth et al., 2001b). Por lo tanto, algunos folículos pudieran ser afectados aún 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.

Se ha descrito que la intensificación de los sistemas de producción de leche han contribuido a la declinación de la fertilidad. Se ha estimado en el transcurso de los últimos 25 años una reducción anual entre 0.5 y 1 % de la fertilidad del primer

servicio en las vacas en sistemas intensivos (Butler, 1998; Roche et al., 2000; Royal et al., 2000). El presente estudio coincide con las mismas tendencias observadas en estudios realizados recientemente en vacas Holstein, en los que se determinó que la magnitud de la depresión de la tasa de no retorno al estro (TNRE) a 45 y 90 días del primer servicio en los meses calurosos del año, fue más acentuado en las vacas con mayor producción (Al-Katanani et al., 1999; Ravagnolo y Misztal, 2002). Así mismo, la magnitud de la reducción de la GEST en los meses calurosos del año tuvo un rango entre 29 y 33 %, comparados con el mes con mayor GEST; siendo estos valores inferiores en cuanto a depresión de la TNRE (alrededor del 90 %) observado por Alkatanani et al. (1999) en vacas altas productoras. Por su parte, Ravagnolo y Misztal (2002) describen una pérdida de alrededor de 16 % de TNRE a 45 días a partir del punto más alto de la TNRE. Las diferencias cuantitativas pueden deberse a que los parámetros evaluados son distintos, al igual que el rango de valores de THI que fue más amplio en el trabajo de esos autores.

La administración de somatotropina bovina (BST) es una práctica ampliamente usada para incrementar la producción de leche en los sistemas intensivos de México. Las vacas que se mantuvieron bajo un régimen de administración de BST cada 12 o 14 d no mostraron efecto alguno de la BST ni de su interacción con el THI sobre la tasa de gestación. Algunos estudios indican que vacas tratadas con BST en el día del servicio y en el 10^o día del ciclo, experimentan incrementos de la tasa de preñez (Mendoza, 2000; Morales-Roura et al., 2001), de la sobrevivencia de los embriones recuperados y de la tasa de preñez de vacas receptoras (Moreira et al., 2000; Moreira et al., 2001; Moreira et al., 2002). En esos estudios, la aplicación de BST fue programada con relación al día del servicio en animales experimentales, en tanto que en el trabajo motivo de esta comunicación, la administración de BST fue como se usa comercialmente, en función del progreso de la lactancia, sin tomar en consideración el día del servicio.

El incremento del número de ordeñas y del tamaño del hato tienen un efecto sobre la reproducción de las vacas, probablemente porque en estas condiciones aumenta el grado de dificultad para cumplir adecuadamente con prácticas rutinarias como la observación de calores, y otras de control sanitario y reproductivo (Lucy et al., 2001).

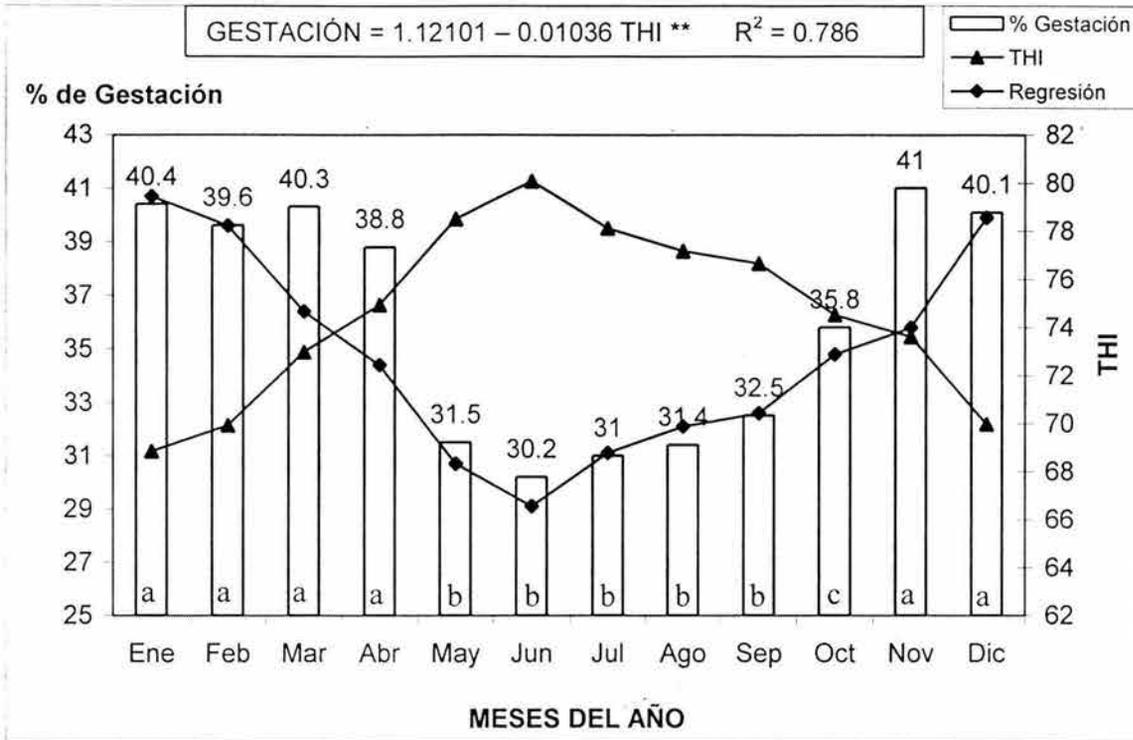
CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Una menor fertilidad en las épocas cálidas del año, independientemente de un alto riesgo de eliminación de las vacas, implica por una parte, que haya estacionalidad en la parición y en la producción de leche, con mayor frecuencia de partos en los meses de verano y otoño del siguiente ciclo productivo. El incremento de la producción concurre al mercado cuando existe una mayor oferta de leche al agregarse la proveniente de sistemas estacionales y de doble propósito, lo que reduce el precio del producto y dificulta su comercialización.

En la cuenca lechera de Aguascalientes se ha dado un incremento importante en la producción láctea, cada vez con un mayor número de vacas por hato y grado de tecnificación; por lo que el impacto del estrés calórico en la producción y la reproducción animal seguirá siendo un problema no resuelto y vigente, que será cada vez más importante. La gran mayoría de los hatos de esta cuenca lechera se caracterizan por no tener sistemas para mitigar el calor, excepto sombras en los corrales, comederos y áreas de espera, por lo que es recomendable incluir sistemas adicionales de enfriamiento como ventiladores, aspersores y nebulizadores, que han demostrado efectos benéficos en la producción y la reproducción. Otra alternativa que resulta conveniente explorar para mejorar la fertilidad de las vacas durante el verano y el otoño, es la inducción por medios artificiales del recambio folicular acelerado que permita el reclutamiento de folículos más saludables.

GRÁFICA 1

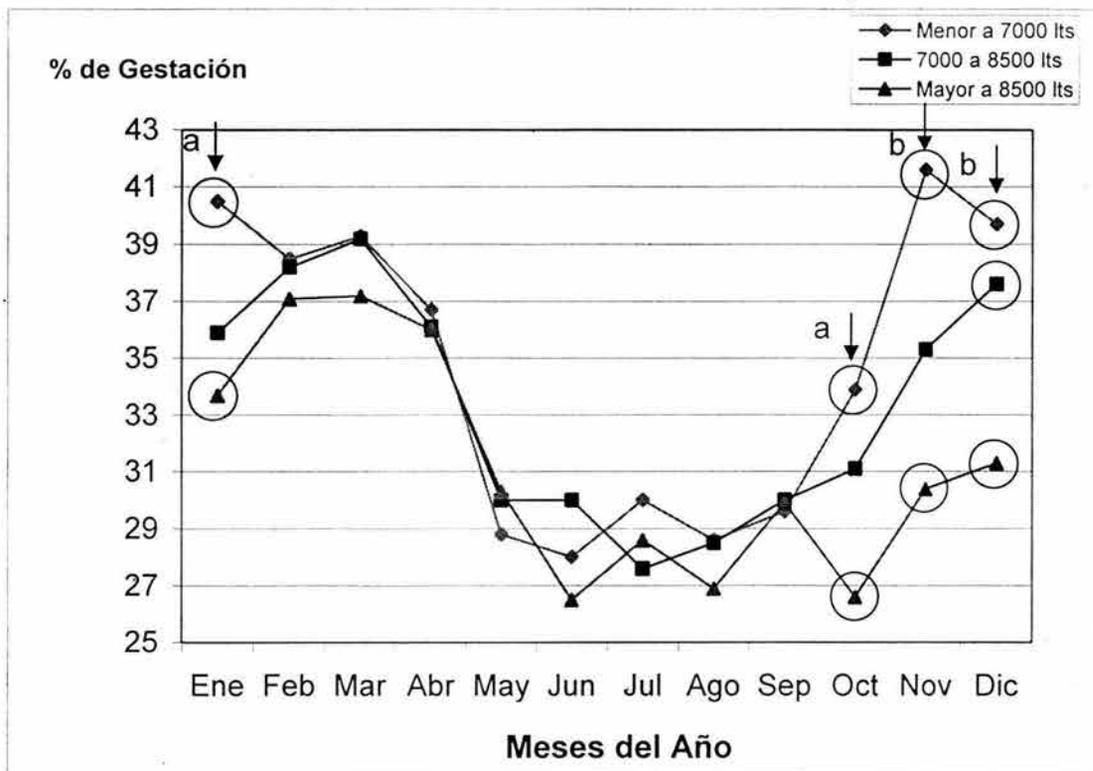
Relación entre las medias mínimo cuadráticas de la tasa de gestación, y la media mensual del índice temperatura – humedad (THI) registradas a través del año en sistemas intensivos de producción de leche del estado de Aguascalientes



a, b / Distintas literales indican diferencia significativa (P<0.01).
 a, c / Distintas literales indican diferencia (P<0.05)
 b, c / Distintas literales indican diferencia (P<0.05)

GRÁFICA 2

Efecto de interacción del nivel de producción de leche estimada a 305 días y el mes de servicio sobre la tasa de gestación en vacas Holstein de sistemas intensivos de producción de leche del estado de Aguascalientes

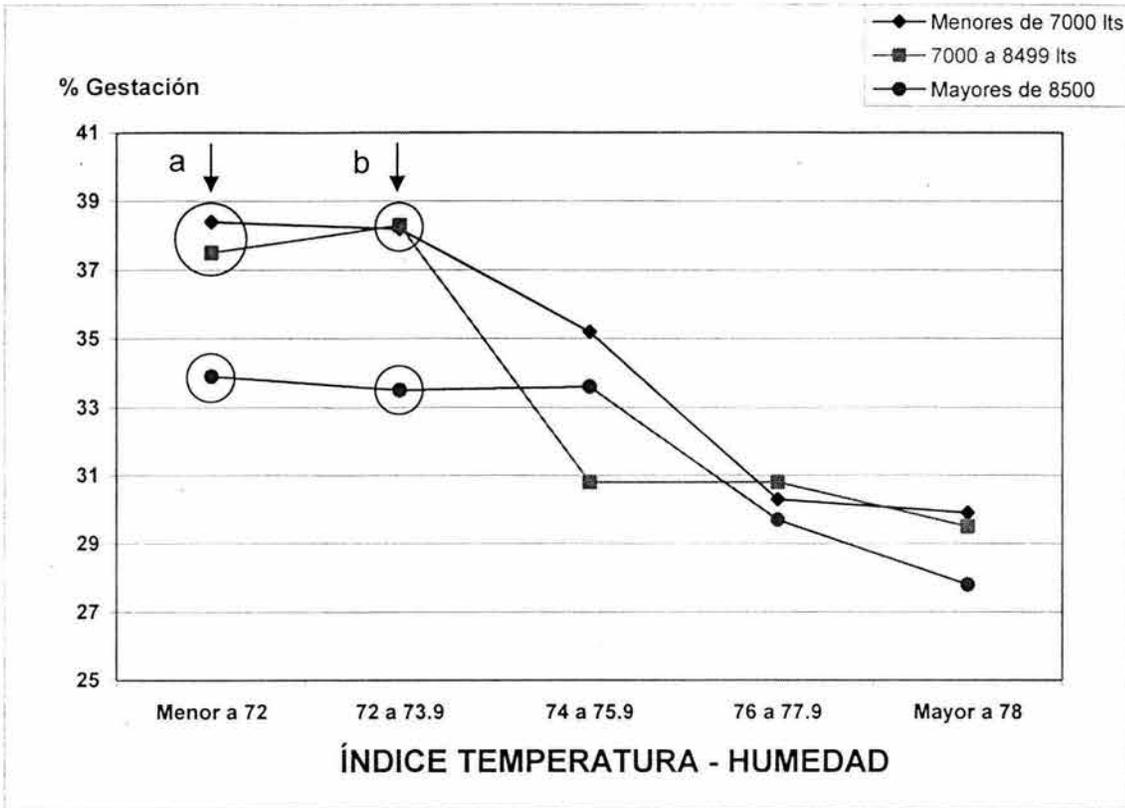


a ↓ Indica diferencia significativa entre los datos en círculo dentro del mismo mes ($P < 0.05$).
 - En el mes de diciembre, los puntos en círculo entre los dos niveles de mayor PROD, indica una diferencia entre estos ($P < 0.05$)

b ↓ Indica diferencia significativa entre los datos en círculo dentro del mismo mes ($P < 0.01$).

GRÁFICA 3

Relación de la tasa de gestación y del índice temperatura – humedad en los diferentes niveles de producción láctea de vacas Holstein en Aguascalientes



- a ↓ Indica diferencia entre los valores en círculo dentro del mismo rango de THI ($P < 0.05$)
- b ↓ Indica diferencia entre los valores en círculo dentro del mismo rango de THI ($P < 0.1$)

CUADRO 1. Efecto del índice temperatura – humedad en el día del servicio (THIS), número de parto, la administración o no de somatotropina bovina, el número de ordeños, el nivel de producción láctea, y el tamaño del hato lechero sobre la tasa de gestación en vacas Holstein en producción en Aguascalientes

THIS	n	% GESTACIÓN
Menor a 72	5621	39.4 a
72 a 73.9	2524	38.5 ab
74 a 75.9	3737	36.9 b
76 a 77.9	3814	32.5 c
Mayor a 78	4910	31.6 c
Número de Parto		
1	7540	38.2 d
2	5072	36.4 e
3 o más	7994	32.7 f
Somatotropina bovina		
No	11166	35.2 a
Si	9440	36.4 a
Número de ordeños		
2	4760	37.3 a
3	15846	34.3 b
PROD láctea (l)		
Menor de 7,000	3592	34.4 a
7,000 a 8,500	3515	33.4 a
Mayor de 8,500	7895	31.7 b
Tamaño del hato		
Menor a 1000 vacas	8660	35.8 a
1000 vacas o más	11946	33.9 b

a, b, c / Distintas literales por columna dentro del mismo efecto principal (P<0.01).
d, e / Distintas literales por columna dentro del mismo efecto principal (P<0.05)
d, e vs f / Distintas literales por columna dentro del mismo efecto principal (P<0.01)

CUADRO 2. Medias mínimo cuadráticas de la producción estimada de leche a 305 días para los efectos del número de partos, la administración o no de somatotropina bovina, el número de ordeños, y el tamaño del hato en vacas Holstein de sistemas intensivos de producción en Aguascalientes

Número de Parto	n	$\bar{x} \pm e.e.$
1	5547	7945.4 \pm 38.9 a
2	3667	8374.2 \pm 43.5 b
3 o más	5788	8409.7 \pm 34.9 b
Somatotropina Bovina		
NO	8047	8051.5 \pm 28.9 a
SI	6955	8434.7 \pm 40.1 b
Número de Ordeños		
Dos ordeños	2245	7927.4 \pm 53.3 a
Tres ordeños	12757	8558.8 \pm 20.7 b
Número de vacas por hato		
Menor a 1000 vacas	5617	7772.7 \pm 30.2 a
1000 vacas o más	9385	8834.1 \pm 23.4 b

a, b , c / Distintas literales por columna dentro de cada efecto principal (P<0.01).

LITERATURA CITADA

Al-Katanani YM, Webb DW and Hansen PJ. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J Dairy Sci* 1999;(82): 2611-2616.

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):390-396.

Ambrose JD, Guzeloglu A, Thatcher MJ, Kassa T, Díaz T and Thatcher WW. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to heat-stress. *J Reprod Fert* 1999 (Suppl 54):503-504.

Avendaño RL, Molina RL y Correa CA. Factores ambientales que influyen sobre la eficiencia reproductiva en un hato Holstein de Baja California. *Reun Nac Inv Pec Pec* 1990: 447.

Barash H, Silanikove N, Shamay A and Ezrat E. Interrelationships among ambient temperature, day length, and milk yield in dairy cows under a mediterranean climate. *J Dairy Sci* 2001(84):2314-2320.

Butler WR. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1998(81):2533-2539.

Call EP. Economics associated with calving intervals. *Large dairy herd management* Ed Univ Press Florida, Gainesville 1978:190.

Cartmill JA, El-Zarkouny SZ, Hensley BA, Rozell TG, Smith JF and Stevenson JS. An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperatures before or after calving or both. *J Dairy Sci* 2001(84): 799-806.

Ealy AD, Drost M and Hansen PJ. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J Dairy Sci* 1993 (76): 2899.

Faust MA, Mc Daniel BT, Robinson OW and Britt JH. Environmental and yield effects on reproduction in primiparous Holstein. *J Dairy Sci* 1988(71): 3092-3099.

Fernández DLJ. Evaluación de parámetros reproductivos en hatos de la comarca lagunera Unión Ganadera. *Memorias del CIGAL* 1997:12-14.

Funk DA, Freeman AE and Berge PJ. Effects of previous days open previous days dry, and present days open on lactation yield. *J Dairy Sci* 1987(70): 2366.

Grohn YT and Rajaal-Schultz PJ. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2000(60-61):605-614.

Guzeloglu A, Ambrose JD, Kassa T, Diaz T, Thatcher MJ and Thatcher WW. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. *Anim Reprod Sci* 2001(66):15-34.

Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Al-Katanani YM, Krininger III CE and Chase CC Jr. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* 2000(55):91-103.

Ingraham RH, Stanley RW and Wagner WC. Relationship of temperature and humidity to conception rate of hosltein cows in Hawai. *J Dairy Sci* 1975(59):2086-2090.

Lucy, MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?. *J Dairy Sci* 2001(84):1277-1293.

Mendoza MG. Efecto de una dosis de 500 mg de somatotropina bovina recombinante (rbST) en la Gestación de vacas Holstein al primer servicio y repetidoras. Tesis de Maestría UNAM 2000.

Morales-Roura JS, Zarco L, Hernández-Cerón J and Rodríguez G. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. *Theriogenology* 2001(55):1831-1841.

Moreira F, Risco CA, Pires MF, Ambrose JD, Drost M and Thatcher WW. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2000(83):1237-1247.

Moreira F, Badinga L, Burnley C and Thatcher WW. Effects of bovine somatotropin on embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2001(55):535.

Moreira F, Badinga L, Burnley C and Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology* 2002(57):1371-87.

Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H and de Kruif A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 2000(53):841-857.

Osen S, Misztal I, Tsuruta S and Rekaya R. Seasonality of days open in US Holsteins. *J Dairy Sci* 2003(86): 3718-3725.

Putney DJ, Mullins S, Thatcher WW, Drost M and Gross TS. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim Reprod Sci* 1989(19):37.

Ravagnolo O and Misztal I. Effect of heat stress on nonreturn rate in Holsteins: fixed-model analyses. *J Dairy Sci* 2002(85):3101-3106.

Roche JF, Mackey FD and Diskin MD. Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci* 2000(60-61): 703-712.

Roth Z, Arav A, Zeron Y, Braw-Tal R and Wolfenson D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* 2001a(122):737-744.

Roth Z, Meidan R, Shaham-Albalancy A, Braw-Tal R and Wolfenson D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 2001b(121):745-751.

Royal M, Mann GE and Flint AP. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *The Veterinary Journal* 2000(160):53-60.

Ryan DP, Prichard JF, Kopel E and Godke RA. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology* 1993(39):719-737.

Sartori S, 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):2803-2812.

SAS SAS/STAT User's Guide (Release 603) 1988 Cary NC, USA: SAS Inst Inc.

Scott H L, Meint J de Vries and Ynte HS. The effects of time of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. *J Dairy Sci* 1999(82):2589-2604.

Washburn SP, Silva WJ, Brown CH, McDaniel BT and McAllister AJ. Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J Dairy Sci* 2002(85):244-251.

West JW, Mullinix BG and Bernard JK. Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2003(86):232-242.

Wolfenson D, Luft O, Berman A and Meidan R. Effect of season, incubation temperature and cell age on progesterone and prostaglandin f2 alpha production in bovine luteal cells. *Anim Reprod Sci* 1993(32):27-40.

Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y and Meidan R. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim Reprod Sci* 1997(47):9-19.

Wolfenson D, Roth Z and Meidan R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim Reprod Sci* 2000(60-61):535-547.

CAPÍTULO 5

EFECTOS DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE LA FERTILIZACIÓN, DESARROLLO Y CALIDAD EMBRIONARIA EN VACAS HOLSTEIN

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar en dos épocas de colección embrionaria con o sin estrés calórico la respuesta superovulatoria, la producción de embriones y óvulos y las características de calidad de los mismos en vacas Holstein superovuladas en el altiplano centro-norte de México. Se emplearon 42 vacas con una producción de $10,756.4 \pm 443.8$ l de leche estimada a 305 días (P305D) y 111.4 ± 6.7 días en leche. La superovulación se realizó con 400 mg de hormona foliculo estimulante en dosis decrecientes en dos épocas de colección embrionaria: 1. Templada y 2. Cálida. Al séptimo día post-servicio los embriones fueron recuperados del útero. La respuesta superovulatoria y las variables de producción y calidad embrionaria se analizaron por medio de una prueba de ji-cuadrada, donde el efecto principal fue la época de colección. Los días en leche, la condición física corporal y la paridad de las vacas fueron similares entre épocas ($P > 0.05$). Mientras que la P305D y el peso inicial de las vacas fueron superiores en la época de colección templada ($P < 0.05$). La respuesta superovulatoria (85.1%) y la tasa de fertilización (76.2%) fueron similares entre épocas ($P > 0.05$). En la época templada se obtuvo una mayor tasa de colección embrionaria y óvulos (89.3%) y de embriones (59.8%), que lo observado en la época cálida (53.6 y 40.1%, $P < 0.01$). Se colectó un mayor número de embriones y óvulos (10.6), de embriones (7.4) y de óvulos (3.1) por vaca en la época templada, que lo observado en las de época cálida (6.1, 4.4 y 1.6, $P < 0.01$). Durante la época cálida se tuvo un mayor porcentaje de vacas en las que se colectaron de 0 a 2 embriones y óvulos (36.8%) y de 0 a 1 óvulos (73.7%) que en las de la época templada (11.8%, 47.1%, $P < 0.01$). Los embriones que fueron congelados en la época templada presentaron una mejor calidad (1.35) que la observada en la cálida (1.59) ($P < 0.01$). La calidad mejoró conforme se desarrollo el embrión de mórula (1.66) a blastocito expandido (1.08) ($P < 0.01$). Los embriones congelados de estadio de mórula (1.9, $P < 0.01$) y blastocito temprano (1.88, $P < 0.11$) de la

época cálida fueron de menor calidad, que la observada en los de la época templada (1.42, 1.57). En la época cálida se presentó una menor colección de embriones y óvulos y una menor calidad embrionaria, que podría estar relacionada con la presencia de una mayor tasa de anovulación y con la posible formación de folículos luteinizados y con un posible retraso del desarrollo del embrión por efecto del estrés calórico durante su desarrollo hasta el día de la colección.

INTRODUCCIÓN

La subfertilidad se ha definido como una condición que impide el establecimiento de la preñez después de haberse completado la involución uterina. Se sabe que esta característica es afectada por una gran cantidad de factores ambientales, infecciosos y productivos (Scott et al., 1999; Grohn y Rajala, 2000). Una de las herramientas utilizadas para investigar los eventos relacionados con la fertilidad ha sido la superovulación, la colección y transferencia embrionaria. La menor producción de embriones transferibles en vacas superovuladas está asociada a una menor respuesta superovulatoria, a una menor tasa de fertilización y a un menor desarrollo y calidad del embrión, las cuales pueden ser afectadas por el estrés calórico (Hansen et al., 2000).

En estudios realizados en vaquillas Holstein superovuladas expuestas a estrés calórico al inicio del estro (Putney et al., 1989 a), y en vacas Holstein superovuladas de 6 a 7 meses de lactancia (Monty y Racowsky, 1987) se observó un decremento de la fertilización y en el desarrollo embrionario, que las vacas no sometidas a un estrés calórico. Sin embargo, en vaquillas Holstein superovuladas en condiciones de estrés calórico provistas de sombra, no se afectó la tasa de fertilización, ni el porcentaje de embriones transferibles al 7º día de edad del embrión (Putney et al., 1989 c). En vacas no superovuladas, con un promedio de 110 días en leche y con suficiente tecnología para aminorar el estrés calórico, tampoco se encontró un efecto del calor ambiental sobre la tasa de fertilización (Ryan et al., 1993). Las investigaciones que se derivan de esta información, se ha obtenido fundamentalmente de estudios en condiciones climáticas artificiales, en

muchas ocasiones aplicados en forma aguda en vaquillas (Putney et al., 1989 a; Putney et al., 1989 c), de vacas no sujetas a estrés fisiológico en el pico de su lactancia (Monty y Racowsky, 1987; Putney et al., 1989 b) y de vacas lactantes no superovuladas (Ryan et al., 1993).

La fertilización y las primeras divisiones del embrión *in vitro*, de ovocitos colectados de vacas Holstein expuestas a estrés calórico durante el verano, no fueron afectadas. Sin embargo, el porcentaje de embriones que se desarrollaron hasta el estadio de blastocito fue menor cuando los ovocitos provenían de vacas estresadas (Al-Katanani et al., 2002). En otro estudio realizado *in vitro*, la exposición de ovocitos a estrés calórico no afectó la tasa de fertilización, mientras que los embriones sujetos a patrones de temperatura similares al experimentado en vacas lactantes durante los días de verano, durante 24 h (de 52 a 84 h post-inseminación) no afectó el desarrollo embrionario a blastocito. Pero cuando estos patrones se prolongan durante ocho días post-inseminación, el porcentaje de desarrollo al estadio de blastocito fue menor que en los testigos (Rivera y Hansen, 2001).

Otro aspecto destacado en los últimos años es que la sensibilidad del embrión al estrés calórico es variable, que depende de la adaptabilidad de cada raza bovina a esa condición. Se ha observado en embriones desarrollados *in vitro* provenientes de razas *Bos indicus* y de *Bos taurus* adaptadas al trópico, una mayor tolerancia al estrés calórico que los de razas *Bos taurus* adaptadas a climas templados, lo que indica la existencia de un factor intrínseco del ovocito que podría explicar estas diferencias (Rocha et al., 1998; Hernández et al., 2004).

Con la finalidad de determinar los efectos de estrés calórico estacional sobre la respuesta superovulatoria, la tasa de fertilización *in vivo* y el desarrollo embrionario hasta su colección del útero, se diseñó este experimento con vacas Holstein en condiciones comerciales de producción intensiva durante la etapa más alta de producción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y clima

El estudio se realizó en dos hatos comerciales de vacas Holstein en producción intensiva de leche. Las épocas de superovulación y de colección embrionaria (EPO) fueron:

1. Epoca templada (ETEM).

- a. Inicio de la superovulación el 5 de febrero y colección embrionaria el 17 de febrero (n = 10).
- b. Inicio de la superovulación el 12 de marzo y colección embrionaria el 24 de marzo (n = 10)

2. Epoca cálida (ECAL).

- a. Inicio de la superovulación el 21 de mayo y colección embrionaria el 2 de junio (n = 10)
- b. Inicio de la superovulación el 2 de julio y colección embrionaria el 14 de julio (n = 12).

Se registraron las variables climáticas de temperatura ambiente (° C) y humedad relativa (%) con lo que fue calculado el índice temperatura – humedad (THI), conforme a lo descrito en la literatura (Ingraham et al., 1975). En el Cuadro 1 se resumen los valores registrados en las épocas de estudio. Se observa que las variables climáticas y el THI fueron diferentes entre épocas ($P < 0.01$).

CUADRO 1. Temperatura ambiente, humedad relativa e índice temperatura – humedad (THI) registrados durante el período de colección embrionaria: época templada (9 al 17 de febrero / 2001 y del 12 al 24 de marzo / 2001) y cálida (21 de mayo al 2 de junio / 2001 y del 2 al 14 de julio / 2001) en Aguascalientes, México

	Epoca Templada		Epoca Cálida	
	X ± e.e.	Rango	X ± e.e.	Rango
Temperatura máxima, ° C	25.6 ± 0.35 a	23.2 a 28.1	29.5 ± 0.36 b	26.4 a 32.7
Temperatura mínima, ° C	5.7 ± 0.47 a	1.3 a 8.0	12.4 ± 0.48 b	7.8 a 16.4
Humedad relativa, %	33.1 ± 3.40 a	13.7 a 56.2	52.7 ± 3.49 b	30.5 a 70.2
THI	70.5 ± 0.3 a	68.7 a 72.4	78.0 ± 0.3 b	75.9 a 81.6

a,b / Distintas literales por renglón indican diferencia significativa ($P < 0.01$).

Animales experimentales

De cada vaca donadora de embriones se registraron las siguientes variables productivas: la producción láctea estimada (P305D), los días en leche (DEL), la condición física corporal (CFI), en una escala de 1 a 5, con una aproximación de 0.25 (Ferguson et al., 1994), el peso corporal al inicio del estudio (PINIC) se estableció a través del registro de la circunferencia torácica y el número de parto (NP). En las dos épocas de estudio se empleó un total de 42 vacas de la raza Holstein, clínicamente sanas, con 111.4 ± 6.7 DEL y una P305D de $10,623.9 \pm 443.8$. En el cuadro 2 se presentan las características productivas de las vacas donadoras de cada época evaluada. Se observa una similitud de condiciones entre las vacas de ambos grupos en NP, DEL, la CFI y el intervalo del celo a la colección embrionaria ($P > 0.05$). La producción láctea y el peso corporal en las vacas de la época templada fueron superiores a lo observado en las vacas de la época cálida ($P < 0.01$).

CUADRO 2. Variables productivas de las vacas donadoras al inicio de la superovulación en las dos épocas de colección embrionaria

Variables	Epoca Templada		Epoca Cálida	
	N	X \pm e.e.	n	X \pm e.e.
Número de Partos	20	2.53 \pm 0.26 a	22	2.36 \pm 0.24 a
Días en Leche	20	101.7 \pm 7.22 a	22	109.0 \pm 6.8 a
Peso Corporal, kg	20	674.8 \pm 18.8 a	22	612.2 \pm 17.8 b
Condición Física, (1-5)	20	3.32 \pm 0.07 a	22	3.39 \pm 0.07 a
Producción láctea estimada, l	20	11609.9 \pm 473.0 a	22	9992.7 \pm 444.9 b
Intervalo Celos – Colección	17	7.23 \pm 0.1 a	19	7.20 \pm 0.1 a

a,b / Distintas literales por renglón indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Alimentación

La alimentación se proporcionó seis veces al día en forma de ración integral. Los forrajes utilizados fueron ensilaje de maíz, rye grass verde y heno de alfalfa. El concentrado estuvo formado por una mezcla comercial, semilla de algodón, bagazo húmedo de cervecería, proteína no degradable en rumen (Soybest®, Grain Staples Inc.) y grasa de sobrepaso (Megalac®, Rumen Bypass Fat, Arm & Hammer Animal Nutrition Group). La relación forraje concentrado fue de 35:65. La composición química de la dieta total en base seca fue: 1.79 Mcal de energía neta

de lactancia / kg, 17.7% de proteína cruda, 37% de proteína no degradable, 19.6% de fibra detergente ácido, 35% de fibra detergente neutro, 7.1% de grasa y 31% de carbohidratos no estructurales. Las vacas tuvieron libre acceso al agua.

Superovulación e inseminación artificial

Se registró la fecha y hora del estro previo a la superovulación, del cual se revisaron los signos secundarios del estro, como la turgencia del útero y la presencia de moco cervical limpio. La superovulación se inició entre el 9º y 11º día después del estro con la administración total de 400 mg de hormona foliculo estimulante en dosis decreciente (Folltropin – V, Vetrepharm Inc) cada 12 h durante cuatro días por vía intramuscular. Al tercer día se administraron 50 mg de prostaglandina f2 alfa fraccionada en dos aplicaciones, una por la mañana y otra por la tarde (Monty y Racowsky, 1987; Putney et al., 1989c). La detección del estro se realizó en forma continua en ambas explotaciones lecheras con el apoyo de detectores de monta que se activaban a la presión (Kamar, Kamar Inc.). Se registró la hora y el día de la aceptación de la primera monta homosexual detectada. La inseminación artificial se realizó con semen descongelado a las 12 y 24 horas de detectada la primera monta homosexual.

Colección embrionaria

Al séptimo día del primer servicio se realizó un examen tocológico y se determinaron el número de cuerpos lúteos presentes en ambos ovarios. Los embriones fueron recuperados del útero como se describe en la literatura (Elsden, 1976), por un solo técnico calificado en forma no quirúrgica con una solución salina fosfatada con 0.4% de albúmina sérica bovina, usando una sonda foley de dos vías. El lavado de los cuernos uterinos pasó a través de un filtro de 75 µM, en el cual quedó entre 15 y 25 ml del total del lavado uterino. El filtro fue lavado y decantado en una caja de petri cuadrículada 100 x 10 para la búsqueda de los embriones y óvulos a través de un microscopio estereoscópico.

Evaluación embrionaria

Los embriones fueron evaluados a 40 y 50 X por un solo técnico a través de un microscopio estereoscópico, basados en el estado de desarrollo y los diferentes grados de calidad del embrión (Linder y Wright, 1983). Los estadios de desarrollo embrionario (EST) considerados fueron: óvulo, embrión de 2 a 16 células, mórula temprana, mórula compacta, blastocito temprano, blastocito maduro y blastocito expandido.

Los factores que se tomaron en cuenta para la evaluación de la calidad del embrión fueron: el estado de desarrollo de acuerdo con la edad, el número de células, la compactación celular, el color, blastómeros extruidos, regularidad de la zona pelúcida, presencia de restos celulares en el espacio perivitelino y de vesículas y necrosis celular. Con este criterio, los embriones se clasificaron en cuatro grados de calidad: excelente, bueno, regular y no transferible. Se definieron como embriones transferibles (ET) aquellos que tuvieron un estadio de desarrollo de acuerdo al día de la colección embrionaria y con un grado de calidad excelente, bueno o regular. Los embriones procesados para su congelación fueron aquellos que tuvieron un grado de desarrollo de acuerdo al día de la colección embrionaria y una calidad excelente y buena. Los embriones Retrasados fueron aquellos que no tuvieron el desarrollo de acuerdo al día de la colección embrionaria y que estuvieron entre los estadios de embriones de 2 a 16 células a mórula temprana.

VARIABLES EVALUADAS

De cada vaca donadora y de cada época de colección se evaluaron: el porcentaje de vacas que respondieron al tratamiento superovulatorio (RSO), el número de cuerpos luteos detectados en el exámen tocológico al momento de la colección embrionaria (NCL), la tasa de colección de embriones y óvulos (TREO) (relación del número de embriones y óvulos colectados entre NCL), la tasa de colección embrionaria (TRE) (relación del número de embriones entre el NCL), número de embriones y óvulos (NEO), de embriones (NE) y de óvulos (NO) colectados por vaca y la tasa de fertilización (TFERT) (relación del NE entre el NEO). Así mismo,

se evaluaron los estadios de desarrollo y la calidad de los embriones transferibles y los que fueron sujetos a congelación. Se evaluó la distribución del número de embriones y óvulos en ambas épocas de colección embrionaria.

Análisis estadístico

Las variables climáticas fueron analizadas a través de un análisis de varianza, donde la variable independiente fue la EPO. Las características productivas se analizaron a través de un análisis de varianza con bloques al azar, donde la variable independiente fue la EPO y el hato-período de muestreo se tomó como bloque. Las variables NCL, NEO, NE, NO, estadio y calidad de los embriones transferibles y retrasados, la TFERT, TREO Y TRE y la distribución del número de vacas superovuladas en relación con el número de embriones y óvulos colectados se analizaron por medio de una prueba de Ji-cuadrada donde el efecto principal fue la EPO. Se evaluó la calidad del embrión congelado con la interacción de la EPO con el EST a través de una prueba de Ji-cuadrada (SAS, 1988).

RESULTADOS

El Cuadro 3 muestra que el porcentaje de vacas que respondieron al tratamiento superovulatorio y la tasa de fertilización fueron similares en ambas épocas de colección ($P>0.05$). En la época templada se tuvo una mayor tasa de recuperación de embriones y óvulos que en la cálida ($P<0.01$). El número de embriones y óvulos colectados por vaca donadora fue mayor en la época templada, que lo observado en la época cálida ($P<0.01$). El número de cuerpos lúteos detectados en el día de la colección fue similar en ambas épocas ($P>0.05$) (Cuadro 3).

En el Cuadro 4 se observa que en el porcentaje de embriones transferibles y retrasados y en la calidad embrionaria no difirieron entre épocas de colección ($P>0.05$).

En las Gráficas 1, 2 y 3 se muestran la distribución del porcentaje de vacas de las que se colectaron diferentes números de embriones y óvulos, de embriones y de

óvulos en ambas épocas. En la época cálida se observó un mayor porcentaje de vacas en las que se colectaron de 0 a 2 embriones y óvulos, y de 0 a 1 óvulos, que lo observado en las de la época templada ($P < 0.1$).

Las Gráficas 4 y 5 describen el efecto de la época sobre el grado de desarrollo de los embriones colectados y su calidad, respectivamente. Los estadios de los embriones colectados no fueron diferentes entre épocas ($P > 0.05$). Por el grado de calidad se observó una tendencia a obtener más embriones excelentes en la época templada, y en la época cálida se tuvo un mayor porcentaje de embriones buenos ($P < 0.1$). La proporción de embriones de calidad pobre fue similar en ambas épocas ($P > 0.05$).

En las Gráficas 6 y 7 se muestra la calidad de los embriones (1 = excelente; 2 = bueno) seleccionados para ser congelados en las dos épocas de colección y por efecto del estadio de desarrollo del embrión. Se observó una mejor calidad de los embriones de la época templada que los de la cálida ($P < 0.01$). La calidad del embrión mejora conforme avanza el desarrollo de mórula a blastocito expandido ($P < 0.01$). La gráfica 8 contiene la información del efecto de interacción entre el estadio de desarrollo del embrión y la época de colección sobre la calidad del mismo. En la época cálida, en el estadio de mórula se observó una menor calidad que la de los embriones de la época templada ($P < 0.01$). La misma tendencia ocurrió en los blastocitos tempranos ($P < 0.11$). Mientras que en los de mayor desarrollo, la diferencia no fue perceptible ($P > 0.05$).

DISCUSION

Las características similares de las variables productivas de las vacas en estudio en las dos épocas, el mismo proceso de superovulación utilizando un solo lote de FSH, y el hecho de que la colección embrionaria fue realizada por un solo profesional calificado evitó que estas fuentes de variación pudieran confundir las variables de respuesta evaluadas.

El hecho de que el porcentaje de vacas que respondieron a la superovulación, la tasa de fertilización y el porcentaje de embriones transferibles fueran similares en ambas épocas de colección, indica que el estrés calórico no es un efecto importante que afecte estas variables. Lo anterior coincide con lo informado en otros estudios realizados en vaquillas superovuladas expuestas a temperatura ambiente superior a 32.3 ° C en los primeros siete días del desarrollo embrionario (Putney et al., 1989 c) o cuando las vaquillas se mantuvieron en cámaras climáticas a temperaturas de 41 °C durante 10 h al inicio del estro (Putney et al., 1989 a). En vacas Holstein en producción no superovuladas de Arabia Saudita, la tasa de fertilización ha sido similar entre la época cálida y templada (Ryan et al., 1993). En estudios *in vitro*, Al-Katanani et al. (2002) en vacas expuestas a estrés calórico de verano no encontraron diferencia en la tasa de fertilización de ovocitos colectados, en comparación a lo observado en vacas mantenidas en condiciones de confort térmico.

La diferencia observada en la colección de óvulos y embriones en relación al número de cuerpos lúteos entre las épocas templada y cálida (89.3 y 53.6 %, respectivamente) ha sido documentado en otros estudios, los que han atribuido en vacas (Monty y Racowsky, 1987) y vaquillas Holstein (Putney et al., 1989 c) superovuladas un efecto negativo del estrés calórico sobre la producción de embriones. Entre los mecanismos involucrados en la reducción de la tasa de colección de embriones y óvulos se han considerado un aumento de folículos anovulatorios que se luteinizan (Bernal et al., 1999), alteraciones en el funcionamiento de la fimbria para la captación de los óvulos (Ryan et al., 1993), una posible degeneración del ovocito en el oviducto, que interfiere con su transporte normal (Ayalon et al., 1988) y una elevada respuesta superovulatoria que impide la captación de todos los embriones y óvulos (Monniaux et al., 1983).

En trabajos que utilizaron modelos de fertilización *in vitro* se ha informado de resultados similares. Al-Katanani et al. (2002) no encontraron diferencia en la tasa de fertilización *in vitro* de ovocitos colectados de ovarios de vacas expuestas a

estrés calórico del verano, en comparación con los de ovarios de vacas mantenidas en condiciones de confort térmico. En vacas Holstein en producción no superovuladas, la tasa de fertilización ha sido similar entre la época cálida y la templada en Arabia Saudita (Ryan et al., 1993).

En vacas Brahman superovuladas e inducidas a tener un hipotiroidismo se ha observado una reducción de los porcentajes de colección y un incremento en el número de folículos luteinizados, sin afectar la calidad de los embriones (Bernal et al., 1999). Los autores discuten que en las épocas cálidas, la maduración folicular y la ovulación pueden ser afectadas en vacas con una menor concentración de las hormonas tiroideas, que puede interferir con la secreción de la hormona luteinizante o con la respuesta ovárica a esa hormona. En vacas con hipotiroidismo, en el fluido folicular de los folículos de todos los tamaños se ha observado un aumento de la relación progesterona : estradiol y una mayor incidencia de folículos anovulatorios (Burrow, 1978, Bernal et al., 1999). Las hormonas tiroideas participan sinérgicamente con las gonadotropinas y la insulina para la esteroidogénesis folicular, en particular para la producción de androstenediona en las células tecaes que es un importante precursor para la síntesis de estradiol en las células de la granulosa (Spicer et al., 2001).

En el presente estudio, la disminución de la tasa de colección de embriones y óvulos y la mayor proporción de vacas que produjeron de 0 a 2 embriones en la época cálida, pudo deberse a fallas en la ovulación y existe la posibilidad de que varios de los cuerpos lúteos identificados en la época cálida pudieron haber sido folículos luteinizados, donde posiblemente las hormonas tiroideas toman un papel importante en las épocas cálidas y en vacas con mayor producción láctea, ya que se ha encontrado en vacas lecheras una relación negativa de las concentraciones de tiroxina y triyodotironina con la producción de leche (Tiirats, 1997) y con las altas temperaturas ambientales (McGuire et al., 1991).

La calidad y el desarrollo de los embriones transferibles no fueron afectados por la época de colección cálida. Estos resultados se asemejan a lo informado en vacas lecheras superovuladas en el verano de Florida (Putney et al., 1989c). Sin embargo, contrastan con estudios realizados en vaquillas Holstein expuestas a estrés calórico en cámaras climáticas por 10 h al inicio del estro, antes de la fertilización (Putney et al., 1989 a) y durante los primeros siete días del desarrollo embrionario (Putney et al., 1989 b), en los que se observó un incremento de la tasa de embriones retrasados en su desarrollo y una reducción de la calidad de los embriones. Incluso, en estudios *in vitro* con ovocitos colectados de vacas expuestas al calor del verano durante 42 días se observó este mismo efecto sobre la calidad y el desarrollo de los embriones, lo que infiere un posible efecto de acarreo del estrés calórico sobre la competencia del ovocito para que se de un desarrollo embrionario adecuado (Al-Katanani et al., 2002).

Se ha descrito que quizá el estrés calórico al que han sido expuestos *in vitro* los ovocitos (Edwards y Hansen, 1996), los embriones (Aréchiga et al., 1992) y las vacas en cámaras climáticas (Putney et al., 1989 a; Putney et al., 1989 b) no representa las condiciones reales de estrés calórico a que se exponen en condiciones de campo, dadas las fluctuaciones a lo largo del día. Sin embargo, se ha demostrado en estudios *in vitro* que la exposición de los embriones a temperaturas similares a las que se registran en las vacas en un día de verano, durante ocho días consecutivos post-inseminación, causó la reducción del porcentaje de embriones que llegaron al estadio de blastocito, lo que demuestra que las temperaturas que se dan en las vacas durante el verano son suficientes para afectar el desarrollo embrionario (Rivera y Hansen, 2001).

El hecho de que los embriones susceptibles a ser congelados de los estadios de mórula compacta y blastocito temprano hayan tenido una menor calidad en la época de colección cálida, y que independientemente de la presencia o no del estrés calórico se incremente la calidad del embrión conforme más avanzado estaba el desarrollo del embrión, permite inferir que los estadios de mórula y

blastocito temprano pudieran relacionarse con un proceso de retraso en el desarrollo al día de la colección y por ende la calidad fuera menor (Hasler et al., 1987). Lo anterior, fue confirmado en otro estudio al no encontrar diferencias en las proporciones de los estadios de embriones recuperados del útero por efecto de estrés calórico. Sin embargo, estos mismos autores en embriones colectados de época cálida y cultivados *in vitro* observaron una marcada reducción de la capacidad de desarrollo de los embriones de mórula a blastocito, que lo observado en los embriones de época fría (Monty y Racowsky, 1987). Por lo que no necesariamente tendría que determinarse un efecto del estrés calórico sobre el desarrollo del embrión, si encontráramos solamente estadios de embriones retrasados de 2 a 16 células en el 7º día post-inseminación, sino que también puede darse una pérdida en la viabilidad y la capacidad de desarrollo del embrión del estadio de mórula a blastocito.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

La tasa de fertilización no fue afectada por el estrés calórico en las condiciones de este estudio. Aunque el desarrollo embrionario no fue afectado por la época de colección, la calidad de las mórulas y blastocitos tempranos colectados en la época cálida fueron menores. Las vacas de la época cálida tuvieron una menor tasa de colección de embriones y óvulos, en cuya época la proporción de vacas que tuvieron una colecta de 0 a 2 de embriones y óvulos fue alta.

Estos resultados implican por una parte, que en las vacas de época cálida se puede presentar un porcentaje alto de anovulaciones, donde las hormonas tiroideas podrían tener un papel importante. Lo anterior, sería una línea de investigación a seguir en vacas lecheras en condiciones de estrés calórico. Por otra, que sería interesante evaluar la calidad de los embriones de estadios de mórula o blastocito temprano producidos en la época cálida, y que tanto este posible retraso ésta época puede explicar una menor fertilidad durante el verano.

CUADRO 3. Efecto de la época de colección embrionaria sobre el porcentaje de vacas que respondieron a la superovulación (RSO), la tasa de fertilización (TFERT), las tasas de colección de embriones y óvulos (TREO) y embriones (TRE), el número de embriones y óvulos (NEO), de embriones (NE) y de óvulos (NO) y el número de cuerpos lúteos (NCL) en vacas Holstein

VARIABLES	EPOCA TEMPLADA		EPOCA CÁLIDA	
	n		n	
RSO, %	20	85.0 a	22	86.3 a
TFERT, %	17	72.4 a	19	80.0 a
TREO, %	17	89.3 a	19	53.6 b
TRE, %	17	59.8 a	19	40.1 b
NEO, n	17	10.64 ± 1.47 a	19	6.10 ± 1.39 b
NE, n	17	7.47 ± 1.28 a	19	4.47 ± 1.21 b
NO, n	17	3.17 ± 0.77 a	19	1.63 ± 0.72 b
NCL, n	17	11.94 ± 1.18 a	19	11.73 ± 1.11 a

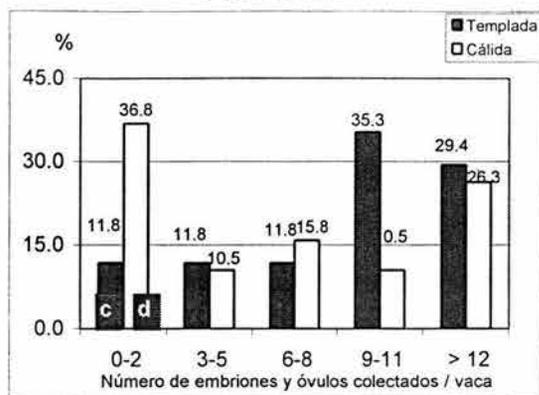
a,b/ Distintas literales dentro del mismo renglón indica diferencia significativa (P<0.01)

CUADRO 4. Porcentaje de los embriones transferibles y retrasados, grado de calidad de los embriones transferibles por efecto de época de colección embrionaria

VARIABLES	EPOCA TEMPLADA		EPOCA CÁLIDA	
	n	X ± d.e.	n	X ± d.e.
Embriones transferibles, %	127	85.0 a	85	84.7 a
Calidad de embriones transferibles	127	2.09 ± 0.09 a	85	2.10 ± 0.11 a
Embriones retrasados; %	127	14.9 a	85	15.4 a

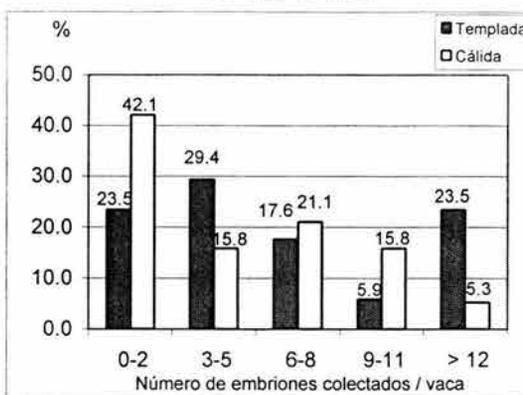
GRÁFICAS 1, 2 y 3. Distribución del porcentaje de vacas en relación al número de embriones y óvulos, embriones y óvulos colectados por vaca en las épocas de colección embrionaria cálida y templada en vacas Holstein

GRÁFICA 1

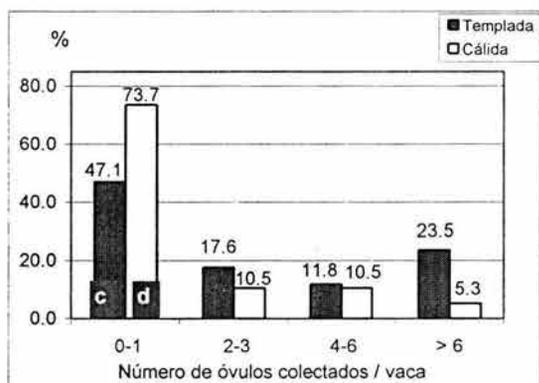


c,d (P<0.1)

GRÁFICA 2



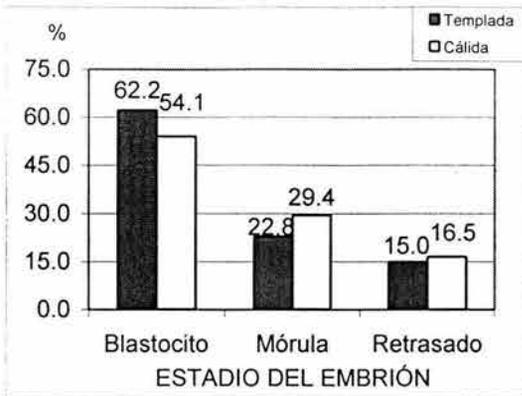
GRÁFICA 3



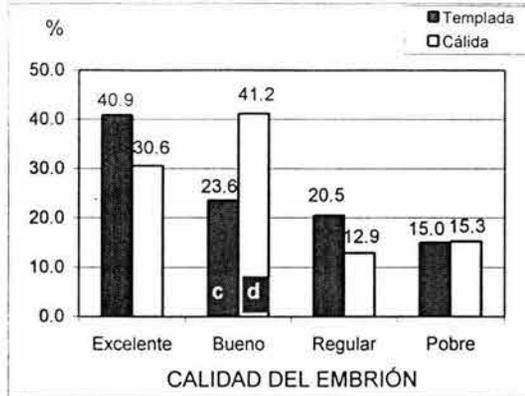
c,d / (P<0.1)

GRÁFICAS 4 y 5. Distribución de los estadios de desarrollo y calidad de los embriones colectados en épocas cálidas y templadas en vacas Holstein

GRÁFICA 4

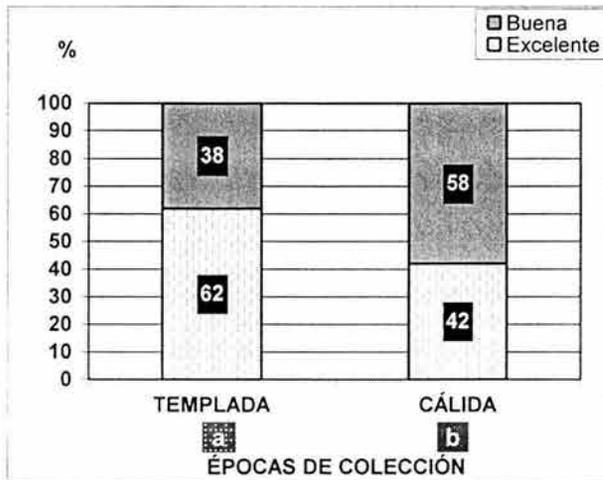


GRÁFICA 5



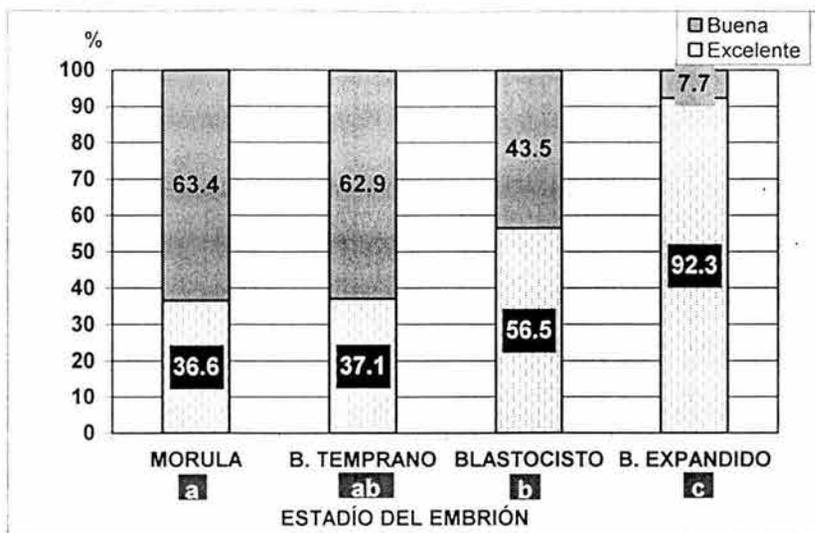
c, d / distintas literales indican diferencia (P<0.1)

GRÁFICAS 6. Porcentaje de embriones buenos y excelentes por efecto de época de colección cálida y templada en vacas Holstein



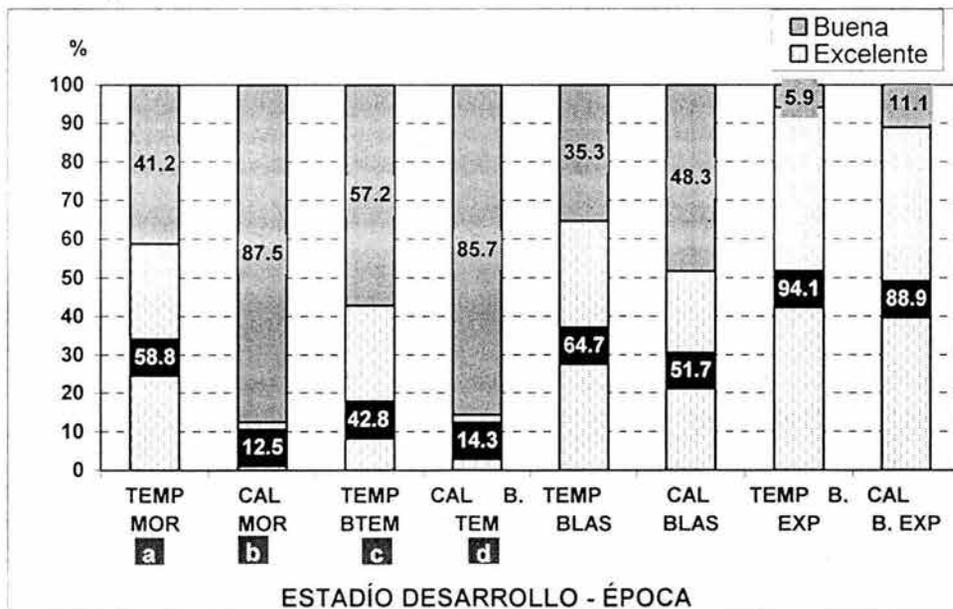
a,b (P<0.01)

GRÁFICA 7. Porcentaje de embriones buenos y excelentes por efecto de época de colección cálida y templada en vacas Holstein



a,b (P<0.05)
a,c (P<0.01)
b,c (P<0.1)

GRÁFICA 8. Efecto de la interacción de los diferentes estadios de desarrollo del embrión congelado (MOR – mórula; B.TEM – blastocito temprano; BLAS – blastocito maduro y B.EXP. – blastocito expandido) con la época de colección embrionaria (TEMP – templada y CAL – cálida) en la proporción de embriones buenos y excelentes en vacas Holstein



a, b / Distintas literales indican diferencia estadística (P<0.01)
c, d / Distintas literales indican diferencia estadística (P<0.11)

LITERATURA CITADA

Al-Katanani, Y.M., Paula-Lopes, F.F., Hansen, P.J. 2002. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 85(2):390-396.

Aréchiga, C.F., Ealy, A.D. and Hansen, P.J. 1992. Induction of thermotolerance in mouse embryos is blocked by the glutathione synthesis inhibitor, DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO). *J. Anim. Sci.*, 70 (suppl 1): 265.

Ayalon, N., Marcus, S., Feingold, D. And Lewis, S. 1988. Summer infertility in Holstein cattle. *Proc. Xith Congr. Anim. Reprod. A.I. (Dublin, Ireland)* 1:399 abstr.

Bernal, A., DeMoraes, G.V., Thrift, T.A., Willard, C.C. and Randel, R.D. 1999. Effects of induced hypothyroidism on ovarian response to superovulation in Brahman (*Bos indicus*) cows. *J. Anim. Sci.*, 77:2749-2756.

Burrow, G.N. 1978. The thyroid gland and reproduction. In: S.S.C. Yen and R.B. Jaffe (Ed) *Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management*. P 424-440.

Edwards, J.L., and Hansen, P.J. 1996. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biology of Reproduction*, 55:341-346.

Elsden, R.P. 1976. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*, 6(5): 523-532.

Ferguson, J.D., Galligan, D.T. and Thomsen, N. 1994. Principal descriptor of body condition score in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 77:2695-2703.

Grohn, Y.T. and Rajaal-Schultz, P.J. 2000. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 605-614.

Hansen, P.J., Drost, M., Rivera, R.M., Paula-Lopes, F.F., Al-Katanani, Y.M., Krininger III, C.E. and Chase, C.C. Jr. 2000. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*, 55:91-103.

Hernández-Cerón, J., Chase, C.C. and Hansen, P.J. 2004. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. *J.Dairy Sci.*, 87:53-58.

Hasler, J.F., McCauley, A.D., Lathrop, W.F., and Foote, R.H. 1987. Effect of donor-embryo-recipient interaction on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 27(1):139-168.

Ingraham R.H., Stanley R.W. and Wagner W.C. 1975. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in Hawaii. *J. Dairy Sci.* 59(12): 2086.

Lindner, G.M. and Wright, W.R. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20 (4): 407-416.

McGuire, M.A., Beede, D.K., Collier, R.J., Buonomo, F.C., DeLorenzo, M.A., Wilcox, C.J., Huntington, G.B. and Reynolds, C.K. 1991. Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows. *J. Anim. Sci.*, 69(5):2050-2056.

Monniaux, D., Chupin, D.D. and Saumande, J. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19:55-81.

Monty, D.E. Jr. and Racowsky, C. 1987. *In vitro* evaluation of early embryo viability and development in summer heat-stressed, superovulated dairy cows. *Theriogenology*, 28(4): 451-465.

Putney, D.J. Mullins, S., Thatcher, W.W. Drost, M. and Gross, T.S. 1989 a. Embryonic development in superovulate dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 19: 37.

Putney, D.J. Mullins, S., Thatcher, W.W. Drost, M. and Gross, T.S. 1989 b. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post-inseminations. *Theriogenology*, 30: 195.

Putney, D.J., Drost, M. and Thatcher, W.W. 1989 c. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology*, 31: 765-778.

Rivera, R.M. and Hansen, P.J. 2001. Development of culture bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *J. Reprod. Fert.*, 121: 107-115.

Rocha, A., Randel, R.D., Broussard, J.R., Lim, J.M., Blair, R.M., Roussel, J.D., Godke, R.A. and Hansel, W. 1998. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in Bos taurus but not in Bos indicus cows. *Theriogenology*, 49:657-665.

Ryan, D.P., Prichard, J.F., Kopel, E. and Godke, R.A. 1993. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology*, 39: 719-737.

SAS. SAS/STAT User's Guide (Release 6.03). 1988. Cary NC, USA: SAS Inst. Inc.

Scott, H. L., Meint, J de Vries and Ynte, H. S. 1999. The effects of time of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. J. Dairy Sci., 82: 2589-2604.

Spicer, L.J., Alonso, J. and Chamberlain, C.S. 2001. Effects of thyroid hormone on bovine granulosa and thecal cell function *in vitro*: dependence on insulin and gonadotropins. J. Dairy Sci., 84:1069-1076.

Tiirats, T. 1997. Thyroxine, triiodothyronine and reverse-triiodothyronine concentrations in blood plasma in relation to lactational stage, milk yield, energy and dietary protein intake in Estonian dairy cows. Acta Vet. Scand., 38:339-348.

CAPÍTULO 6

LA TASA DE GESTACIÓN EN VACAS HOLSTEIN RECEPTORAS DE EMBRIONES ES AFECTADA POR LAS CONDICIONES DE ESTRÉS CALÓRICO DE LA ÉPOCA DE PRODUCCIÓN DEL EMBRIÓN Y POR LA DE TRANSFERENCIA

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del estrés calórico de las épocas de producción del embrión y de su transferencia sobre la tasa de gestación en vacas receptoras de la raza Holstein. Se definieron las épocas (templada y cálida) para la producción (P) y para la transferencia (T) de los embriones. La época templada (ET) fue del 15 de enero al 27 de marzo y la cálida (EC) del 1 de mayo al 17 de agosto. Se congelaron 107 blastocitos y 25 mórulas, todos de calidad buena y excelente. Las vacas receptoras tuvieron en promedio 9227 lts de leche estimada a 305 días (P305D) y 86 días en leche. Los embriones colectados de cada época fueron asignados al azar para su transferencia en las dos épocas de transferencia descritas. Con lo que se formaron cuatro grupos: 1. Producción del embrión en época templada (PT) – transferencia del embrión en época templada (TT) (n = 26). 2. PT – transferencia del embrión en época cálida (TC) (n = 25). 3. Producción del embrión en época cálida (PC) –TT (n = 28). 4. PC –TC (n =28). El porcentaje de gestación de las vacas receptoras se analizó por medio de un análisis de covarianza con bloques al azar, donde las variables explicativas fueron las épocas de producción y de transferencia y su interacción entre éstas, la calidad del embrión (excelente o bueno) y como covariables se utilizaron la P305D y el tiempo que toma la manipulación para la transferencia (TTR). Como bloque fue utilizado el hato de la receptora (H). Se observó efecto de la interacción, donde la tasa de gestación de PT – TT (45 %) fue mayor a las observadas en PC – TC, 13.4 % ($P<0.01$), PT – TC, 14.5 % ($P<0.01$) y PC – TT, 21.5 % ($P<0.05$). El efecto del TTR tuvo un efecto lineal importante sobre la tasa de gestación ($P<0.08$). Se tuvo un mayor porcentaje de vacas receptoras gestantes cuando se les transfirió un embrión de calidad excelente (30.3 %) que uno de calidad buena (16.8 %,

P<0.11). Las vacas receptoras en la época de transferencia templada tuvieron una mayor tasa de gestación. En vacas receptoras en condiciones de confort la tasa de gestación se redujo más del 50 % cuando los embriones transferidos fueron obtenidos de vacas donadoras mantenidas en condiciones de estrés calórico. La transferencia de un embrión de calidad excelente incrementó la tasa de gestación de las vacas receptoras, independientemente de la época de transferencia.

INTRODUCCIÓN

A través de los años se han determinado que la condición física corporal, la paridad, el estado productivo, el fin zootécnico del animal, el nivel de producción láctea de la vaca receptora (Dochi et al., 1998; Ambrose et al., 1999 a; Hasler, 2001; Chagas et al., 2002; Al-Katanani et al., 2002 a), el estadio y calidad del embrión, la tasa de congelación del embrión, la sincronía entre la edad del embrión y los días del ciclo estral de la vaca receptora (Dochi et al., 1998; Dalton et al., 2000; Hasler, 2001; Spell et al., 2001), la región geográfica, el técnico que realiza la técnica de transferencia embrionaria, el tiempo de lleva depositar el embrión en el útero desde el momento de la descongelación del mismo, el estrés calórico y la estación del año (Ellington et al., 1991; Smith et al., 1996; Dochi et al., 1998; Ambrose et al., 1999 a; Al-Katanani et al., 2002 a) son factores que influyen sobre la tasa de gestación de las vacas receptoras de embriones.

Los embriones en sus primeros tres días son sensibles al estrés calórico, lo que reduce la viabilidad y el desarrollo embrionario. En estudios *in vitro* (Edwards y Hansen, 1997) e *in vivo* (Ealy et al., 1993) observaron que aparentemente después del tercer día de edad los embriones adquieren una termotolerancia, ya que no encontraron efecto alguno al exponer a estrés calórico a las vacas al 3º, 5º ó 7º día después de la inseminación (Ealy et al., 1993) o a los embriones en sus fases tempranas hasta el día siete de edad (Edwards y Hansen, 1997). Es por esto, que se ha propuesto que para reducir el efecto del estrés calórico sobre la fertilidad se utilice la transferencia embrionaria en lugar de la inseminación artificial. Varios estudios han observado una tasa de preñez más alta que en las

vacas que habían sido inseminadas en las mismas condiciones ambientales, lo que confirman que los embriones transferidos habían superado la etapa de desarrollo embrionario con mayor sensibilidad al estrés calórico (Putney et al., 1989 a; Ambrose et al., 1999 a, Drost et al., 1999; Rutledge, 2001, Al-Katanani et al., 2002 a).

Sin embargo, estos estudios fueron realizados para comparar la tasa de gestación entre las técnicas de transferencia de embriones versus inseminación artificial en épocas de estrés calórico, y no fueron diseñados para obtener respuestas en cuanto a los efectos de la presencia o ausencia de estrés calórico, tanto en la época de producción del embrión como en la época de transferencia. Se ha evaluado en forma parcial el efecto de la época de producción del embrión y la de transferencia sobre la tasa de gestación en vacas receptoras. Drost et al. (1999) observaron un mayor porcentaje de gestación de vacas receptoras en condiciones de estrés calórico, cuando se transfirieron embriones colectados y congelados de vacas superovuladas en condiciones de termoneutralidad.

Dado lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del estrés calórico al momento de la producción de los embriones y al de su transferencia y su efecto de interacción sobre la tasa de gestación de vacas Holstein receptoras sujetas al manejo rutinario de hatos comerciales de producción. Adicionalmente, determinar si la producción láctea estimada a 305 días, la concentración sérica de progesterona en el día siete del ciclo estral de las vacas receptoras y el tiempo que lleva la transferencia del embrión afectan la tasa de gestación de vacas receptoras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Épocas de producción de embriones e información climática

Las vacas donadoras estaban en producción en dos hatos lecheros (H) comerciales del estado de Aguascalientes. La producción de embriones (P) se realizó en la época templada o en la época cálida. El THI fue calculado de acuerdo

a lo descrito en la literatura (Ingraham et al., 1975). Las características de temperatura, humedad relativa y el índice temperatura – humedad (THI) que se presentaron durante el período de producción y colección de los embriones se muestran en el Cuadro 1. En éste se observa que las variables climáticas y el THI fueron más altas en la época de producción cálida, en comparación a la época de producción templada ($P < 0.01$).

CUADRO 1. Temperatura ambiente, humedad relativa e índice temperatura – humedad registrados durante la época de colección embrionaria: templada (9 al 17 de febrero / 2001 y del 12 al 24 de marzo / 2001) y cálida (21 de mayo al 2 de junio / 2001 y del 2 al 14 de julio / 2001)

	Epoca Templada		Epoca Cálida	
	x ± e.e.	Rango	X ± e.e.	Rango
Temperatura máxima, ° C	25.6 ± 0.35 a	23.2 a 28.1	29.5 ± 0.36 b	26.4 a 32.7
Temperatura mínima, ° C	5.7 ± 0.47 a	1.3 a 8.0	12.4 ± 0.48 b	7.8 a 16.4
Humedad relativa, %	33.1 ± 3.40 a	13.7 a 56.2	52.7 ± 3.49 b	30.5 a 70.2
Índice Temperatura - Humedad	70.5 ± 0.29 a	68.7 a 72.4	78.0 ± 0.3 b	75.9 a 81.6

a,b / Distintas literales por renglón indican diferencia significativa ($P < 0.01$).

Superovulación de la vaca donadora

El inicio de la superovulación de las vacas donadoras fue entre el día 9 y 11 después del estro con la administración de 400 mg de hormona folículo estimulante (FSH) (Folltropin-V. Vtrepharm. Canada Inc.) en dosis decreciente, según lo descrito por (Elsden et al., 1978). Al tercer día de la administración de FSH, la luteólisis fue inducida con 50 mg de prostaglandina $f_2 \alpha$ por vía intramuscular distribuida en dos aplicaciones con un intervalo de 12 horas. El día cero fue considerado como el de inicio del estro. La inseminación artificial se realizó a las 12 y 24 horas de haber sido detectado el estro.

Colección y congelación de los embriones

En el día siete se procedió a la colección embrionaria. Los procesos de colección, evaluación y congelación de los embriones fueron realizados conforme a lo descrito por la literatura (Elsden et al., 1978; Linder y Wright., 1983; Elsden, 1987). Los embriones colectados fueron clasificados por su estadio (EST) y el grado de calidad (GC). Únicamente se congelaron los embriones que correspondieron a los estadios de blastocito (B) o mórula (M) y con calidad excelente (E) y buena (B).

El crioprotector utilizado fue etilenglicol (EG). Los embriones fueron equilibrados en 1.5 M de EG por un período de 10 m a temperatura ambiente. Durante el período de equilibrio fueron incluidos en forma individual en pajillas de 0.25 ml. La congelación se realizó en una congeladora manual. El protocolo de congelación seguido fue: de cero a - 7 ° C la tasa de descenso de temperatura fue de -1 ° C / m, a - 7 ° C se indujo la cristalización y se mantuvieron las pajillas a esta temperatura durante 10 m. Posteriormente la temperatura se llevó hasta - 30 ° C a una tasa de - 0.5 ° C / m, sumergiéndose después en nitrógeno líquido (Elsden et. al., 1987).

Descongelación y transferencia del embrión

Los 132 embriones colectados (P) en las dos épocas templada y cálida, fueron distribuidos y asignados al azar a las dos épocas de transferencia (T) templada (del 15 de enero al 27 de marzo) y cálida (del 1 de mayo al 17 de agosto), con lo que se generaron cuatro grupos experimentales: 1. Producción del embrión en época templada (PT) – transferencia del embrión en época templada (TT). 2. Producción del embrión en época templada (PT) – transferencia del embrión en época cálida (TC). 3. Producción del embrión en época cálida (PC) – TT. 4. PC – TC. La figura 1 resume el diseño del experimento. En el Cuadro 2 se observa en la época de transferencia cálida un mayor THI, humedad y temperatura ambiente ($P < 0.01$).

CUADRO 2. Temperatura ambiente, humedad relativa e índice temperatura - humedad registrados durante las épocas de transferencia embrionaria templada (15 de enero al 27 de marzo del 2002) y cálida (1 de mayo al 17 de agosto del 2002).

	Epoca Templada		Epoca Cálida	
	X ± e.e.	Rango	X ± e.e.	Rango
Temperatura máxima, ° C	24.5 ± 0.37 a	9.6 a 30.9	28.2 ± 0.30 b	22.3 a 34.5
Temperatura mínima, ° C	5.1 ± 0.24 a	-2.4 a 10.8	13.9 ± 0.19 b	9.8 a 17.8
Humedad relativa, %	45.5 ± 1.78 a	23.7 a 88.3	58.7 ± 1.45 b	22.1 a 88.5
Índice Temperatura-Humedad	70.16 ± 0.5 a	50.2 a 74.7	76.54 ± 0.5 b	71.9 a 80.6

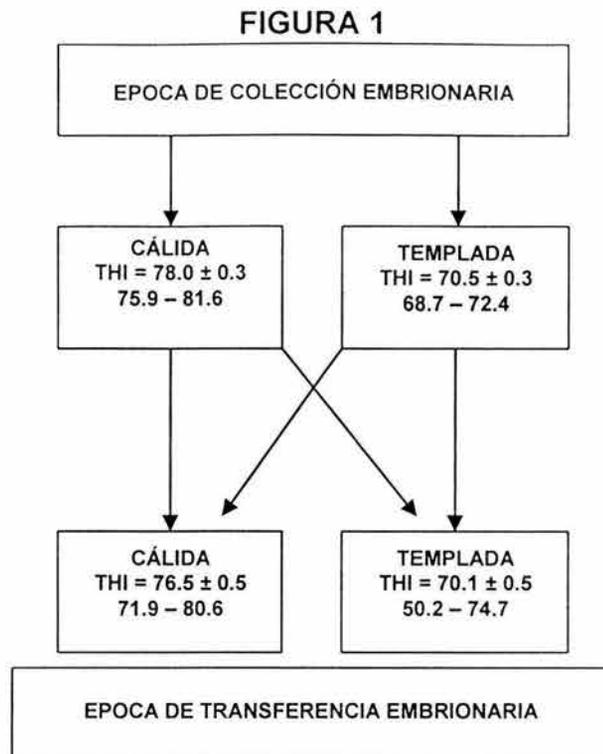
a,b / Distintas literales por renglón indican diferencia significativa ($P < 0.01$).

La transferencia de los embriones se realizó al séptimo día de inicio del estro (día cero) de las receptoras, las cuales durante el período de estudio no recibieron

tratamientos de somatotropina. Previo a la transferencia embrionaria a cada vaca receptora se le realizó un examen tocológico transrectal rutinario del aparato reproductor y se confirmó la presencia de un cuerpo lúteo. Se registró la condición física corporal (1-5) con una aproximación de 0.25 puntos de acuerdo a lo descrito por Ferguson et al. (1994). Así mismo se tomó la circunferencia torácica y la temperatura rectal ($^{\circ}$ C) (TCOR) de las vacas receptoras. Al mismo tiempo, se obtuvo una muestra sanguínea en un tubo vacutainer sin anticoagulante, que fue transportada al laboratorio en refrigeración a 5° C. Las muestras fueron centrifugadas a 700 g por 10 min y el suero fue almacenado a -20° C hasta su procesamiento en el laboratorio de radioinmunoensayo para la medición de la concentración sérica de progesterona (P_4) (ng/ml).

Se emplearon 132 vacas receptoras de la raza Holstein con 9205.6 ± 277.8 l leche estimada a 305 días (P305D), 86.0 ± 2.6 días en leche (DEL), 1.9 ± 0.09 partos (NP), 596.5 ± 10.5 kg de peso corporal (PINIC) y $3.33 \pm \pm 0.1$ de condición física corporal (CFI) (Cuadro 3). Todas las variables evaluadas fueron similares ($P > 0.05$) a excepción de la P305D, donde las vacas en la época de transferencia templada tuvieron una mayor producción ($P < 0.01$).

Cada embrión fue descongelado a temperatura ambiente de una habitación durante 10 segundos, seguido por inmersión de la pajilla en agua a 30° C por 12 segundos (Dochi et al., 1998; Drost et al., 1999). Los embriones fueron transferidos en forma no quirúrgica y depositados en el tercio proximal del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo. Se registró la madre donadora, identificación del estadio y calidad del embrión, fecha de producción y congelación del embrión, fecha y hora de transferencia y tiempo de transferencia (TTR) del mismo. Esta última variable fue definido como el tiempo transcurrido en minutos, desde el momento de la descongelación hasta la finalización de la transferencia.



CUADRO 3. Características productivas de las vacas receptoras en dos épocas de transferencia embrionaria

Variables	Época Templada		Época Cálida	
	n	X ± e.e.	n	X ± e.e.
Número de Partos	54	1.98 ± 0.09	53	1.98 ± 0.09
Días en Leche	54	83.1 ± 2.7	53	88.9 ± 2.7
Peso Corporal, kg	54	591.8 ± 10.5	53	601.4 ± 10.6
Condición Física (1-5)	54	3.27 ± 0.04	53	3.36 ± 0.04
Producción Láctea a 305 días, l	54	9829.3 ± 276.8 a	53	8570.2 ± 279.4 b

a,b / Distintas literales por renglón indican diferencia significativa (P<0.01).

Las vacas fueron observadas para detectar el retorno al estro entre 40 y 50 días post-transferencia. El diagnóstico de gestación se realizó entre 40 y 50 días de edad del embrión. A partir de esta información se obtuvo el porcentaje de gestación de las vacas receptoras por época de producción del embrión, época de transferencia y calidad y estadio del embrión.

Manejo nutricional y reproductivo de la receptora

La alimentación se proporcionó 6 veces al día en forma de ración integral. Los forrajes utilizados fueron ensilaje de maíz, rye grass verde y heno de alfalfa. El concentrado estuvo formado por una mezcla comercial, semilla de algodón, bagazo húmedo de cervecería, proteína no degradable en rumen (Soybest®, Grain Staples Inc.) y grasa de sobrepaso (Megalac®, Rumen Bypass Fat, Arm & Hammer Animal Nutrition Group). La relación forraje concentrado fue de 35:65. La composición química de la dieta total en base seca fue: 1.79 Mcal de energía neta de lactancia / kg, 17.7 % de proteína cruda, 37 % de proteína no degradable, 19.6 % de fibra detergente ácido, 35 % de fibra detergente neutro, 7.1 % de grasa y 31 % de carbohidratos no estructurales. Las vacas tuvieron libre acceso al agua.

Análisis de radioinmunoensayo

La determinación de P₄ en suero se realizó con un estuche de RIA comercial (Coat A Count DPC) en fase de sólida. El sistema presentó una sensibilidad de 0.1 ng/ml, con un coeficiente de variación de 3.69 % y 5.86 % intra e interensayo, respectivamente, a la dosis de 0.49 ng/ml. En tanto que a la dosis de 20.0 ng/ml, el coeficiente de variación intra fue del 5.63 % e interensayo del 6.11 %.

Análisis estadístico

La temperatura máxima y mínima (° C), humedad ambiental (%) y el índice temperatura humedad se analizaron a través de un análisis de varianza, cuyo modelo al cual se atribuyó la variación fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{(i)j}$$

Donde:

Y_{ij} = es la j-ésima observación de la i-ésima época de transferencia embrionaria

μ = es la media general.

T_i = es el efecto de la i-ésima época de transferencia embrionaria (1,2).

$E_{(i)j}$ = es el error NID (0, Γ^2_e).

Las variables como son el NP, DEL, PINIC, CFI, P305D, TCOR, P4 y TTR se analizaron para constatar la igualdad de condiciones en ambas épocas de transferencia, cuyo modelo al cual se atribuyó la variación fue:

$$Y_{jik} = \mu + B_j + \delta_{(j)} + ET_i + E_{(ij)k}$$

Donde:

Y_{jik} = es la k-ésima observación de la i-ésima época de transferencia embrionaria.

μ = es la media general.

B_m = es el efecto de bloque del hato lechero.

$\delta_{(m)}$ = es el error de restricción, NID $(0, \Gamma^2_e)$.

T_i = es el efecto de la i-ésima época de transferencia (1,2).

$E_{(ij)}$ = es el error NID $(0, \Gamma^2_e)$.

El porcentaje de vacas gestantes se analizó por medio de un análisis covarianza con bloques al azar donde las fuentes de variación consideradas dentro del modelo fueron:

$$Y_{mijkl} = \mu + B_m + \delta_{(m)} + OE_i + ET_j + OE \times ET_{ij} + GC_k + b_1(P305D - \mu_{P305D}) + b_2(TTR - \mu_{TT}) + E_{(mijkl)}$$

Donde:

Y_{mijkl} = es la l-ésima observación, de la k-ésima calidad del embrión, de la j-ésima época de transferencia y la i-ésima época de producción del embrión.

μ = es la media general.

B_m = es el efecto de bloque del hato lechero.

$\delta_{(m)}$ = es el error de restricción, NID $(0, \Gamma^2_e)$.

P_i = es el efecto de la i-ésima época de producción del embrión (1,2).

T_j = es el efecto de la j-ésima época de transferencia (1,2)

$P \times T_{ij}$ = es el efecto de interacción de la i-ésima época de producción del embrión con la j-ésima época de transferencia.

GC_k = es el efecto del grado de calidad del embrión (1,2).

$b_1(P305D - \mu_{P305D})$ = es el efecto de la covariable de la producción láctea estimada a 305 días en su forma lineal.

$b_2(\text{TTR} - \mu_{it})$ = es el efecto de la covariable del tiempo de transferencia en su forma lineal.

$E_{(mijk)l}$ = es el error NID $(0, \Gamma^2_e)$.

Los resultados del porcentaje de vacas gestantes del estadio de mórula no se incluyeron al análisis por las siguientes razones: el número observaciones para este estadio en un hato fue de seis, el total de vacas gestantes fue de cuatro y se concentraron en un solo hato y un solo embrión de calidad excelente resultó con diagnóstico positivo de gestación. Es por esto que se realizó para este estadio de desarrollo una descripción de las variables productivas que se dieron en las vacas receptoras por hato, época de producción del embrión y de su transferencia y el grado de calidad del mismo. Los datos se analizaron a través de modelos lineales (SAS, 1988).

RESULTADOS

En el Cuadro 4 se muestra que la temperatura corporal de la vaca receptora, previo a la transferencia del embrión fue mayor en la época cálida (38.8 °C), que lo observado en las vacas de la época templada (38.2 °C) ($P < 0.01$). Los niveles séricos de progesterona al día siete (1.93 ng / ml) y el tiempo de transferencia (4.12 min) fueron similares ($P > 0.05$).

CUADRO 4. Temperatura corporal y concentración sérica de progesterona (P4) de las vacas receptoras, y el tiempo de transferencia en las épocas de transferencia templada y cálida

Variables	Época templada		Época cálida	
	n	$\bar{X} \pm e.e.$	n	$\bar{X} \pm e.e.$
Temperatura corporal, °C	54	38.28 ± 0.05 a	53	38.84 ± 0.05 b
Niveles séricos de P4, ng/ml	50	1.72 ± 0.3	50	2.14 ± 0.2
Tiempo de transferencia, min	54	4.07 ± 0.15	53	4.18 ± 0.16

a, b / Distintas literales por renglón indican diferencia significativa ($P < 0.01$).

En el Cuadro 5 se observa que los porcentajes de gestación de las vacas fueron diferentes por efecto de época de producción del embrión ($P < 0.14$). Se encontró un mayor porcentaje de vacas gestantes en la época de transferencia templada

que en las vacas a las que se les transfirió el embrión en las épocas cálidas ($P < 0.05$). Las vacas receptoras de la época de transferencia templada tuvieron un mayor porcentaje de gestación que lo observado en vacas de época de transferencia cálida, cuando en ambas épocas fueron transferidos embriones producidos en época templada ($P < 0.01$). Las vacas de la época de transferencia templada tuvieron un mayor porcentaje de gestación cuando recibieron embriones producidos en época cálida, en comparación a lo observado en vacas de época de cálida que recibieron embriones de la misma época de producción ($P < 0.05$). Las vacas receptoras de embriones de calidad excelente tuvieron un mayor porcentaje de gestación, que en vacas a las que se les transfirieron embriones de calidad buena ($P < 0.11$). El efecto lineal de la P305D no fue importante en la respuesta de la tasa de gestación de la vaca receptora ($P > 0.05$). Mientras que el TTR en su forma lineal fue significativa sobre la tasa de gestación ($P < 0.08$).

En el Cuadro 6 se muestra el análisis descriptivo de los embriones cuyo estadio fue mórula. En éste se cita el número de embriones empleados y el número de vacas gestantes por hato lechero, origen de producción del embrión, época de transferencia y grado de calidad del embrión. Las características productivas de NP, DEL, CFI, PINIC de las vacas receptoras fueron similares ($P > 0.05$). El número de vacas receptoras gestantes fue nulo en un hato. Se tuvo una sola vaca gestante en la época de producción templada y en la época de transferencia cálida. Así mismo, se tuvo una vaca gestante cuando se recibió un embrión de calidad excelente.

CUADRO 5. Porcentaje de gestación de las vacas receptoras de embriones por efecto de la época de producción del embrión (P), la época de transferencia (T), la interacción de P x T y la calidad del embrión transferido

Época de producción del embrión (P)	n	%
Templada	51	29.79 e
Cálida	56	17.43 f
Época de Transferencia (T)		
Templada	54	33.26 c
Cálida	53	13.96 d
Producción x Transferencia		
Templada – Templada (PT – TT)	26	45.04 a
Templada – Cálida (PT – TC)	25	14.54 b
Cálida – Templada (PC – TT)	28	21.48 c
Cálida – Cálida (PC – TC)	28	13.38 b
Calidad del embrión		
Excelente	66	30.37 g
Bueno	41	16.85 h

a, b / Distintas literales dentro del mismo efecto indican diferencia significativa (P<0.01)

a, c / Distintas literales dentro del mismo efecto indican diferencia significativa (P<0.05)

c, d / Distintas literales dentro del mismo efecto indican diferencia significativa (P<0.05)

e, f / Distintas literales dentro del mismo efecto indican diferencia significativa (P<0.14)

g, h / Distintas literales dentro del mismo efecto indican diferencia significativa (P<0.11)

CUADRO 6. Número de embriones de estadio de mórula empleados, número de vacas receptoras gestantes (n Gestantes), y las medias de las variables productivas de las vacas receptoras, como son: el número de partos (NP), días en leche (DEL), condición física (CFI), peso corporal (PINIC) y producción de leche estimada a 305 días (P305D) para los efectos de hato, época de transferencia (T), época de producción del embrión (P) y calidad del embrión (GC)

	Mórulas	Hato		T		P		GC	
		1	2	Templ.	Cálida	Templ.	Cálida	Excelente	Bueno
n embriones	25	6	19	14	11	10	15	10	15
n Gestantes	4	0	4	3	1	0	4	1	3
NP	1.68	1.83	1.68	1.78	1.54	1.7	1.66	1.5	1.8
DEL, días	86.5	83.5	87.4	83.7	90	87.9	85.5	87.7	85.6
CFI (1-5)	3.4	3.37	3.4	3.5	3.25	3.5	3.3	3.4	3.4
PINIC, Kg.	593.0	593.5	592.8	579.9	609.6	593.2	592.8	593	593
P305D, lts	9320.4	9486.3	9268	9498.3	9094	10362 a	8625 b	9362.7	9292.2

a, b / Distintas literales dentro del mismo efecto principal indican diferencia (P<0.01).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se controlaron factores que afectan la tasa de gestación de la vaca receptora como son la sincronía y la calidad del embrión. Así mismo, las variables productivas de las vacas receptoras fueron similares entre las dos épocas de transferencia, a excepción de la producción de leche estimada a 305 días (P305D).

El porcentaje de gestación de las vacas receptoras de embriones congelados estuvo dentro del rango informado como normal en vacas lactantes de la raza Holstein (Putney et al., 1989 a; Ambrose et al., 1999 a; Drost et al., 1999; Hasler, 2001; Al-Katanani et al., 2002 a; Chagas et al., 2002). Algunos estudios demostraron un efecto negativo de la cantidad de producción láctea de la vaca receptora sobre la tasa de gestación, lo que indica que los embriones son sensibles al efecto del estrés fisiológico a que esta sujeta la vaca (Hasler, 2001; Al-Katanani et al., 2002 a; Chagas et al., 2002). En el presente estudio, el efecto de la producción láctea estimada de las receptoras no fue importante para afectar la tasa de gestación, lo que probablemente debido a que los niveles de producción de las vacas en el estudio fueron muy similares en ambas épocas de transferencia.

La menor tasa de gestación observada en vacas receptoras en condiciones de estrés calórico, independientemente de la época de producción y de la calidad del embrión, indica la existencia de un importante efecto materno después de la transferencia y demuestra que los embriones siguen siendo sensibles al estrés calórico que puede producir la temperatura de la madre (Markette et al., 1985; Biggers et al., 1987, Putney et al., 1989 a; Ryan et al., 1993; Dunne et al., 2000). Es por esto que entre las fallas a las que se puede imputar la menor sobrevivencia del embrión después del día de su transferencia podría estar relacionado con: 1. Una menor secreción de proteínas del endometrio del cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo en los primeros ocho días del ciclo estral expuestas a estrés calórico, lo podría crear asincronía entre el embrión y la madre (Malayer et

al., 1988; Malayer y Hansen., 1990). 2. Una disminución del peso del tejido lúteo y del embrión (Biggers et al., 1987) y de la función lútea (Howell et al., 1994) entre el 8° y el 16° día del ciclo estral. 3. Una menor secreción de proteínas del embrión, entre estas el interferon t (Thatcher et al., 1989). 4. Un efecto acarreado del calor sobre la función lútea que puede disminuir la capacidad de síntesis de P_4 de las células lúteas del verano (Wolfenson et al., 1993).

Lo anterior se confirma al observar en vacas Holstein lactantes que un incremento de la cantidad de tejido lúteo, de la formación de un cuerpo lúteo adicional (Thuemmel et al., 1992; Thatcher et al., 1994; Thatcher et al., 1996; Binelli et al., 2001; Lopez-Gatius et al., 2002; Willard et al., 2003) y de la concentración sérica de progesterona durante la fase lútea del ciclo estral en vacas repetidoras (Thuemmel et al., 1992) y receptoras de embriones (Geisert et al., 1991) tienen un efecto positivo sobre la tasa de gestación y reduce el riesgo de la pérdida embrionaria entre los 38 y 90 días.

Las concentraciones séricas de P_4 de las vacas de las dos épocas de transferencia al día siete del ciclo estral fueron similares y no se estableció relación alguna con el porcentaje de gestación de las vacas receptoras, lo que concuerda con lo observado en otros estudios (Payas et al., 1989; Ambrose et al., 1999 a; Spell et al., 2001; Chagas et al., 2002). Por lo que incluir el criterio de la concentración sérica de P_4 para seleccionar las vacas receptoras en un programa de transferencia no es confiable y tiene un uso práctico limitado (Reed et al., 1985).

Las vacas de las épocas templadas mostraron una tasa de gestación superior cuando recibieron embriones producidos en épocas templadas, comparado con la tasa de gestación observada en las vacas receptoras mantenidas en las mismas condiciones, pero a las que se les transfirieron embriones producidos en la época cálida. Estos resultados están indicando un efecto de la época de producción del embrión, donde las condiciones estresantes en la vaca donadora pudieron afectar

el desarrollo folicular y la capacidad del ovocito para producir un embrión viable o vigoroso. Esto podría estar relacionado con los efectos de acarreo del calor observados en vacas Holstein sobre la maduración y la competencia del ovocito para ser fertilizado (Sartori et al., 2002) y su posterior desarrollo embrionario (Putney et al., 1989 b; Rocha et al., 1998; Ambrose et al., 1999 b; Zeron et al., 2001; Roth et al., 2001; Al-Katanani et al., 2002 b). Donde incluso para mitigar este efecto se ha mostrado que la aspiración frecuente de los folículos medianos (Guzeloglu et al., 2001; Roth et al., 2001) o su eliminación mediante tratamientos repetidos con factor liberador de las gonadotropinas (Guzeloglu et al., 2001) permitió el reclutamiento de folículos saludables y mejoró la calidad morfológica del cúmulo ovígeno de los folículos posteriores a los tratamientos, con lo que se incrementó la proporción de embriones producidos *in vitro* que se desarrollaron hasta la fase de blastocito.

Otra posible explicación es que simplemente las condiciones del útero de la vaca donadora en estrés calórico afectaron el desarrollo temprano del embrión. Al respecto algunos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado una mayor susceptibilidad del embrión en los primeros 3 días de edad (Ealy et al., 1993; Ealy et al., 1995). Incluso se ha observado que los embriones expuestos a patrones de temperatura similares a los experimentados en vacas lactantes en el verano durante los primeros ocho días post-fertilización, el porcentaje de embriones con un desarrollo embrionario adecuado se reducen, por lo que la temperatura fluctuantes en la fase temprana de desarrollo del embrión puede ser un factor que afecta negativamente sobrevivencia embrionaria (Rivera y Hansen, 2001).

Los embriones de calidad excelente mostraron una tendencia a producir un mayor porcentaje de vacas gestantes, independientemente de la época en la que haya sido transferido. Esto concuerda con lo observado por otros investigadores que encontraron un menor porcentaje de gestación cuando se tienen embriones con una menor calidad o cuando se da una asincronía entre la receptora y el embrión (Markette et al., 1985; Farin y Farin, 1995; Spell et al., 2001).

A pesar de que el tiempo de transferencia del embrión a la vaca receptora fue similar entre las épocas de estudio, se observó que si el tiempo empleado en la colocación del embrión en el útero se incrementaba, las probabilidades de gestación se reducían. Esta tendencia ha sido observada por otros investigadores, donde un tiempo de transferencia del embrión mayor a 11 minutos se relacionó con una menor tasa de preñez, ya que una vez descongelado el embrión, éste se mantiene en contacto con el crioprotector por un mayor período de tiempo lo que puede dañarlo (Dochi et al., 1998).

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES.

Las vacas receptoras en la época de transferencia templada tuvieron una mayor tasa de gestación. En condiciones de confort la tasa de gestación de las vacas se redujo más del 50 % cuando los embriones transferidos fueron obtenidos de vacas donadoras mantenidas en condiciones de estrés calórico.

La transferencia de un embrión de calidad excelente incrementó la tasa de gestación de las vacas receptoras, independientemente de la época de transferencia. La producción láctea estimada a 305 días no fue importante en la respuesta de la tasa de gestación de la vaca receptora. El tiempo de transferencia tuvo una tendencia lineal negativa sobre la tasa de gestación.

Se están dando resultados, cada vez con mayor frecuencia, que están indicando que parte del problema de la fertilidad de las vacas lecheras en condiciones de estrés calórico, se debe a una menor calidad folicular y del ovocito, que puede afectar la competencia del mismo para ser fertilizado y tenga lugar un desarrollo adecuado del embrión en los primeros días de edad, y al mismo tiempo se esté dando un efecto acarreado del calor sobre la esteroidogénesis folicular y lútea, que podrían limitar el éxito de la gestación.

Lo anterior abre la posibilidad de realizar trabajos de investigación sobre los efectos del estrés sobre la competencia del ovocito en vacas lecheras, que podría

explicar parte de la subfertilidad de la vacas lechera. Al mismo tiempo, realizar trabajos de investigación aplicada en campo con programas de sincronización del estro y de la ovulación desde el post-parto temprano que podría apoyar en la producción de embriones más viables.

LITERATURA CITADA

Al-Katanani, Y.M., Drost, M., Monson, R.L., Rutledge, J.J., Krinninger, C.E., 3rd, Block, J., Thatcher, W.W., Hansen, P.J. 2002 a. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* 58(1): 171-82.

Al-Katanani, Y.M., Paula-Lopes, F.F., Hansen, P.J. 2002 b. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci*, 85(2):390-396.

Ambrose, J.D., Drost, M., Monson, R.L., Rutledge, J.J., Leibfried-Rutledge, M.L., Thatcher, M.J., Kassa, T., Binelli, M., Hansen, P.J., Chenoweth, P.J., Thatcher, W.W. 1999 a. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat stressed dairy cattle. *J. Dairy Sci*, 82(11):2369-2376.

Ambrose, J.D., Guzeloglu, A., Thatcher, M.J., Kassa, T., Díaz, T. and Thatcher, W.W. 1999 b. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to heat-stress. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 54:503-504.

Biggers, B.G., Geisert, R.D, Wetteman, R.P., Buchanan, D.S. 1987. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. *J. Anim Sci*, 64(5):1512-8.

Binelli, M., Thatcher, W.W., Mattos, R. and Basurelli, P.S. 2001. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*, 56: 1451-1463.

Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L., Robaldo Silva, J. 2002. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*, 58(1):51-9.

Dalton, J.C., Nadir, S., Bame, J.H., Noftsinger, M., Saacke, R.G. 2000. The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. *J. Anim Sci* 78(8): 2081-5.

Dochi, O., Yamamoto, Y., Saga, H., Yoshiba, N., Kano, N., Macda, J., Miyata, K., Yamauchi, A., Tominaga, K., Oda, Y., Nakashima, T., and Inohac, S. 1998. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology*, 49:1051-1058.

Drost, M., Ambrose, J.D., Thatcher, M.J., Cantrell, C.K., Wolfsdorf, K.E., Hasler, J.F., Thatcher, W.W. 1999. Conception rates after artificial insemination of embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology* 52(7): 1161-7.

Dunne, L.D., Diskin, M.G., Sreenan, J.M. 2000. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 and gestation and full term. *Animal Reproduction Science*, 58:39-44.

Ealy, A.D., Drost, M., and Hansen, P.J. 1993. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.*, 76: 2899.

Ealy, A.D., Howell, L.J., Monterroso, V.H, Aréchiga, C.F. and Hansen, P.J. 1995. Development changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. *J. Anim. Sci.*, 73:1401-1407.

Edwards, J.L. and Hansen, P.J. 1997. Differential response of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.*, 46:138-145.

Ellington, J.E., Foote, R.H., Farrell, P.B., Hasler, J.F., Webb, J., Henderson, W.B. and McGrath, A.B. 1991. Pregnancy rates after the use of a gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology*, 36(6):1035-1042.

Elsden, R.P., Nelson, L.D. and Seidel, G.E. Jr. 1978. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*, 9:17-26.

Elsden, R.P. 1987. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*, 6(5): 523-532.

Farin, P.W. and Farin C.E. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biology of Reproduction*, 52: 676-682.

Ferguson, J.D., Galligan, D.T. and Thomsen, N. 1994. Principal descriptor of body condition score in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 77:2695-2703.

Geisert, R.D., Fox, T.C., Morgan, G.L., Wells, M.E., Wettemann, R.P., Zavy, M.T. 1991. Survival of bovine embryos transferred to progesterone-treated asynchronous recipients. *J. Reprod. Fertil*, 92(2): 475-82.

Guzeloglu, A., Ambrose, J.D., Kassa, T., Diaz, T., Thatcher, M.J. and Thatcher, W.W. 2001. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. *Anim. Reprod. Sci.*, 66:15-34.

Hasler, J.F. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 1;56(9):1401-15.

Howell, J.L., Fuquay, J.W. and Smith, A. E. 1994. Corpus luteum growth and function in lactating Holstein cows during spring and summer. *J. Dairy Sci.*, 77: 735-739.

Ingraham R.H., Stanley R.W. and Wagner W.C. 1975. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in Hawaii. *J. Dairy Sci.* 59(12): 2086.

Linder, G.M. and Wright, R.W. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20(4):407-416.

Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., Yaniz, J., Rutllant, J., Lopez-Bejar, M. 2002. Factors affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogenology*, 1;57(4):1251-61.

Malayer, J.R., Hansen, P.J. and Buhi, W.C. 1988. Effect of day of the oestrus cycle, side of the reproductive tract and heat shock on in-vitro protein secretion by bovine endometrium. *J. Reprod. Fert.*, 84:567-578.

Malayer, J.R. and Hansen, P.J. 1990. Differences between Brahman and Holstein cows in heat-shock induced alterations of protein synthesis and secretion by oviducts and uterine endometrium. *J. Anim. Sci.*, 68: 266.

Markette, K.L., Seidel, G.E., Jr., and Elsdon, R.P. 1985. Estimation of embryonic losses in bovine embryo transfer recipients from progesterone profiles and returns to estrus. *Theriogenology*, 23:45-62.

Payas, A.J., Broadbent, P.J., Dolman, D.F., and Christie, W.B. 1989. Factors affecting pregnancy rate in embryo transfer recipients with reference to plasma progesterone. *Theriogenology*, 31(238).

Putney, D.J., Drost, M. and Thatcher, W.W. 1989a. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology*, 31: 765-778.

Putney, D.J. Mullins, S., Thatcher, W.W. Drost, M. and Gross, T.S. 1989b. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 19: 37.

Reed, M.L., Roussel, J.D. and Seybt, S.H. 1985. Repeatability of blood serum progesterone levels in dairy heifers on day 7 of the estrous cycle. *Theriogenology*, 24(6):643-646.

Rivera, R.M. and Hansen, P.J. 2001. Development of culture bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *J. Reprod. And Fert.*, 121: 107-115.

Rocha, A., Randel, R.D., Broussard, J.R., Lim, J.M., Blair, R.M., Roussel, J.D., Godke, R.A. and Hansel, W. 1998. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in Bos taurus but not in Bos indicus cows. *Theriogenology*, 49:657-665.

Roth, Z., Arav, A., Zeron, Y., Braw-Tal, R. And Wolfenson, D. 2001. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction*, 122(5):737-744.

Rutledge, J.J. 2001. Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. *Theriogenology*, 55(1): 105-11

Ryan, D.P., Prichard, J.F., Kopel, E. and Godke, R.A. 1993. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology*, 39: 719-737.

Sartori, S., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S.A., Guenther, J.N., Parrish, J.J., Wiltbank, M.C. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.*, 85(11):2803-12.

SAS. SAS/STAT User's Guide (Release 6.03). 1988. Cary NC, USA: SAS Inst. Inc.

Smith, A.K., Broadbent, P.J., Dolman, D.F., Grimmer, S.P., Davies, D.A., Dobson, H. 1996. Norgestomet implants, plasma progesterone concentrations and embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Vet. Rec.*, 24;139(8):187-91.

Spell, A.R., Beal, W.E, Corah, L.R., Lamb, G.C. 2001. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, 15;56(2):287-97.

Thatcher, W.W., Hansen, P.J., Gross, T.S., Helmer, S.D., Plante, C. and Bazer, F.W. 1989. Antiluteolytic effects of bovine trophoblast protein – 1. *J. Reprod. Fert.*, 37(suppl 1):91-105.

Thatcher, W.W., Staples, C.R., Danet-Desnoyers, G., Oldick, B. and Smitt E.J. 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. Anim. Sci.*, 72 (Suppl. 3):16-30.

Thatcher, W.W., de la Sota, R.L., Schmitt, E. J.-P., Díaz, T.C., Badinga, L., Simmens, F.A., Staples, C.R. and Drost, M. 1996. Control and management of ovarian follicles in cattle to optimize fertility. *Reprod. Fert. Dev.*, 8:203-217.

Thuemmel, A.E., Gwazdauskas, F.C., Whittier, W.D., McGilliard, M.L. 1992. Effect of progesterone supplementation in repeat-breeder cattle on conception and plasma progesterone. *J. Endocrinol Inves*, 15(5):393-6.

Willard, S., Gandy, S., Bowers, S., Graves, K., Elias, A., Whisnant, C. 2003. The effects of GnRH administration post-insemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology*, 15:59(8):1799-1810.

Wolfenson, D., Luft, O., Berman, A. and Meidan, R. 1993. Effect of season, incubation temperature and cell age on progesterone and prostaglandin f2 alpha production in bovine luteal cells. *Anim. Reprod. Sci.*, 32: 27-40.

Zeron, Y., Ocheretny, A., Kedar, O., Borochoy, A., Sklan, D. and Arav, A. 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*, 121:447-454.

CAPÍTULO 7

EFFECTO DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR EN VACAS HOLSTEIN DE SISTEMAS INTENSIVOS DE PRODUCCION EN AGUASCALIENTES, MÉXICO

RESUMEN

Los objetivos del estudio fueron evaluar el efecto del estrés calórico sobre la dinámica y dominancia folicular y la función lútea durante un ciclo estral. Se emplearon 60 vacas Holstein que se agruparon en cuatro épocas (EPO), de acuerdo a la presencia o ausencia de estrés calórico 21 días antes del iniciar el estudio y los 21 días del ciclo evaluado: 1. Cálida – Templada (CT). 2. Templada – Templada (TT). 3. Templada – Cálida (TC). 4. Cálida – Cálida (CC). Las características del desarrollo folicular, número de ondas foliculares (NOF) y la duración del ciclo estral se evaluaron a través de un análisis de covarianza con bloques al azar. Las concentraciones séricas de hormona folículo estimulante (FSH), progesterona (P_4) y factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), y el número de folículos pequeños, medianos y grandes se analizaron en modelos anidados. En vacas de tres ondas foliculares (tres OF), los folículos dominantes reclutados de la primera y segunda onda folicular mostraron una menor dominancia folicular y una emergencia más temprana del segundo folículo dominante ($P < 0.01$). En vacas de época CC, los folículos dominantes del primer y segundo crecimiento folicular mostraron una menor dominancia y diámetro folicular, que lo observado en vacas de las EPO CT y TT ($P < 0.01$). Las vacas de EPO cálidas (TC y CC) tuvieron un mayor número de ondas foliculares (2.5), que las de EPO templadas (CT y TT) (2.2) ($P < 0.05$). La duración del ciclo estral fue mayor en vacas con tres OF, que la observada en vacas con dos ondas foliculares (dos OF) ($P < 0.05$). En vacas de tres OF de EPO cálida tuvieron una mayor concentración de FSH durante varios días del ciclo estral ($P < 0.05$). Las vacas de dos y tres OF de EPO cálida tuvieron un mayor número de folículos pequeños durante la segunda mitad del ciclo estral. Las vacas de tres OF de EPO cálida mostraron más FGRA varios días del ciclo estral ($P < 0.05$). Las vacas de época

cálida (CC y TC) tuvieron una menor concentración de P_4 durante el ciclo estral, comparado a lo observado en vacas de época templada (TT) ($P < 0.05$). En vacas de EPO cálida de dos y tres OF, y en vacas de época templada con OF de se observó una menor concentración de IGF-I en los días 6, 8 y 10 del ciclo estral, y los días -7, -5, -3 y -1, con respecto a lo observado en vacas con tres OF de la época templada ($P < 0.05$). Vacas de época de cálida tuvieron una menor dominancia folicular y se incrementó el número de ondas foliculares. La mayor proporción de vacas con tres ondas foliculares se presentó en la época cálida, quienes mostraron mayores concentraciones de hormona folículo estimulante y más crecimiento de folículos pequeños. La función lútea estuvo comprometida en vacas que se mantuvieron en condiciones de estrés calórico.

INTRODUCCIÓN

En los meses calurosos del verano de Florida, E.U. (Badinga et al., 1993) e Israel (Wolfenson et al., 1995) se ha observado en vacas Holstein durante la primera mitad del ciclo estral un rápido crecimiento del folículo dominante (Wolfenson et al., 1995), con una reducción en el diámetro y volumen del fluido folicular (Badinga et al., 1993) y una emergencia temprana del folículo ovulatorio, que podría resultar en la ovulación de un folículo de mayor edad (Wolfenson et al., 1995). En otros estudios realizados en vacas Holstein expuestas a estrés calórico, en condiciones controladas, durante la segunda mitad del ciclo estral, se ha observado un incremento en el número de folículos pequeños (Truth et al., 1998), una reducción de la tasa de crecimiento y del diámetro del folículo preovulatorio (Wilson et al., 1998 a). Estos eventos que han sido interpretados como una pérdida de la dominancia folicular, compromete la función del folículo dominante, la ovulación y el mecanismo luteolítico. Sin embargo, estos estudios al realizarse en fases definidas del ciclo, en condiciones controladas y en etapas con poco reto en la producción láctea no determinaron un posible efecto del estrés calórico durante toda la fase de desarrollo folicular antral.

En la vaca lechera con un alto nivel productivo se ha observado que la fertilidad permanece baja durante el otoño y el invierno temprano, aún cuando las condiciones de estrés calórico ya no están presentes (Lozano et al., 2004, aceptado para su publicación). En estudios realizados, en vacas Holstein lactantes (Roth et al., 2001 b) y no lactantes (Guzeloglu et al., 2001), expuestas a estrés calórico durante el verano (Roth et al., 2001 b) o en un ciclo folicular (Guzeloglu et al., 2001) han observado un efecto negativo del acarreo del calor del verano sobre la calidad folicular y la competencia del ovocito para ser fertilizados y tener un desarrollo embrionario adecuado hasta blastocito.

Los objetivos del estudio fueron evaluar el efecto del estrés calórico durante el desarrollo folicular antral sobre las características de desarrollo folicular durante un ciclo estral, y la relación de la dinámica folicular con los niveles de la hormona folículo estimulante, los factores de crecimiento similares a la insulina I y la función lútea en hatos lecheros en condiciones comerciales de producción.

MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción general del estudio

El estudio se realizó en hatos lecheros comerciales de producción intensiva del estado de Aguascalientes, México. Se utilizaron vacas Holstein en su pico de producción de leche y aptas para recibir el primer servicio en cuatro épocas de estudio. Éstas fueron expuestas a ultrasonografía transrectal para determinar el tipo de estructuras presentes en los ovarios y se obtuvieron muestras sanguíneas durante un ciclo estral. Cada época de estudio tuvo una repetición, conforme se describe a continuación.

Variables climáticas

Los datos climatológicos de temperatura ambiente y humedad relativa (HR) de los años previos al estudio (1995 a 1998) fueron proporcionados por la Comisión Nacional del Agua del Estado de Aguascalientes, de una estación ubicada alrededor de 20 km de los hatos lecheros (Gráfica 1). La temperatura máxima

registrada en ° C fue transformada en grados Fahrenheit y la HR se tomaron como base para calcular el índice temperatura–humedad (THI) según lo descrito por la literatura (Ingraham et al., 1975).

$$\text{THI} = \text{° F} - ((0.55 - ((\text{HR} / 100) \times 0.55)) * (\text{° F} - 58))$$

Epocas de estudio

Con esta información se determinaron las épocas de estudio (EPO). Se contemplaron en éstas, la presencia o ausencia de estrés calórico 21 días antes del inicio del estudio (TA) y durante el desarrollo folicular final (EPO).

Las épocas de estudio definidas fueron:

Cálida – Templada (CT).- entre el 5 de noviembre y 12 de diciembre.

Templada – Templada (TT).- del 17 de enero al 25 de febrero.

Templada – Cálida (TC).- del 15 de abril al 9 junio.

Cálida – Cálida (CC).- del 14 de junio al 11 de julio.

El estudio se realizó en forma simultánea en dos explotaciones lecheras en cada una de las épocas descritas, por dos años consecutivos. Se registraron las variables climáticas 21 días antes y durante el período de estudio, las características de éstas se muestran en el Cuadro 1. Se observó en las épocas en condiciones cálidas (TC y CC) una mayor temperatura, que en las épocas templadas (CT y TT) ($P < 0.01$). El mayor THI se registró en la época CC ($P < 0.01$).

Se realizó una subclasificación de las épocas definidas de estudio por la ausencia o presencia de estrés calórico, antes o durante el período de estudio:

I. Antes del inicio del estudio (TA):

TA – Templada.- en este grupo se incluyeron las épocas TC y TT.

TA – Cálida.- en este grupo se incluyeron las épocas CT y CC.

II. Durante el período de estudio (EPO):

EPO – Templada.- en este grupo se incluyeron las épocas CT y TT.

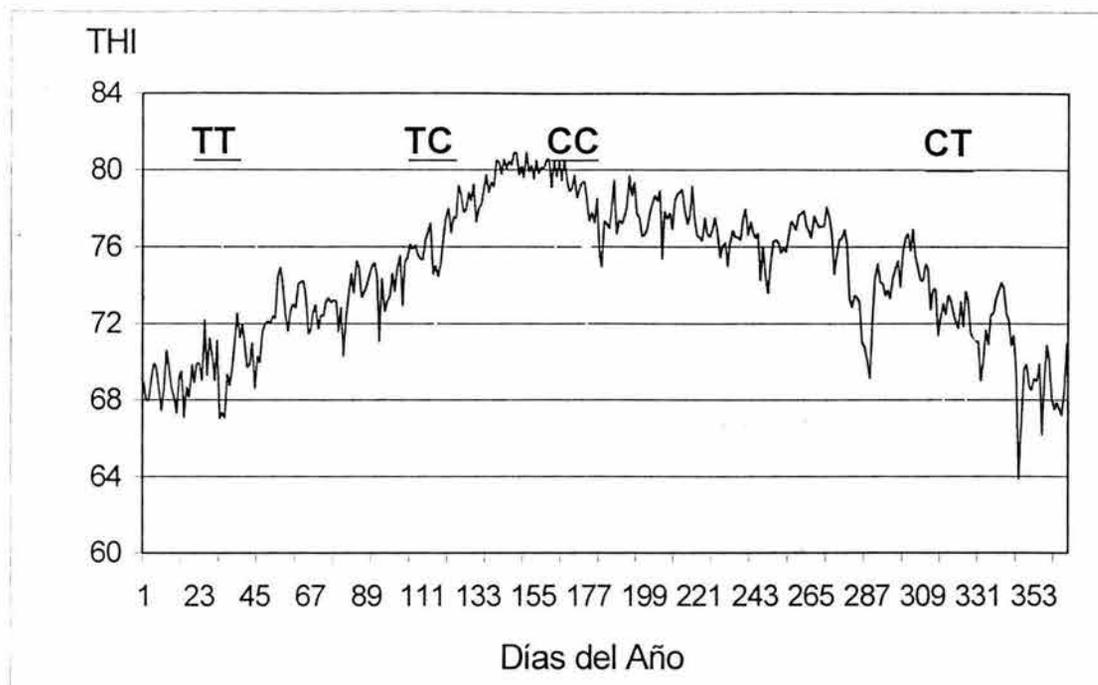
EPO – Cálida.- en este grupo se incluyeron las épocas TC y CC.

Animales experimentales

El estudio incluyó a 97 vacas Holstein clínicamente sanas, sin problemas anatómo-patológicos del aparato reproductor, con ciclos estrales regulares y una condición física homogénea. De las vacas en estudio, 13 (13.4 %) presentaron un quiste folicular durante el ciclo estral, 16 (16.5 %) presentaron un folículo persistente, según lo definido en la literatura (Beam y Butler, 1998; Garverick et al., 1997; Lopez-Gatius et al., 2001) y 68 tuvieron dos o tres ondas foliculares. De este último grupo, ocho vacas no mostraron luteólisis en la última fase del ciclo estral en estudio, por lo que fueron eliminadas del mismo. Para caracterizar la dinámica folicular y los niveles hormonales durante el ciclo estral solo fueron incluidas en el estudio las 60 vacas de dos (dos OF) y tres ondas foliculares (tres OF) (Cuadro 2).

En los Cuadros 3 y 4 se muestra la distribución del número de vacas por duración del ciclo estral y número de ondas foliculares de las diferentes épocas de estudio. La mayor parte de las vacas que mostraron tres ondas foliculares durante el ciclo estral fueron de las épocas cálidas. Donde el 100%, 70% y el 80% de los casos se observaron en vacas con ciclos estrales menores de 21, entre 22 y 25 y mayor a 25 días, respectivamente.

GRÁFICA 1. Índice temperatura–humedad en el estado de Aguascalientes en los años de 1995 a 1998. Las barras horizontales de la parte superior, señalan las épocas en que se caracterizaron los desarrollos foliculares



Las características productivas de las 60 vacas al inicio del estudio tuvieron en promedio 2.2 ± 1.5 partos (NP); 71.2 ± 4.3 días en leche (DEL); 3.3 ± 0.1 de condición corporal (CFI); 622.8 ± 26.0 kg de peso corporal (PINIC) y 9107.6 ± 458.3 kg de producción de leche estimada a 305 días (P305D). Ninguna de las variables anteriores fueron diferentes entre las épocas de estudio ($P > 0.05$), a excepción de la P305D que fue mayor en las vacas de la época CT ($P < 0.01$) (Cuadro 5).

La condición física se calificó mediante una evaluación subjetiva con calificación de 1 a 5, con una aproximación de 0.25 puntos (Ferguson et al., 1994). El peso corporal fue determinado a través de la circunferencia torácica (cm) y la P305D se estimó de los registros individuales de producción. El número de partos se clasificó en uno, dos y tres ó más.

Alimentación de las vacas

La alimentación se proporcionó 6 veces al día en forma de ración integral. Los forrajes utilizados fueron ensilaje de maíz, rye grass verde y heno de alfalfa. El concentrado estuvo formado por una mezcla comercial, semilla de algodón, bagazo húmedo de cervecería, proteína no degradable en rumen (Soybest®, Grain Staples Inc.) y grasa de sobrepaso (Megalac®, Rumen Bypass Fat, Arm & Hammer Animal Nutrition Group). La relación forraje concentrado fue de 35:65. La composición química de la dieta total en base seca fue: 1.79 Mcal de energía neta de lactancia / kg, 17.7% de proteína cruda, 37% de la proteína fue no degradable, 19.6% de fibra detergente ácido, 35% de fibra detergente neutro, 7.1% de grasa y 31% de carbohidratos no estructurales. Las vacas tuvieron libre acceso a sombreaderos y agua.

Evaluaciones ultrasonográficas

Los ovarios de las vacas fueron evaluados durante un ciclo estral utilizando un ultrasonido con transductor rectal de 7.5 MHz (Sonovet 600). Del día 0 (inicio del estro) al día 17 del ciclo estral la evaluación de las estructuras ováricas se practicó cada dos días, y diariamente a partir del día 17 hasta la manifestación del siguiente estro, de acuerdo a las técnicas establecidas (Pierson y Ginther, 1988; Pierson et al., 1988).

En cada examen de ultrasonido se registró el número total de folículos (NTF) y el número de folículos de acuerdo a su diámetro: 1. Folículos pequeños (FPEQ), menores de 5 mm. 2. Folículos medianos (FMED), de 5.1 a 9 mm. 3. Folículos grandes (FGRA), mayores de 9 mm. En un mapeo folicular se registró la posición de los folículos y su relación con otras estructuras ováricas, para su identificación en los exámenes posteriores. Se evaluó la emergencia, la selección y la dominancia de cada onda folicular. Se identificó el folículo dominante y el folículo subordinado.

CUADRO 1. Temperatura ambiente, humedad relativa e índice temperatura – humedad registradas antes y durante el ciclo estral muestreado en las distintas épocas de estudio para evaluar el desarrollo folicular de vacas Holstein lactantes en Aguascalientes, México

	EPOCAS DE ESTUDIO			
	TEMPLADA		CÁLIDA	
	CT	TT	TC	CC
21 DIAS ANTES DEL CICLO ESTRAL EVALUADO	$\bar{x} \pm e.e.$	$\bar{x} \pm e.e.$	$\bar{x} \pm e.e.$	$\bar{x} \pm e.e.$
Temperatura máxima, ° C	25.4 ± 0.35 a	22.6 ± 0.36 b	28.0 ± 0.36 c	27.9 ± 0.39 c
Rango	19.1 a 29.2	13.6 a 26.2	17.1 a 31.4	22.1 a 32.7
Humedad Relativa, %	56.8 ± 1.4 a	49.2 ± 1.4 b	30.6 ± 1.4 c	56.1 ± 1.6 a
Rango	38.0 a 69.0	29.5 a 88.4	14.0 a 51.0	30.0 a 80.0
Índice Temp – humedad	72.8 ± 0.4 a	68.3 ± 0.4 b	73.1 ± 0.4 a	75.7 ± 0.5 c
Rango	64.9 a 77.9	56.6 a 72.0	60.7 a 78.4	69.9 a 81.7
DURANTE EL CICLO ESTRAL EVALUADO				
Temperatura máxima, ° C	22.9 ± 0.31 a	23.1 ± 0.28 a	31.1 ± 0.28 b	27.8 ± 0.24 c
Rango	19.1 a 24.9	9.6 a 26.1	25.8 a 34.5	24.0 a 30.5
Humedad Relativa, %	54.4 ± 1.4 a	52.1 ± 1.3 a	42.4 ± 1.3 b	68.8 ± 1.2 c
Rango	39.7 a 68.2	29.5 a 88.4	22.1 a 71.5	49.1 a 85.8
Índice Temp – humedad	69.4 ± 0.37 a	69.2 ± 0.33 a	78.3 ± 0.34 b	77.9 ± 0.30 b
Rango	64.9 a 72.1	50.2 a 73.2	72.7 a 82.2	73.3 a 82.9

a,b,c / Distintas literales por renglón indican diferencia significativa (P<0.01).

CUADRO 2. Distribución de los animales en estudio con relación a las condiciones de desarrollo folicular durante el ciclo estral caracterizado en las cuatro épocas de estudio

	EPOCAS DE ESTUDIO				Totales
	TEMPLADA		CÁLIDA		
Tipo Folicular	CT	TT	TC	CC	
Quiste Folicular	3	4	3	3	13 (13.40 %)
Folículo Persistente	6	5	4	1	16 (16.49 %)
Dos o tres ondas foliculares	16	15	17	20	68 (70.10 %)
Dos o tres ondas foliculares con luteólisis normal *	13	12	16	19	60 (61.85 %)

* Grupo de vacas en que se caracterizó el desarrollo folicular y las concentraciones séricas de diferentes hormonas durante un ciclo estral.

CUADRO 3. Distribución del número de vacas por duración del ciclo estral y número de ondas foliculares, por épocas de condiciones de estrés calórico o no, antes y durante la evaluación del desarrollo folicular

EPOCA		n	Duración Ciclo Estral, d.			Ondas Foliculares	
Antes	Durante		Menor a 21	22 a 25	Mayor a 25	Dos	Tres
Cálida	Templada	13	4	9	0	11	2
Templada	Templada	12	6	4	2	10	2
Templada	Cálida	16	8	5	3	8	8
Cálida	Cálida	19	7	8	4	9	10

CUADRO 4. Distribución del número de vacas con dos (dos OF) o tres (tres OF) ondas foliculares, con diferente duración del ciclo estral, por épocas de condiciones de estrés calórico o no, antes y durante la evaluación del desarrollo folicular

EPOCAS		DURACIÓN DEL CICLO ESTRAL, d.					
Antes	Durante	Menos de 21		22 a 25		Mayor a 25	
		Dos OF	Tres OF	Dos OF	Tres OF	Dos OF	Tres OF
Cálida	Templada	4	0	7	2	0	0
Templada	Templada	6	0	3	1	1	1
Templada	Cálida	4	4	3	2	1	2
Cálida	Cálida	4	3	3	5	2	2

CUADRO 5. Características productivas de las 60 vacas experimentales en las que se caracterizó un ciclo estral en cuatro diferentes épocas de estudio

Epocas de estudio	CT		TT		TC		CC	
	n	X ± e.e.	n	X ± e.e.	n	X ± e.e.	n	X ± e.e.
Número de Partos	13	2.15 ± 0.41	12	2.07 ± 0.43	16	2.10 ± 0.37	19	2.26 ± 0.34
Días en Leche	13	63.4 ± 4.6	12	76.5 ± 4.7	16	73.4 ± 4.1	19	68.2 ± 3.7
Peso Corporal Inicial (kg)	13	626.5 ± 25.6	12	617.3 ± 25.3	16	632.7 ± 21.7	19	628.3 ± 19.8
Peso Corporal Final (kg)	13	641.9 ± 26.1	12	620.2 ± 27.3	16	629.1 ± 23.5	19	633.8 ± 22.0
Condición Física Inicial	13	3.20 ± 0.10	12	3.26 ± 0.10	16	3.38 ± 0.09	19	3.30 ± 0.08
Condición Física Final	13	3.32 ± 0.09	12	3.42 ± 0.09	16	3.44 ± 0.08	19	3.39 ± 0.08
Producción Láctea Estimada a 305 días (lts)	13	10729.4 ± 507.8 a	12	9229.6 ± 530.6 b	16	8709.0 ± 456.2 b	19	8353.7 ± 416.7 b

a,b (Distintas literales por renglón indican diferencia estadística (P<0.01)).

Se definió como onda folicular al proceso entre la emergencia de un grupo sincrónico de folículos antrales menores o iguales a 5 mm, hasta la atresia u ovulación del folículo de ese grupo que llegó a ser dominante. El folículo dominante (FD) fue el que mantuvo el mayor crecimiento sostenido, mientras los demás suspendieron su crecimiento y se atresiaron en algún momento. Al FD de cada onda folicular se les determinó la tasa diaria de crecimiento desde la emergencia hasta que alcanzaron su diámetro mayor, la duración de la fase de meseta, definida como el momento en que el folículo alcanzó su diámetro máximo y que comenzó a reducir de tamaño (atresiarse) u ovuló. Este seguimiento se hizo con apoyo de los mapas foliculares, mediante la observación retrospectiva del FD que alcanzó el mayor tamaño en cada onda folicular. La ovulación se definió cuando después de la presentación del celo ocurrió la desaparición del folículo dominante entre dos monitoreos ultrasonográficos consecutivos, seguido de la formación de un cuerpo lúteo en la misma posición en que se encontraba el folículo ovulatorio.

Determinación de hormona folículo estimulante (FSH), progesterona (P₄) y factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) por radioinmunoanálisis

Momentos antes de realizar las prácticas de ultrasonido se tomaron muestras sanguíneas de la vena coccígea, que fueron colocadas en hielo, transportadas y mantenidas en refrigeración hasta al día siguiente, cuando se centrifugaron a 700 g durante 10 min. Los sueros obtenidos se almacenaron a - 20 °C hasta su procesamiento en el laboratorio de radioinmunoensayo (RIA) para la medición de las concentraciones de P₄ (ng/ml) y FSH (ng/ml). Para evaluar las concentraciones de IGF-I (ng/ml), se tomaron las muestras de suero que correspondieron a los días 2, 4, 6, 8 y 10 del ciclo estral en estudio, y en forma regresiva los días -7, -5, -3, -1 y 0 con relación a la manifestación del estro subsecuente.

El RIA de FSH (Perera et al., 2003) se realizó utilizando como trazador al NIDDK-oFSH-I-SIAFP-19, marcado con I¹²⁵ de acuerdo a la técnica de YODO-GEN

(Perera et al., 1996). Como estándar se empleó al NIDDK- α FSH-SIAFP-RP-2 (AFP-4117A) a las dosis de 0.01 a 5.0 ng/tubo y el primer anticuerpo (NIDDK- α FSH-1, AFPC5288113) se utilizó a una dilución final de 1:40,000. La sensibilidad del ensayo correspondió a 0.025 ng/tubo con un coeficiente de variación intra e interensayo de 9.5 % y 11.1 %. La separación de la fracción unida de la libre se realizó con un segundo anticuerpo (generado en burro) a una dilución 1:80, previa incubación a 4 °C por 24 h.

La determinación de P_4 en suero se realizó con un estuche de RIA comercial (Coat A Count DPC) en fase de sólida. El sistema presentó una sensibilidad de 0.1 ng/ml con un coeficiente de variación intraensayo del 3.69 % e interensayo del 5.86 %, a la dosis de 0.49 ng/ml. En tanto que a la dosis de 20.0 ng/ml, el coeficiente de variación intra fue del 5.63 % e interensayo del 6.11 %.

Las concentraciones circulantes de IGF-I se realizaron por duplicado en un ensayo inmunométrico (DSL-2800, Kit, Diagnostic System Laboratories Inc, Houston, TX), previamente validado (León et al., 2004). Este sistema presentó un coeficiente de variación del 9 %.

Variables del desarrollo folicular

Se evaluaron para cada FD las siguientes características: el día de la emergencia, los días de crecimiento (desde la emergencia hasta que en dos muestreos consecutivos no tuvo crecimiento alguno), la tasa de crecimiento (mm/día); el diámetro máximo alcanzado (mm) y el día en que lo alcanzó, la duración de la fase de meseta en días (inició al concluir la fase de crecimiento y finalizó al registrarse una disminución progresiva de su diámetro) o la ovulación. De cada ciclo estral se evaluaron el número de ondas foliculares (NOF) y la duración del ciclo estral. En cada día de muestreo se registró el número de FPEQ, FMED, FGRA y la concentración sérica de las hormonas FSH (ng/ml), P_4 (ng/ml) e IGF-1 (ng/ml).

Análisis de la información

Los datos climáticos observados durante el estudio se compararon entre épocas por medio de un análisis de varianza. El modelo empleado fue:

$$Y_{ij} = \mu + EPO_i + E_{(ij)}$$

Donde:

Y_{ij} = es la variable climática de la j-ésima observación, de la i-ésima época de estudio.

μ = es la media general.

EPO_i = es el efecto de la i-ésima época de estudio (1,2,3,4).

$E_{(ij)}$ = es el error NID $(0, \sigma^2_e)$.

El número de partos, los días en leche, el peso corporal y la condición corporal de la vaca al inicio y al final del estudio y la producción láctea estimada a 305 días fueron analizados por medio de un análisis de varianza con bloques al azar. El modelo al cual se atribuyó la variación fue:

$$Y_{ijk} = \mu + B_j + \delta_{(j)} + EPO_i + E_{(ijk)}$$

Donde:

Y_{ijk} = es la variable de respuesta de la k-ésima observación, de la i-ésima época de estudio.

μ = es la media general.

B_j = es el efecto de año de estudio hato.

$\delta_{(m)}$ = es el error de restricción, NID $(0, \sigma^2_e)$.

EPO_i = es el efecto de la i-ésima época de estudio (1,2,3,4).

$E_{(mijk)l}$ = es el error NID $(0, \sigma^2_e)$.

El efecto de año y la interacción año x época no fueron significativas. Se creó una interacción donde se confundió el efecto de año con el hato, la cual se utilizó como efecto de bloque. Los efectos de interacción EPO x NOF y TA x NOF no fueron significativos, por lo que se eliminaron del modelo. Las variables de la dinámica folicular de la primera y segunda onda de crecimiento folicular, y el intervalo entre

celos se analizaron a través de un análisis de covarianza con bloques al azar. El modelo al cual se atribuyó la variación fue:

$$Y_{mijkl} = \mu + B_m + \delta_{(m)} + EPO_i + TA_j + EPO \times TA_{ij} + NOF_k + b_1(P305D - \mu_{P305D}) + E_{(ijkl)}$$

Donde:

Y_{Kijl} = es la variable de respuesta de la l-ésima observación, del j-ésimo número de onda folicular y la i-ésima época de estudio.

μ = es la media general.

B_m = es el efecto de año - hato.

$\delta_{(m)}$ = es el error de restricción, NID $(0, \sigma^2_e)$.

EPO_i = es el efecto de la i-ésima condición climática durante el estudio (1,2).

TA_j = es el efecto de la j-ésima condición climática anterior al estudio (1,2).

$EPO \times TA_{ij}$ = es el efecto de interacción de la i-ésima EPO con la j-ésima TA.

NOF_k = es el efecto del k-ésimo número de onda folicular (1,2,3).

$b_1(P305D - \mu_{P305D})$ = es el efecto de la covariable de la P305D en su forma lineal.

$E_{(mijkl)}$ = es el error NID $(0, \sigma^2_e)$.

Las concentraciones séricas de FSH, P_4 y el número de FPEQ se analizaron por separado, en vacas con una DCICLO menor a 21 días (CEN); y las que tuvieron un DCICLO entre 22 y 25 días (CEL).

Para cada grupo, el análisis de FSH, P_4 , IGF-I y FPEQ se hizo utilizando dos modelos a los que se atribuyó la variación total. En el primero se estimó el efecto de EPO, el día del ciclo estral y su interacción. En el segundo se utilizó el NOF, el día del ciclo estral y su interacción.

$$1. Y_{ijkl} = \mu + E1_i + \delta_{(i)} + NV(E1)_{ij} + DCICLO_k + E1 \times DCICLO_{ik} + E_{(ijkl)}$$

Donde:

Y_{ijkl} = es la variable de respuesta de la l-ésima observación, del k-ésimo día del ciclo estral, de la j-ésima vaca anidada en la i-ésima época de estudio, y la i-ésima época de estudio.

μ = es la media general.

$E1_i$ = es el efecto de la i-ésima época de estudio (1,2)

$\delta_{(i)}$ = es el error de restricción, NID $(0, \sigma^2_e)$.

$NV(E1)_{ij}$ = es el efecto de la j-ésima vaca anidada en la i-ésima época de estudio.

$DCICLO_k$ = es el efecto del k-ésimo día del ciclo estral (1,....21 a 25).

$E1 \times DCICLO_{ik}$ = es el efecto de la interacción de la i-ésima época de estudio con el k-ésimo día del ciclo estral.

$E_{(mijk)}$ = es el error NID $(0, \sigma^2_e)$.

$$2. Y_{ijkl} = \mu + NOF_i + \delta_{(i)} + NV(NO F)_{ij} + DCICLO_k + NOF \times DCICLO_{ik} + E_{(ijkl)}$$

Donde:

Y_{ijkl} = es la variable de respuesta de la l-ésima observación, del k-ésimo día del ciclo estral, de la j-ésima vaca anidada en la i-ésima onda folicular, y la i-ésima onda folicular.

μ = es la media general.

NOF_i = es el efecto de la i-ésima onda folicular (2,3).

$\delta_{(i)}$ = es el error de restricción, NID $(0, \sigma^2_e)$.

$NV(NO F)_{ij}$ = es el efecto de la j-ésima vaca anidada en la i-ésima onda folicular.

$DCICLO_k$ = es el efecto del k-ésimo día del ciclo estral (1,....21 a 25).

$NOF \times DCICLO_{ik}$ = es el efecto de la interacción de la i-ésima onda folicular con el k-ésimo día del ciclo estral.

$E_{(mijk)l}$ = es el error NID $(0, \sigma^2_e)$.

El número de FMED y FGRA se analizaron con los dos modelos anteriores, solo que se introdujo el NTF como covariable en su forma lineal.

Las variables de desarrollo folicular de una tercera emergencia de crecimiento folicular y el NOF se analizaron a través de un análisis de covarianza con bloques al azar, con el modelo:

$$Y_{mijl} = \mu + B_m + \delta_{(m)} + EPO_i + TA_j + EPO \times TA_{ij} + b_1(P_{305D} - \mu_{P_{305D}}) + E_{(ij)l}$$

Donde:

Y_{mij} = es la variable de respuesta de la i -ésima observación, de la j -ésima época previa al estudio y la m -ésima época de estudio.

μ = es la media general.

B_m = es el efecto de año - hato.

$\delta_{(m)}$ = es el error de restricción, NID $(0, \sigma^2_e)$.

EPO_i = es el efecto de la i -ésima condición climática durante el estudio (1,2).

TA_j = es el efecto de la j -ésima condición climática anterior al estudio (1,2).

$EPO \times TA_{ij}$ = es el efecto de interacción de la i -ésima EPO con la j -ésima TA.

$b_1(P305D - \mu_{P305D})$ = es el efecto de la covariable de la P305D en su forma lineal.

$E_{(mij)l}$ = es el error NID $(0, \sigma^2_e)$.

Los análisis de bloques se realizaron utilizando los procedimientos de GLM y para los modelos anidados se utilizó el procedimiento mixed del paquete estadístico SAS (SAS, 1988).

RESULTADOS

1. DINÁMICA Y DESARROLLO FOLICULAR

Los folículos dominantes emergidos de la primera y segunda ondas de crecimiento folicular, de vacas expuestas a estrés calórico durante el ciclo estral estudiado, mostraron menos días de crecimiento ($P < 0.01$), un menor diámetro máximo ($P < 0.1$) y tuvieron una fase de meseta más prolongada ($P < 0.05$), que lo observado en los folículos dominantes de las vacas de época templada (Cuadro 6). La época previa a la evaluación (TA), templada o cálida, no afectó las variables del desarrollo folicular durante el ciclo estral estudiado ($P > 0.05$).

En las vacas de tres OF se observó que el folículo emergido de la primera onda de crecimiento folicular alcanzó rápidamente su diámetro máximo, con un menor tamaño y una fase de meseta más prolongada ($P < 0.01$). En estas mismas vacas, el segundo folículo dominante emergió más temprana y alcanzó en menos días su diámetro máximo ($P < 0.01$) (Cuadro 7).

El estrés calórico 21 días antes del inicio de la fase de evaluación del crecimiento folicular en un ciclo estral, retrasó la emergencia del tercer folículo dominante ($P < 0.05$). Las condiciones de estrés durante el ciclo estral en que se evaluó el desarrollo folicular, no afectó ninguna de las características de la evolución del folículo ovulatorio emergido de una tercera onda folicular ($P > 0.05$).

En el cuadro 8, se muestran las características de desarrollo folicular, para el efecto de interacción de la presencia o ausencia del estrés calórico, 21 días antes de iniciar el estudio y durante la fase final del desarrollo folicular. Los folículos emergidos de una primera onda folicular, en vacas de las épocas TT tuvieron más días de crecimiento que lo observado en la época CC ($P < 0.01$). Los folículos dominantes emergidos de la segunda onda folicular, de las vacas de las épocas CT y TT, presentaron más días de crecimiento, una menor tasa de crecimiento y un mayor diámetro máximo, que lo observado en las vacas de la época CC ($P < 0.05$). Las vacas de las épocas CT y TT tuvieron un mayor diámetro máximo del segundo folículo dominante, con respecto a lo observado en vacas de la época TC y CC ($P < 0.05$). La fase de meseta del segundo folículo dominante fue menor en vacas de la época TT, que lo observado en aquellas de las épocas TC y CC ($P < 0.05$).

En las Gráficas 2 y 3 se observa que en las vacas evaluadas durante las épocas cálidas (TC y CC) hubo un mayor número de ondas foliculares, que en las épocas templadas (CT y TT) ($P < 0.05$). El efecto de TA no fue importante para afectar el NOF ($P > 0.05$). Las vacas con tres OF tuvieron un ciclo estral más largo (Gráfica 4) ($P < 0.05$). En la época cálida se presentó un mayor porcentaje de vacas que ovularon un folículo dominante emergido de una tercera onda folicular, comparado a lo que se mostró que en la EPO templada ($P < 0.05$) (Gráfica 5).

2. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE FSH

Vacas con una duración del ciclo estral menor a 21 días

El efecto de EPO no fue importante para las concentraciones de FSH ($P>0.05$) (Gráfica 6). Las vacas de tres OF mostraron una mayor concentración sérica de FSH en los primeros siete días del ciclo estro y los últimos tres días del mismo, que lo mostrado en las de dos OF ($P<0.01$) (Gráfica 7). El efecto de interacción EPO x NOF, confirmó una mayor concentración de FSH durante los primeros siete días del ciclo únicamente en las vacas de tres OF de la EPO cálida ($P<0.05$) (Gráfica 8).

Vacas con una duración del ciclo estral entre 22 y 25 días

En la Gráfica 9, se observa en vacas de EPO templada una mayor concentración sérica de FSH los tres primeros días del ciclo estral, que las de EPO cálida ($P<0.05$). Las vacas de tres OF se mostró una mayor concentración de FSH del 6° al 7° ($P<0.1$), 12° al 13°, del 16° al 21° ($P<0.01$) y 22° al 23° ($P<0.05$) día del ciclo estral, que las de dos OF (Gráfica 10).

Las vacas de tres OF de la época de evaluación cálida mostraron mayor concentración sérica de FSH en los día 0 y el 1° y del 8° al 23° día del ciclo ($P<0.05$), que lo observado en las de dos OF de la misma época ($P<0.05$). Así mismo las vacas de tres OF de época templada tuvieron una menor concentración de FSH del 12° al 19° y del 24 al 25° día del ciclo, con respecto a lo observado en las de tres OF de época cálida ($P<0.05$) (Gráfica 11).

3. NÚMERO DE FOLÍCULOS PEQUEÑOS

Vacas con una duración del ciclo estral menor a 21 días

Las vacas de la época cálida tuvieron más folículos pequeños del 4° al 5° y del 14° al 15° día del ciclo que lo observado en época templada ($P<0.05$) (Gráfica 12). En vacas de tres OF se observaron más folículos pequeños del 4° al 5° y del 14° al 15° día del ciclo estral, que lo observado en vacas de dos OF ($P<0.05$) (Gráfica 13). Las vacas de tres OF de época cálida tuvieron un mayor número de folículos

pequeños del 14° al 15° y del 20° al 21° día del ciclo estral, que lo observado en vacas de dos OF de época templada ($P < 0.05$) (Gráfica 14).

Vacas con una duración del ciclo estral entre 22 y 25 días

En vacas de época cálida el mostraron más folículos pequeños del 6° al 7°, del 12° al 13° ($P < 0.05$), del 16° al 17° ($P < 0.1$) y del 20° al 23° ($P < 0.01$) día del ciclo estral. Mientras en los tres primeros días del ciclo, las vacas de época templada tuvieron más folículos pequeños ($P < 0.05$) (Gráfica 15). La Gráfica 16 muestra en las vacas con tres OF más crecimientos de folículos pequeños del 8° al 9° ($P < 0.1$), del 12° al 13° y del 20° al 21° ($P < 0.05$) día del ciclo estral, que lo mostrado en vacas con dos OF ($P < 0.05$). Las vacas de dos OF de época cálida presentaron mayor crecimiento de folículos pequeños los días 10 al 11 y del 20 al 23 del ciclo estral, que lo observado en vacas de dos OF de época templada ($P < 0.05$).

4. NÚMERO DE FOLÍCULOS MEDIANOS

Vacas con una duración del ciclo estral menor a 21 días

En vacas de época templada tuvieron más folículos medianos del 0 al 3° ($P < 0.05$), del 6° al 7° ($P < 0.01$) y del 10° al 13° ($P < 0.1$) día del ciclo estral (Gráfica 18). Las vacas de dos y tres OF fueron similares en cuanto al número de folículos medianos a lo largo del ciclo estral ($P > 0.05$), excepto del 6° al 7° día del ciclo estral ($P < 0.01$).

Vacas con una duración del ciclo estral entre 22 y 25 días

En la Gráfica 19 se muestra en vacas de época cálida hubo más folículos medianos en los últimos cuatro días del ciclo estral ($P < 0.1$). Las vacas con tres OF presentaron más folículos medianos los primeros dos días del ciclo estral ($P < 0.05$). Sin embargo, entre el 4° y 5° día del ciclo estral las vacas de dos OF mostraron más folículos, que en las de tres OF ($P < 0.05$).

5. NÚMERO DE FOLÍCULOS GRANDES

Vacas con una duración del ciclo estral menor a 21 días

En la Gráfica 21 se observa en vacas de tres OF un mayor número de crecimientos de folículos grandes del 2º al 3º ($P>0.01$) y del 6º al 7º ($P>0.1$) día del ciclo estral.

Vacas con una duración del ciclo estral entre 22 y 25 días

En las vacas de época calida hubo más folículos grandes del 12º al 13º ($P<0.01$) y 22º al 23º ($P<0.05$) del ciclo estral ($P>0.01$). Mientras tanto, en las vacas de época templada mostraron más folículos grandes del 16º al 17º ($P<0.01$) (Gráfica 22). Las vacas con tres OF tuvieron más folículos grandes los dos primeros días del ciclo, del 4º al 5º ($P<0.05$), del 10º al 11º ($P<0.05$) y del 22º al 23º ($P<0.01$) día del ciclo estral, que lo observado en vacas de dos OF (Gráfica 23).

Las vacas de tres OF de épocas cálidas mostraron más folículos grandes a lo largo del ciclo estral, con respecto a lo encontrado en vacas de dos OF de época templada y cálida ($P<0.05$) y en vacas con tres OF de época templada ($P<0.05$) (Gráfica 24).

6. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE PROGESTERONA

Vacas con una duración del ciclo estral menor a 21 días

Las vacas de época cálida tuvieron menores concentraciones plasmáticas de P_4 entre el 8º y 9º día del ciclo estral ($P<0.01$) (Gráfica 25). Las vacas de una época previa cálida tuvieron menor concentración de P_4 del 14 al 17º día del ciclo estral ($P<0.1$) (Gráfica 26). El NOF no afectó las concentraciones séricas de P_4 ($P>0.05$) (Gráfica 27). Las vacas de época templada (TT) tuvieron mayor concentración de P_4 del 6º al 9º día del ciclo ($P<0.05$), en comparación con las de época cálida ($P<0.05$). Entre el 14º y 17º día del ciclo las concentraciones de P_4 de las vacas TT fueron superiores a las observadas en vacas del grupo CT ($P<0.05$) (Gráfica 28).

Vacas con una duración del ciclo estral entre 22 y 25 días

En las vacas de época cálida las concentraciones de P_4 fueron menores del 8° al 9° ($P<0.1$) y del 16° al 21° día del ciclo estral ($P<0.05$), que lo mostrado en vacas de época templada (Gráfica 29). Las vacas mantenidas en condiciones cálidas durante la época previa al estudio tuvieron una menor concentración de P_4 del 20° al 21° día del ciclo estral, que lo observado en vacas con una época templada previa ($P<0.01$) (Gráfica 30). Las vacas de tres ondas OF mostraron mayor concentración de P_4 entre el 14° y 15° ($P<0.05$) y del 20° al 23° día del ciclo estral, que lo observado en vacas de dos OF ($P<0.01$) (Gráfica 31).

En la Gráfica 32 se muestra que en las vacas del grupo TT una mayor concentración sérica de P_4 del 16° al 17° ($P<0.05$) y del 18° al 21° ($P<0.01$) día del ciclo estral, que lo observado en vacas del grupo CC y TC ($P<0.05$). Así mismo, las vacas de las épocas CT y TC tuvieron una mayor concentración de P_4 en los días 20 y 21 del ciclo estral, que las vacas de la época CC ($P<0.01$). Las vacas de la época TC tuvieron una mayor concentración de P_4 , en los días 12 y 13 del ciclo, que las observadas en las vacas de la época CC ($P<0.05$).

7. CONCENTRACIONES SÉRICAS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO PARECIDO A LA INSULINA TIPO I (IGF-I)

En la Gráfica 33 se puede observar que las vacas de tres OF tuvieron mayor concentración sérica de IGF-I del 8° al 10° día del ciclo estral, que lo observado en vacas de dos OF ($P<0.05$). Las concentraciones de IGF-I en las vacas de época templada fueron mayores en los días 6 ($P<0.01$), 8 y 10 ($P<0.05$) del ciclo estral y en el día - 5, antes de la manifestación del nuevo estro ($P<0.01$) (Gráfica 34). Vacas de dos y tres OF de la época cálida y en vacas de dos OF de la época templada tuvieron una menor concentración de IGF-I en los días 6, 8 y 10 del ciclo estral y en los días -7, -5, -3 y -1 con respecto a lo observado en vacas con tres OF de época templada ($P<0.05$) (Gráfica 35).

DISCUSIÓN

1.1. Efecto del estrés calórico sobre el desarrollo y dominancia folicular

El hecho de que la mayoría de las vacas que mostraron tres ondas foliculares durante el ciclo estral (81 %, 14/22) se hayan concentrado en las épocas de estrés calórico, está indicando que se altera el funcionamiento de los folículos emergidos de la primera y segunda ondas de crecimiento folicular, observándose una pérdida anticipada de su dominancia. Esto mismo se ha observado en vacas Holstein expuestas a estrés calórico en cámaras climáticas durante la primera (Badinga et al., 1993; Wolfenson et al., 1995) y la segunda mitad del ciclo estral (Trough et al., 1998; Wilson et al., 1998).

Las vacas que ovularon un folículo emergido de una segunda onda de crecimiento folicular, en condiciones de estrés calórico, tuvieron más días de crecimiento, característica que ha sido asociada a la ovulación de folículos de mayor edad y a una menor competencia del ovocito para ser fertilizado o para desarrollar un embrión vigoroso (Badinga et al., 1993; Wolfenson et al., 1995; Trough et al., 1998; Wilson et al., 1998; Roth et al., 2000). Por lo que probablemente el estrés calórico está afectando el desarrollo y calidad del folículo ovulatorio y el ovocito, tanto de los emergidos de una segunda como de una tercera onda de crecimiento folicular, independientemente de la duración de la dominancia.

Cuando se analizó el efecto de interacción, de las condiciones de ausencia o presencia de estrés calórico antes y durante el período de evaluación, se observó un efecto negativo del estrés calórico sobre la dominancia de los folículos emergidos de la primera y segunda onda folicular; lo que permite suponer un posible efecto retrasado del estrés calórico, como fue informado por Roth et al. (2000), lo que puede comprometer las funciones de las células de la teca y de la granulosa, y por ende la calidad del folículo y del ovocito (Wolfenson et al., 1997; Roth et al. 2000; Guseloglu et al., 2001), que en conjunto, juegan un papel importante sobre la fertilidad de vacas lecheras.

Lo anterior se confirma cuando tratamientos repetidos con factor liberador de las gonadotropinas y la aspiración frecuente de los folículos mayores de 5 mm (Gozeloglu et al., 2001) y de 3 a 7 mm (Roth et al., 2001 b) durante varios ciclos estrales permite el reclutamiento de folículos de mejor calidad e incrementa el porcentaje de desarrollo embrionari hasta el estadio de blastocisto. No se sabe el mecanismo exacto por el cual el estrés calórico puede afectar a los folículos y a los ovocitos, pero se ha descrito, que se produce un daño en la comunicación intercelular entre las células de la granulosa, del cúmulo y del ovocito (Roth et al., 2001 a; Al-Katananni et al., 2002), se afecta la competencia del ovocito para ser fertilizado (Sartori et al., 2002; Al-Katananni et al., 2002), se altera el contenido IGF-I del fluido folicular (Ambrose et al., 1999), se reduce la viabilidad de las células de la granulosa y de las de la teca interna y se producen cambios en la esteroidogénesis (Wolfenson et al., 1993; Wolfenson et al., 1997; Roth et al., 2001a). Esto implica, que algunos folículos pudieron haber sido afectados aún antes de su reclutamiento, lo que se traduce en la prolongación de los efectos del estrés calórico sobre la fertilidad, aún en los meses con condiciones climáticas más confortables.

En las vacas que se mantuvieron en estrés calórico, independientemente del número de ondas foliculares, se observó una menor concentración de los valores de IGF-I, independientemente del número de ondas foliculares. Esto refuerza la hipótesis, que la baja fertilidad esta relacionada con problemas en la maduración folicular y del ovocito, ya que se ha demostrado que una disminución de las concentraciones séricas de IGF-I, insulina y glucosa afectan negativamente el desarrollo y la función de las células foliculares (Lucy, 2000; Spicer et al., 2000; Driancourt, 2001).

Un menor nivel de IGF-I reduce la sensibilidad de las células foliculares a las gonadotropinas (Chase et al., 1998; Armstrong et al., 2001), la capacidad esteroidogénica, la división de las células de la granulosa (Hammond et al., 1988); y la tasa de crecimiento de los folículos (Beam y Butler, 1998; Chase et al., 1998;

Bossis et al., 2000); además de reducir las concentraciones circulantes de P_4 (Chase et al., 1998; Yung et al., 1996), la síntesis de inhibina y la probabilidad de ovulación de los folículos dominantes (Staples et al., 1990; Monget y Manniaux, 1995; Roche, 1996; Beam y Butler, 1997; Lucy, 2000; Driancourt, 2001; Webb et al., 2003).

De hecho, una de las estrategias descritas durante el posparto temprano ha sido incrementar la densidad energética de la dieta para incrementar la concentración y la frecuencia de los pulsos de hormona luteinizante (LH), insulina e IGF-I, y por ende aumente la respuesta del folículo a la LH, se incremente la esteroidogénesis, y la probabilidad de ovulación (Staples et al., 1990; Beam y Butler, 1997; Beam y Butler, 1998). Es claro entonces, la existencia de un papel importante de la hormona de crecimiento y del IGF-I sobre la función ovárica, que podrían estar inmiscuidas en un problema de anovulación de las vacas durante el verano. Esto último, puede estar relacionado incluso con el papel que pudieran estar jugando las concentraciones reducidas de las hormonas tiroideas durante el verano, que pueden interferir con la secreción de la hormona luteinizante o con la respuesta ovárica a esa hormona, y con ello propiciar una menor tasa de ovulación, lo cual ha sido demostrado en vacas superovuladas con hipotiroidismo inducido (Bernal et al., 1999).

1.2. Efecto del estrés calórico y el número de ondas foliculares sobre las características de desarrollo folicular y las concentraciones séricas de hormona folículo estimulante (FSH)

Las vacas con tres OF de las épocas cálidas mostraron una mayor concentración de FSH en varios días del ciclo estral, que lo observado en vacas con dos OF de épocas templadas. También es de resaltar el hecho, que el 70.0 % (7/10) de las vacas con tres OF (7/10), se presentaron cuando las condiciones de estrés calórico estaban presentes, durante el período de estudio. Esto demuestra una pérdida de la dominancia folicular en vacas con tres OF de las épocas con estrés calórico, siendo más acentuado este efecto en las vacas con un ciclo estral más

largo. Esto último era esperado, ya que 87 % (14/17) de las vacas con tres OF presentaron un ciclo estral más largo estuvieron dentro del grupo de vacas con un ciclo estral entre 22 y 25 días. La pérdida de la dominancia, en otros estudios se ha relacionado con una reducción de la concentración sérica de estradiol (Wolfenson et al., 1995) e inhibina y un incremento de la concentración sérica de FSH en los días 8 al 13 del ciclo estral (Roth et al., 2000), que se ha acompañado con una emergencia temprana del segundo folículo dominante preovulatorio (Wolfenson et al., 1995; Roth et al., 2000).

Los mayores crecimiento de folículos pequeños y grandes en vacas de épocas cálidas y con tres OF durante el ciclo estral, cuyo efecto fue más acentuado en vacas con un ciclo estral más largo. Estos resultados, apoyan el efecto del estrés calórico sobre la pérdida de la dominancia folicular, que permite la emergencia de nuevas oleadas de crecimiento folicular y el desarrollo de los folículos medianos hacia tamaños mayores o preovulatorios. Datos que coinciden con lo informado en otros estudios (Wolfenson et al., 1995; Roth et al., 2000) quienes han encontrado una relación de la emergencia temprana del segundo folículo dominante preovulatorio (Wolfenson et al., 1995; Roth et al., 2000) con incremento del número de folículos mayores emergidos de la primera onda folicular (Wolfenson et al., 1995).

1.3. Efecto del estrés calórico sobre la función lútea

El estrés calórico deprimió la concentración sérica de P_4 durante la fase lútea, que coincide con lo observado en otro estudio donde se observó una menor concentración sérica de los niveles de P_4 del 6 al 18º día del ciclo estral y de su pico durante la fase lútea, que lo observado en vacas en los meses de invierno (Rosenberg et al., 1982; Howell et. al., 1994).

Cuando se analizó la interacción de la ausencia o presencia de estrés calórico antes y durante el período final del desarrollo folicular, se observó una mayor depresión de la concentración de P_4 en las épocas cálidas, comparados con las

concentraciones altas de P_4 de las vacas mantenidas en épocas templadas. Esto demuestra, un efecto negativo del estrés calórico sobre la función del cuerpo lúteo desde antes de su formación y durante su desarrollo. Este efecto aparente de acarreo del calor se ha informado en un estudio realizado en Israel, donde en vacas expuestas a estrés calórico del verano durante dos se observó un menor número, viabilidad y producción de progesterona de las células lúteas incubadas con LH. Lo que fue atribuido a una menor capacidad de síntesis de progesterona de las células lúteas del verano por un efecto de acarreo del calor, lo que pudiera reducir la preñez en el verano (Wolfenson et al. 1993).

Las concentraciones circulantes altas de P_4 están relacionadas positivamente con el reconocimiento materno de la preñez y se sugiere que a concentraciones altas durante el período crítico son importantes para el mantenimiento de la gestación (Biggers et al., 1987). Es por esto, que las bajas concentraciones de P_4 pudieran explicar en parte la baja fertilidad asociada en vacas lecheras, ya que es uno de los principales reguladores de la síntesis del interferón tau por parte del embrión, para que se de el reconocimiento materno de la preñez (Mann et al., 1999).

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

El estrés calórico reduce la dominancia folicular, incrementa el número de ondas foliculares durante el ciclo estral, reducen los días de crecimiento y el diámetro máximo de los folículos dominantes. El porcentaje de vacas que ovulan de un tercer folículo dominante es mayor en la época cálida.

Las épocas cálidas no tuvieron un efecto sobre las concentraciones de FSH. Sin embargo, las vacas de tres ondas foliculares tuvieron una mayor concentración de FSH durante el ciclo estral y mayores crecimientos de folículos menores de 5 mm y mayores de 10 mm durante el ciclo estral. Las concentraciones de IGF-I fueron menores en vacas con dos y tres ondas foliculares de épocas cálidas. Todos estos eventos son indicativos de una pérdida de la dominancia folicular. Por otra parte,

el estrés calórico afecta negativamente las concentraciones de progesterona, con lo que existe un posible efecto de acarreo del calor.

La pérdida de la dominancia observada por efecto del estrés calórico, probablemente indique que el desarrollo y calidad del folículo ovulatorio y el ovocito están siendo comprometidos, lo que necesariamente se relaciona con una menor fertilidad y con una menor viabilidad del desarrollo embrionario temprano.

Otro aspecto a considerar en condiciones de estrés calórico es que se estén incrementando los problemas de anovulación, donde al parecer juegan un papel importante los factores de crecimiento y las hormonas tiroideas. Una menor función lútea en los meses cálidos, y los posibles efectos de acarreo del estrés calórico, sobre la viabilidad y función de las células lúteas, es otro punto a considerar para elaborar estrategias que permitan la sobrevivencia embrionaria.

CUADRO 6. Medias mínimo cuadráticas, por efecto de las condiciones climáticas durante el estudio, de la emergencia (d), días de crecimiento (d) y la tasa de crecimiento (mm/día) de los folículos dominantes (FD) de la primera a la tercera emergencia (1,2) durante el ciclo estral en las diferentes épocas de estudio en vacas Holstein lactantes

FD	Variables	N	Templada - D	n	Cálida - D
1	Emergencia, d	24	1.39 ± 0.32 a	35	1.27 ± 0.25 a
	Días Crecim, d	24	7.64 ± 0.60 a	35	5.94 ± 0.45 c
	Tasa Crecim, mm/día	24	1.75 ± 0.17 a	35	1.91 ± 0.13 a
	Día Diam. Max, d	24	8.73 ± 0.66 a	35	7.27 ± 0.50 d
	Díam. máximo, mm	24	17.67 ± 0.62 a	35	17.42 ± 0.47 a
	Fase de meseta, d	24	1.07 ± 0.54 a	35	2.51 ± 0.41 c
2	Emergencia, d	25	9.17 ± 0.91 a	35	10.01 ± 0.69 a
	Días Crecim, d	25	8.95 ± 0.83 a	35	7.09 ± 0.63 d
	Tasa Crecim, mm/día	25	1.41 ± 0.18 a	35	1.67 ± 0.14 a
	Día Diam. Max, d	25	18.12 ± 0.82 a	35	17.10 ± 0.62 a
	Díam. máximo, mm	25	18.18 ± 0.55 a	35	16.36 ± 0.42 b
	Fase de meseta, d	25	0.98 ± 0.37 a	35	2.24 ± 0.28 b

a, b / Distintas literales por renglón indican diferencia (P<0.01).

a, c / Distintas literales por renglón indican diferencia (P<0.05).

a, d / Distintas literales por renglón indican diferencia (P<0.1).

CUADRO 7. Medias mínimo cuadráticas de la emergencia (d), días de crecimiento (d) y tasa de crecimiento (mm/día) de los folículos dominantes emergidos de cada onda folicular (1,2) durante el ciclo estral para el efecto de dos (dos OF) y tres (tres OF) foliculares en vacas Holstein lactantes

FD	Variables	n	Dos OF	N	Tres OF
1	Emergencia, d	37	1.45 ± 0.24 a	22	1.21 ± 0.32 a
	Días Crecim, d	37	7.71 ± 0.43 a	22	5.87 ± 0.59 b
	Tasa Crecim, mm/día	37	1.82 ± 0.12 a	22	1.90 ± 0.17 a
	Día Diam. Max, d	37	9.01 ± 0.48 a	22	6.99 ± 0.65 b
	Díam. máximo, mm	37	19.06 ± 0.45 a	22	16.04 ± 0.61 b
	Fase de meseta, d	37	2.07 ± 0.39 a	22	1.51 ± 0.54 a
2	Emergencia, d	38	12.09 ± 0.67 a	22	7.09 ± 0.91 b
	Días Crecim, d	38	8.01 ± 0.61 a	22	8.03 ± 0.83 a
	Tasa Crecim, mm/día	38	1.59 ± 0.13 a	22	1.49 ± 0.18 a
	Día Diam. Max, d	38	20.10 ± 0.60 a	22	15.13 ± 0.82 b
	Díam. máximo, mm	38	17.27 ± 0.40 a	22	17.26 ± 0.55 a
	Fase de meseta, d	38	1.71 ± 0.27 a	22	1.50 ± 0.37 a

a,a / (P>0.05).

a,b / Distintas literales por renglón indican diferencia (P<0.01).

CUADRO 8. Medias mínimo cuadráticas de la emergencia (d), días de crecimiento (d) y la tasa de crecimiento (mm/día) de los folículos dominantes (FD) de la primera a la tercera emergencia (1,2,3) durante el ciclo estral por efecto de interacción de las condiciones climáticas antes y durante el estudio en vacas Holstein lactantes

FD	Parámetros	E P O C A S			
		C - T (n = 13)	T - T (n = 12)	T - C (n = 16)	C - C (n = 19)
1	Emergencia, d	1.03 ± 0.45 a	1.74 ± 0.43 a	1.49 ± 0.36 a	1.05 ± 0.45 a
	Días de Crec. D	7.39 ± 0.80 cd	7.89 ± 0.81 a	6.11 ± 0.65 acd	5.77 ± 0.61 c
	Tasa de Crec., mm/día	1.65 ± 0.23 a	1.84 ± 0.24 a	1.76 ± 0.19 a	2.19 ± 0.18 d
	Día Diam. Max, d	8.36 ± 0.89 ac	9.09 ± 0.90 a	7.66 ± 0.72 ac	6.88 ± 0.67 c
	Diam. Máximo, mm	17.5 ± 0.84 a	17.8 ± 0.85 a	17.2 ± 0.67 a	17.6 ± 0.63 a
	Fase meseta, d	1.16 ± 0.73 a	0.98 ± 0.74 a	1.87 ± 0.59 ab	3.15 ± 0.55 b
2	Emergencia, d	9.68 ± 1.25 a	8.65 ± 1.21 a	9.05 ± 1.00 a	10.96 ± 0.94 a
	Días de Crec. D	8.57 ± 1.14 a	9.32 ± 1.11 a	7.99 ± 0.92 ac	6.19 ± 0.86 c
	Tasa de Crec., mm/día	1.15 ± 0.25 a	1.67 ± 0.24 a	1.52 ± 0.20 a	1.81 ± 0.18 c
	Día Diam. Max, d	18.2 ± 1.12 a	18.0 ± 1.09 a	17.0 ± 0.90 a	17.1 ± 0.84 a
	Diam. Máximo, mm	18.3 ± 0.75 b	18.0 ± 0.73 ab	16.4 ± 0.60 c	16.3 ± 0.57 c
	Fase meseta, d	0.97 ± 0.51 ad	0.98 ± 0.49 a	2.46 ± 0.41 c	2.02 ± 0.38 dc
3	Emergencia, d	19.7 ± 3.2	11.2 ± 2.8	15.5 ± 1.4	18.1 ± 1.3
	Días de Crec. D	3.9 ± 1.9	8.6 ± 1.6	7.5 ± 0.8	5.6 ± 0.7
	Tasa de Crec., mm/día	2.3 ± 0.5	1.3 ± 0.4	1.8 ± 0.2	2.0 ± 0.2
	Día Diam. Max, d	23.5 ± 3.0	18.4 ± 2.3	22.9 ± 1.3	23.6 ± 1.2
	Diam. Máximo, mm	16.4 ± 1.9	18.2 ± 1.5	16.9 ± 0.8	16.3 ± 0.8

N obs para FD3: Temp - Temp = 2, Temp - Cal = 8, Cal - Temp = 2, Cal - Cal = 10.

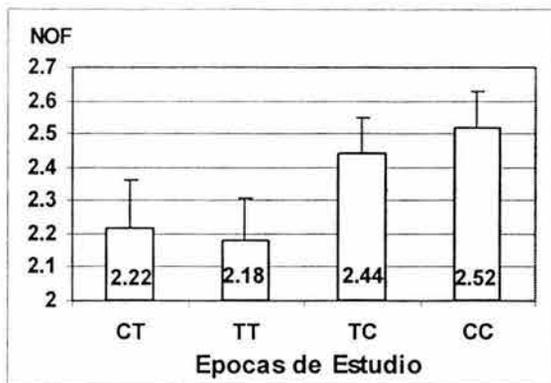
a,b / Distintas literales por renglón indican diferencia (P<0.01)

a,c / b, c / Distintas literales por renglón indican diferencia (P<0.05)

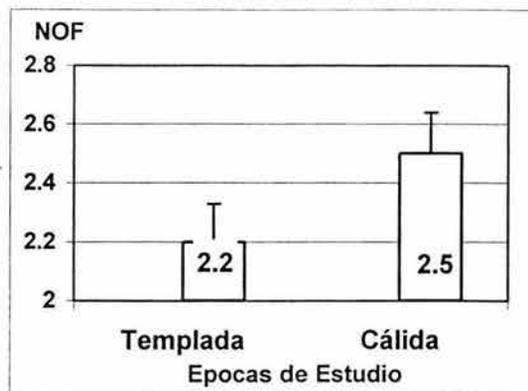
a,d / Distintas literales por renglón indican diferencia (P<0.1)

GRÁFICA 2 y 3. Número de ondas foliculares por época de estudio: cálida – templada (CT), templada – templada (TT), Templada – Cálida (TC) y Cálida – Cálida (CC) en vacas Holstein lactantes de Aguascalientes

GRÁFICA 2



GRÁFICA 3

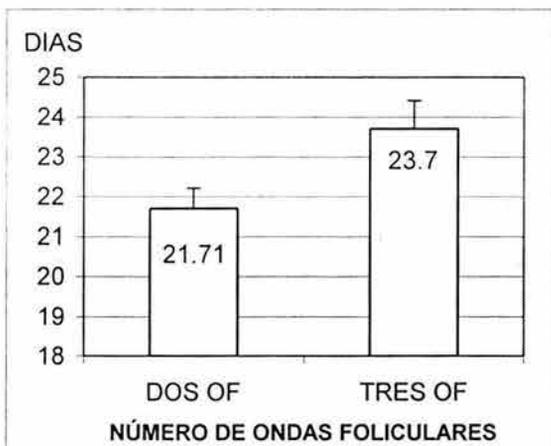


TT vs CC ($P < 0.05$)
 TT vs TC ($P < 0.12$)
 CT vs CC ($P < 0.13$)

TC y CC vs CT y TT ($P < 0.05$)

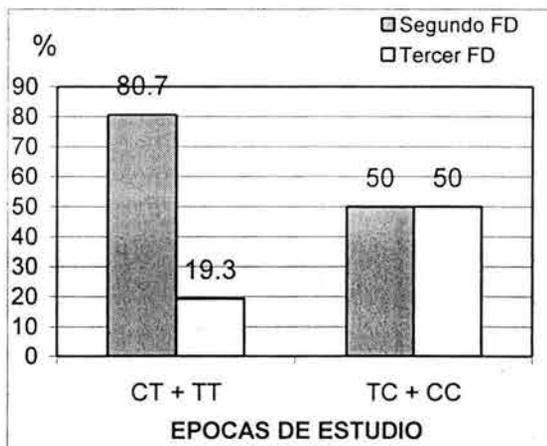
GRÁFICA 4 y 5. Intervalo entre estro con dos y tres ondas foliculares durante un ciclo estral, y tasa de ovulación del folículo dominante (FD) de acuerdo a la época de estudio (templada vs cálida) en vacas Holstein lactantes del estado de Aguascalientes

GRÁFICA 4



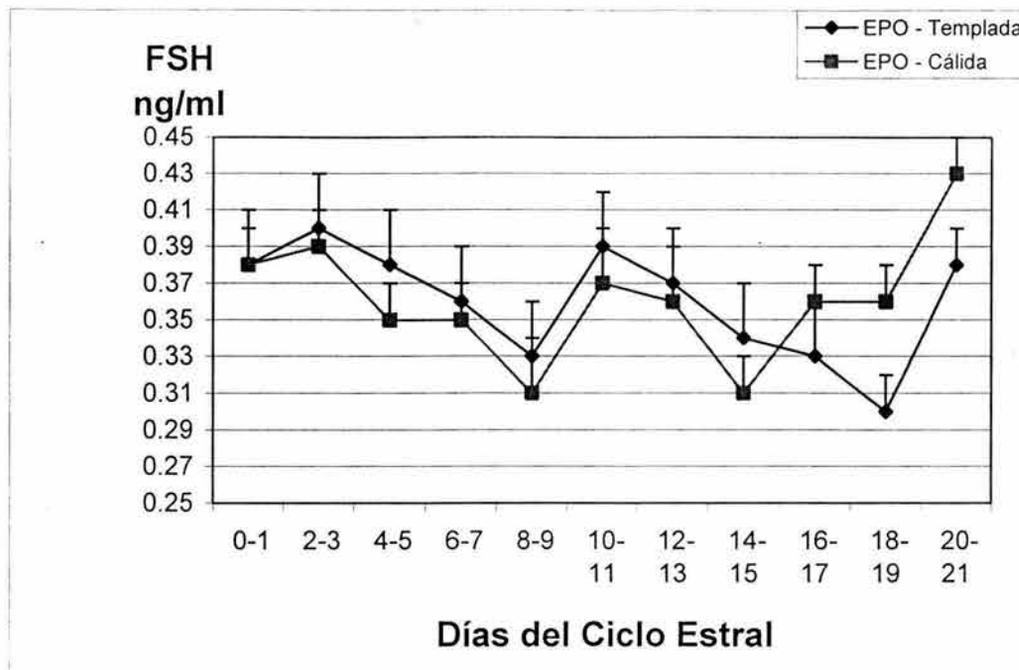
Dos OF vs tres OF ($P < 0.05$)

GRÁFICA 5

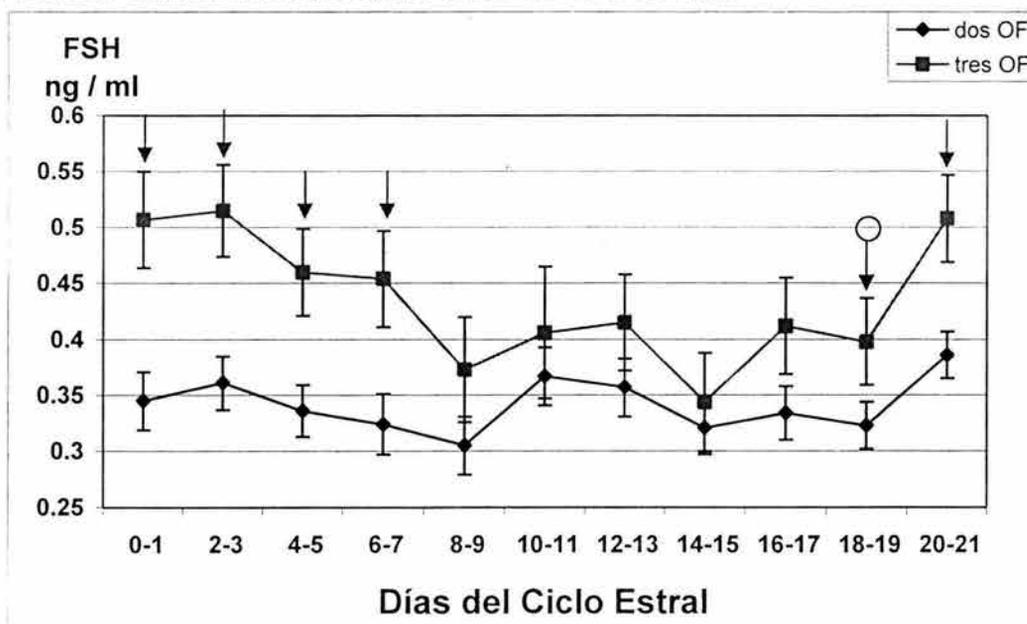


CT + TT vs TC + CC ($P < 0.05$)

GRÁFICA 6. Concentraciones séricas de la hormona folículo estimulante (FSH) para el efecto de época durante el período de estudio (EPO), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

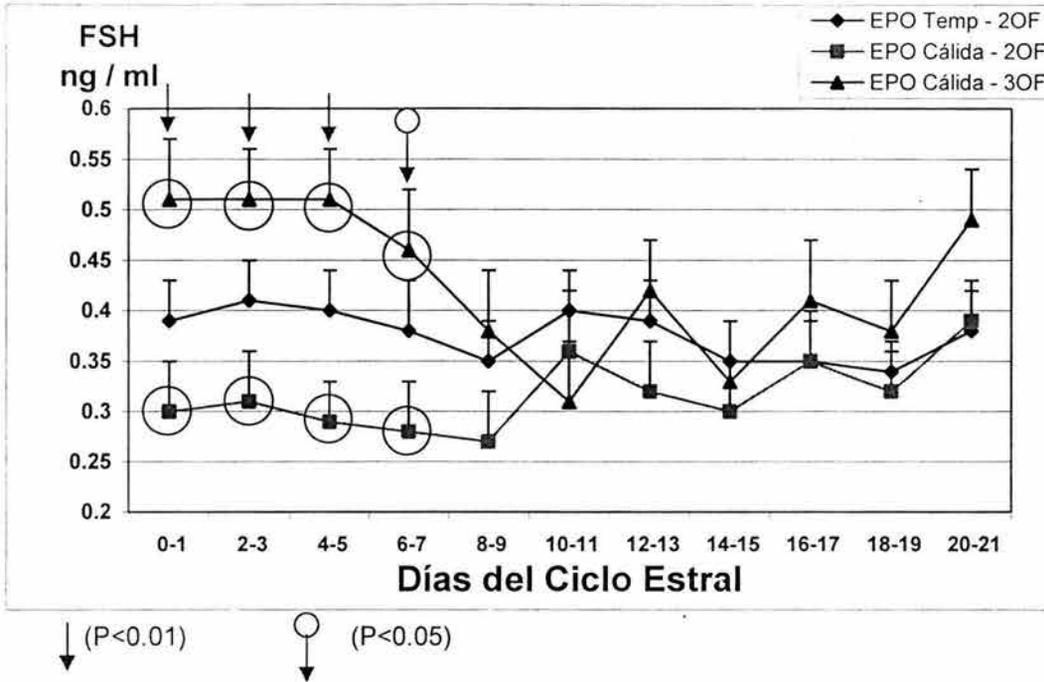


GRÁFICA 7. Concentraciones séricas de la hormona folículo estimulante (FSH) para el efecto de número de ondas foliculares, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

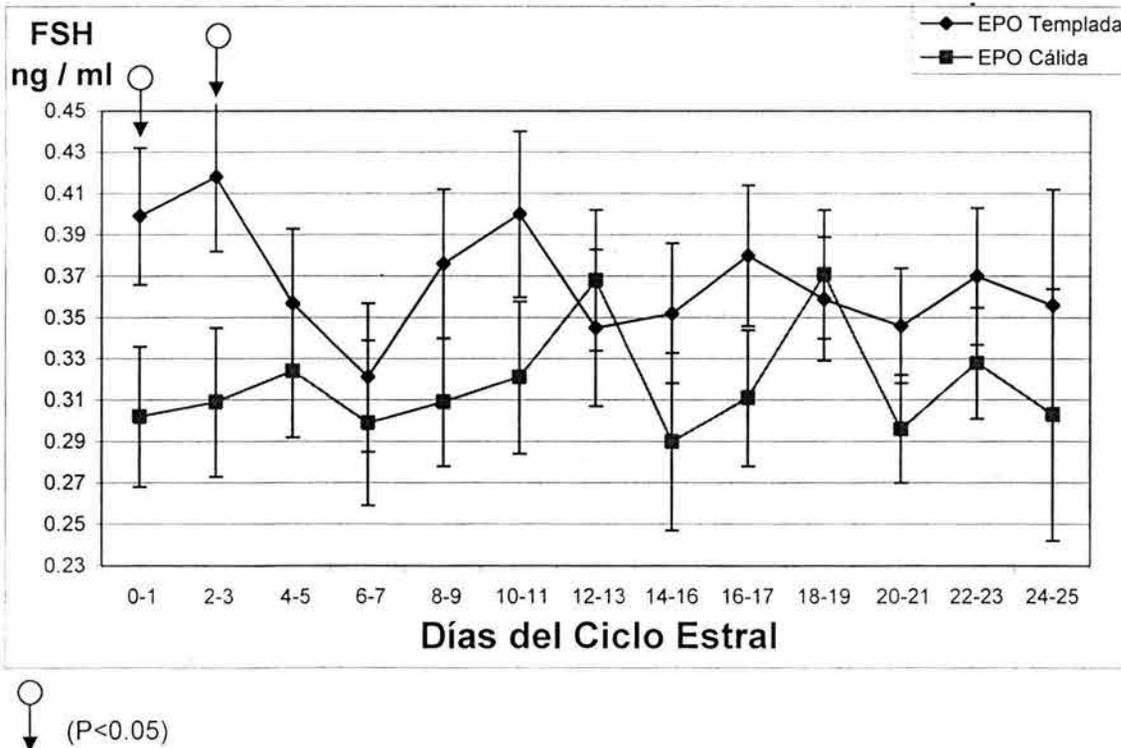


○ (P<0.05) ↓ (P<0.01)

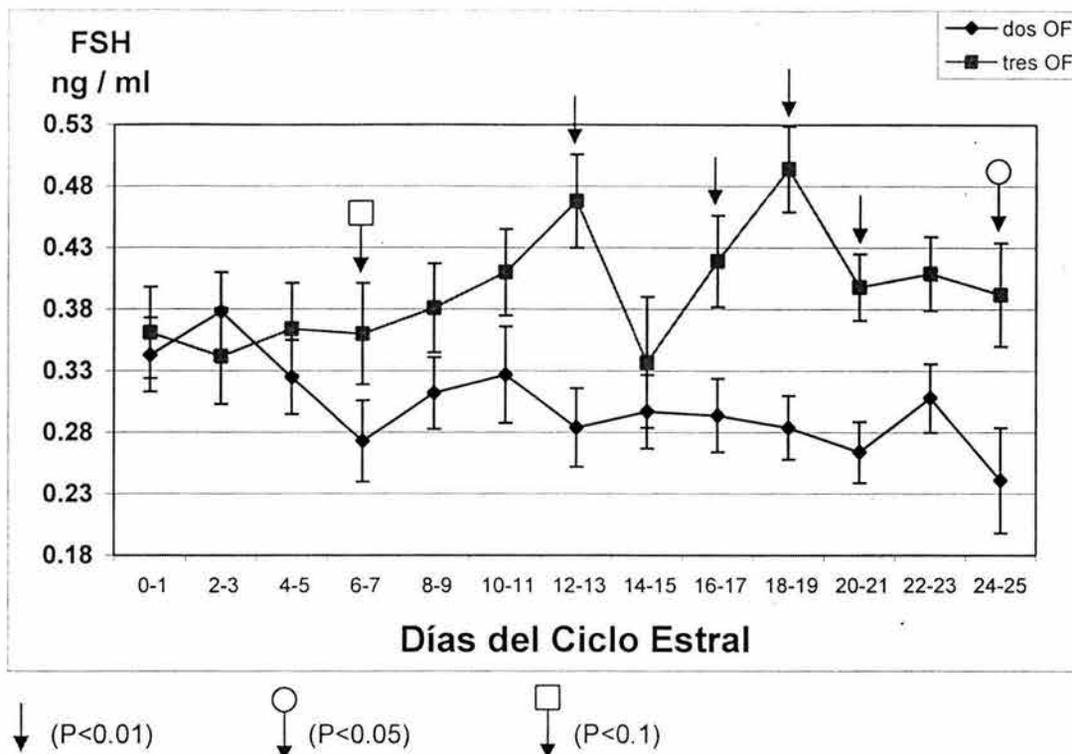
GRÁFICA 8. Concentraciones séricas de la hormona folículo estimulante (FSH) , a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante el período de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días



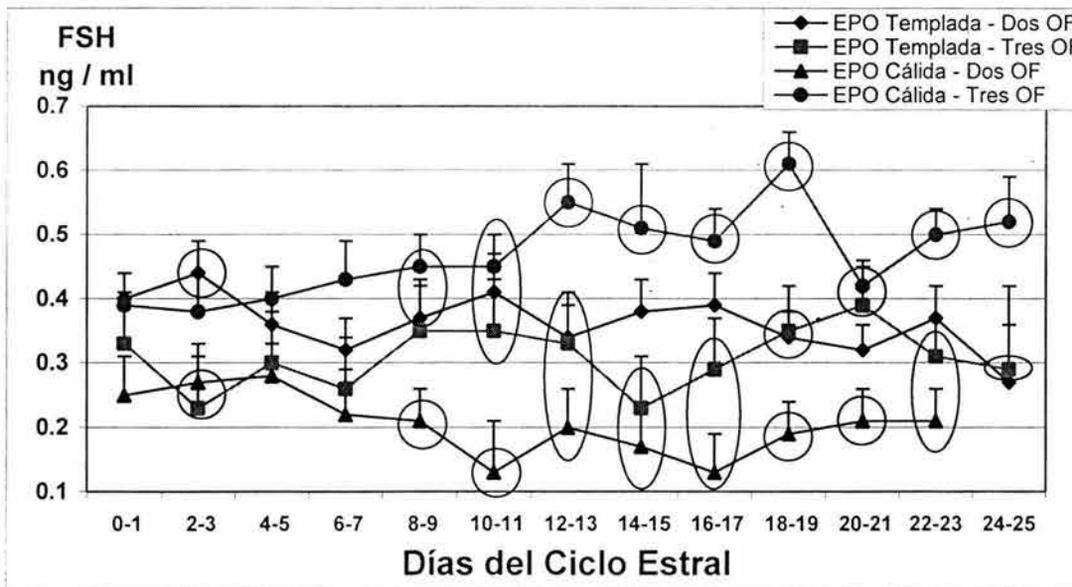
GRÁFICA 9. Concentración sérica de la hormona folículo estimulante (FSH) para el efecto de la época (EPO) durante el período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



GRÁFICA 10. Concentración sérica de la hormona folículo estimulante (FSH) para el efecto del número de ondas foliculares, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

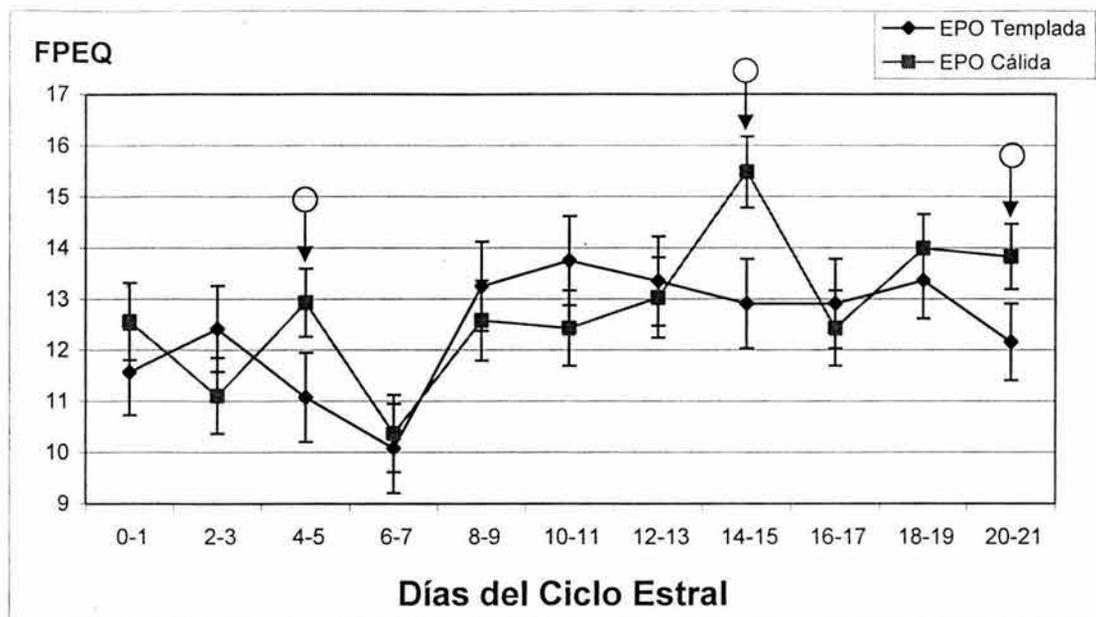


GRÁFICA 11. Concentraciones de FSH, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante el período de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas con intervalo entre celos de 22 a 25 días



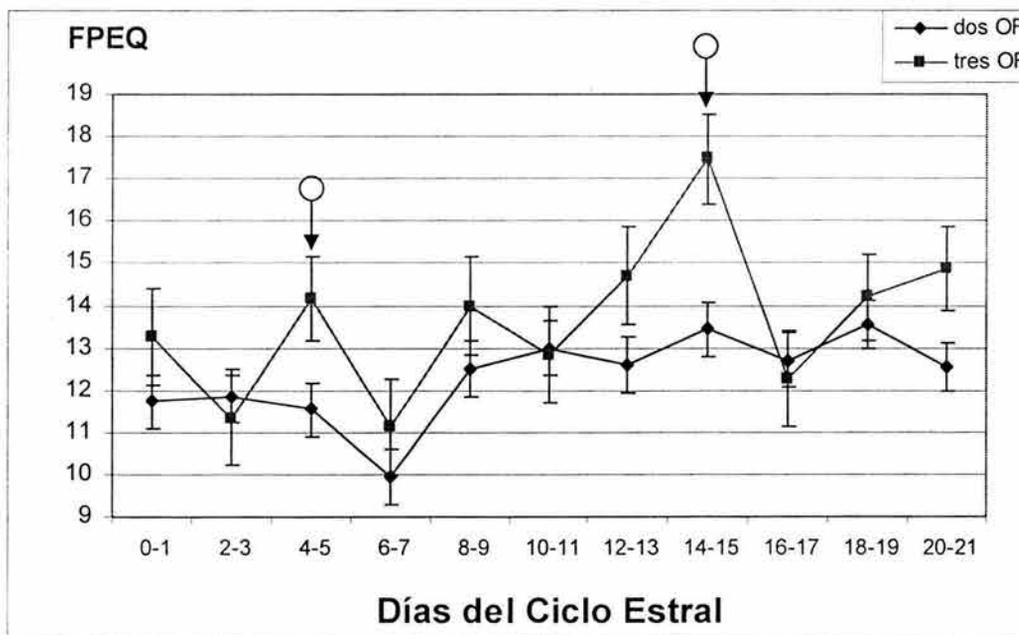
Valores circulados entre ellos indican diferencia, dentro de los mismos días del ciclo estral, Indican diferencia significativa (P<0.05).

GRÁFICA 12. Número de folículos menores de 5 mm (FPEQ) para el efecto de época (EPO) durante el estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días



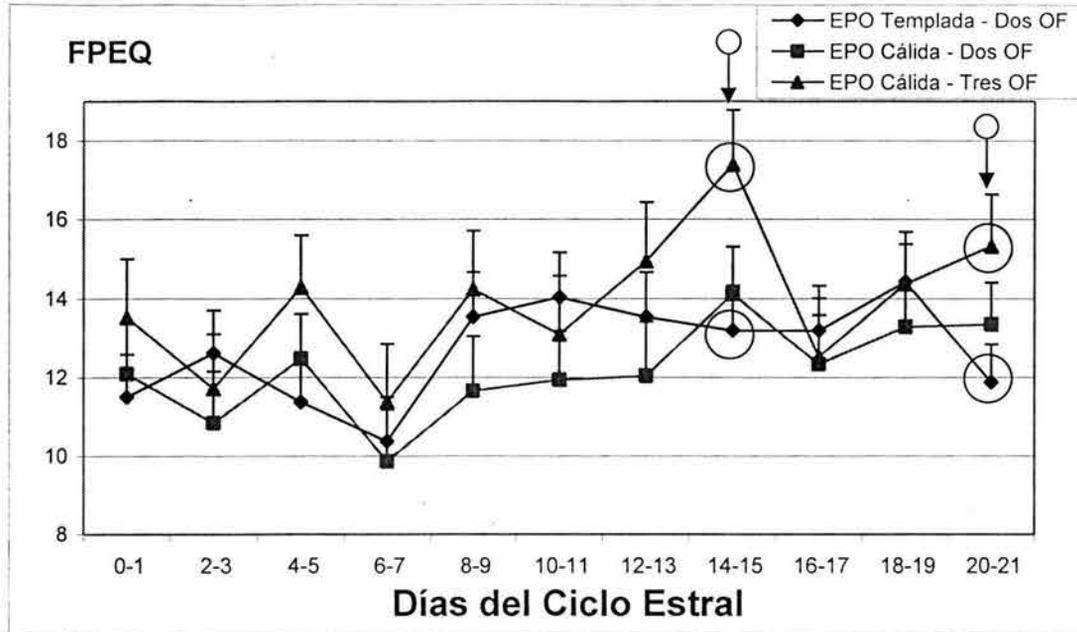
○ (P<0.05)

GRÁFICA 13. Número de folículos menores de 5 mm (FPEQ) para el efecto de número de ondas foliculares, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días



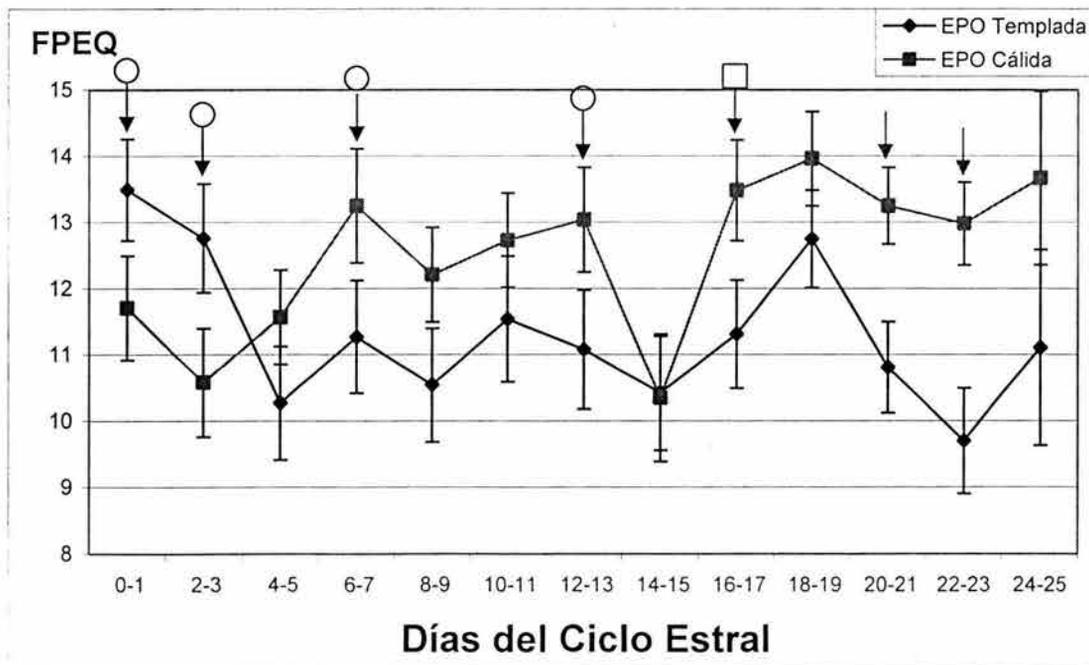
○ (P<0.05)

GRÁFICA 14. Número de folículos pequeños (FPEQ), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la fase de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días



○ (P<0.05)

GRÁFICA 15. Número de folículos pequeños (FPEQ) para el efecto de la época durante el período de estudio (EPO), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

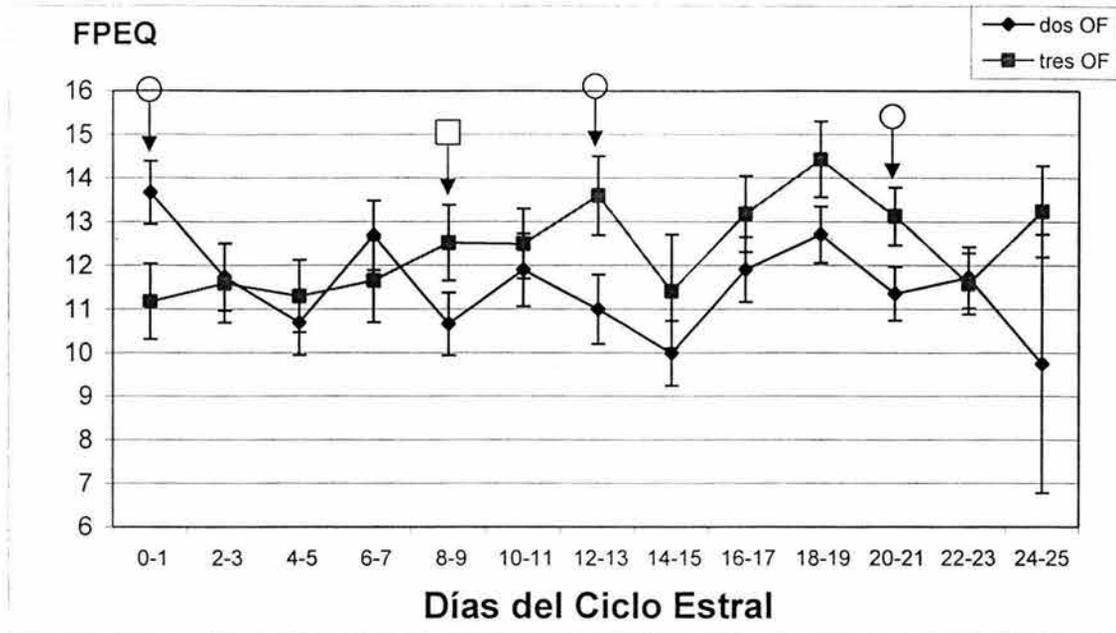


↓ (P<0.01)

○ (P<0.05)

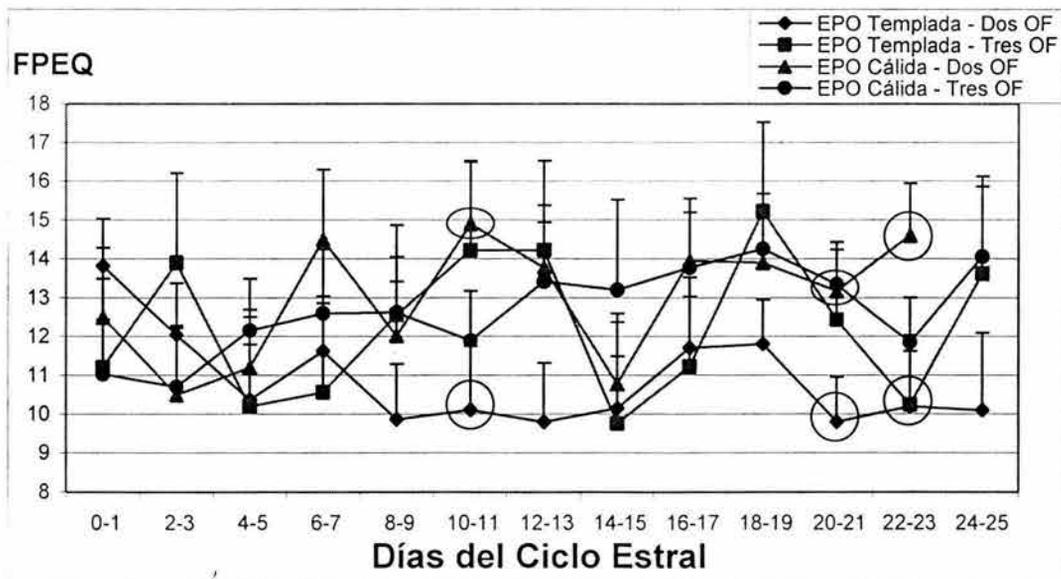
□ (P<0.1)

GRÁFICA 16. Número de folículos pequeños (FPEQ) para el efecto del número de ondas foliculares a lo largo del ciclo estral en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



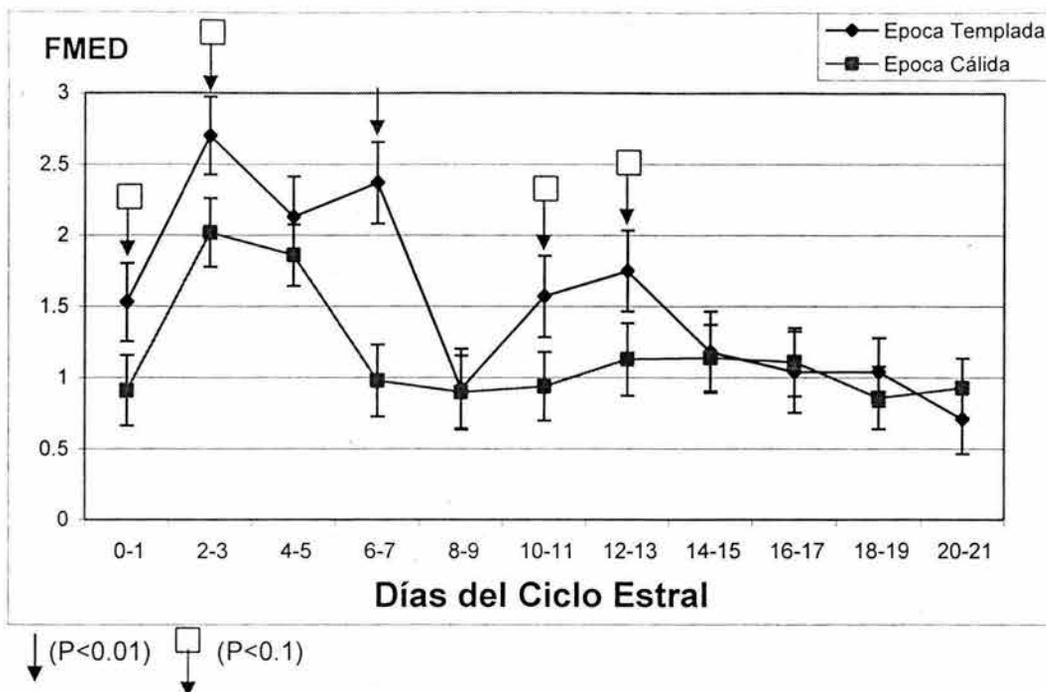
○ (P<0.05) □ (P<0.1)

GRÁFICA 17. Número de folículos pequeños (FPEQ), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la época de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

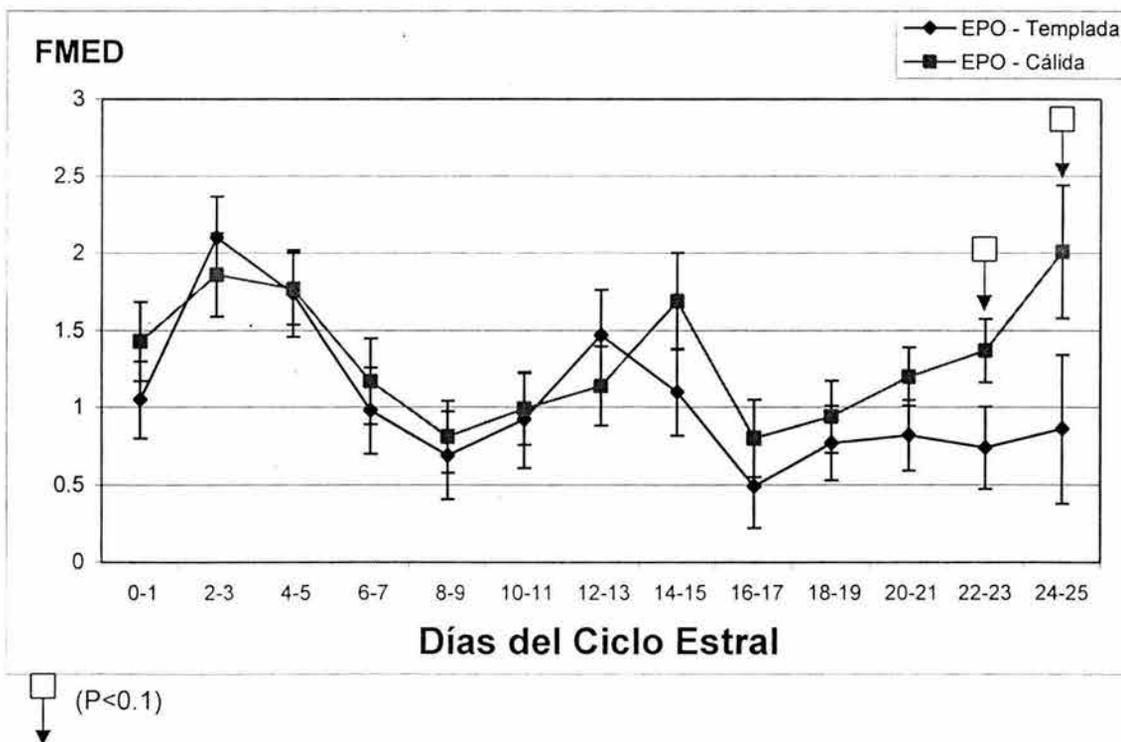


Valores circulados, en los mismos días del ciclo estral, indican diferencia significativa (P<0.05).

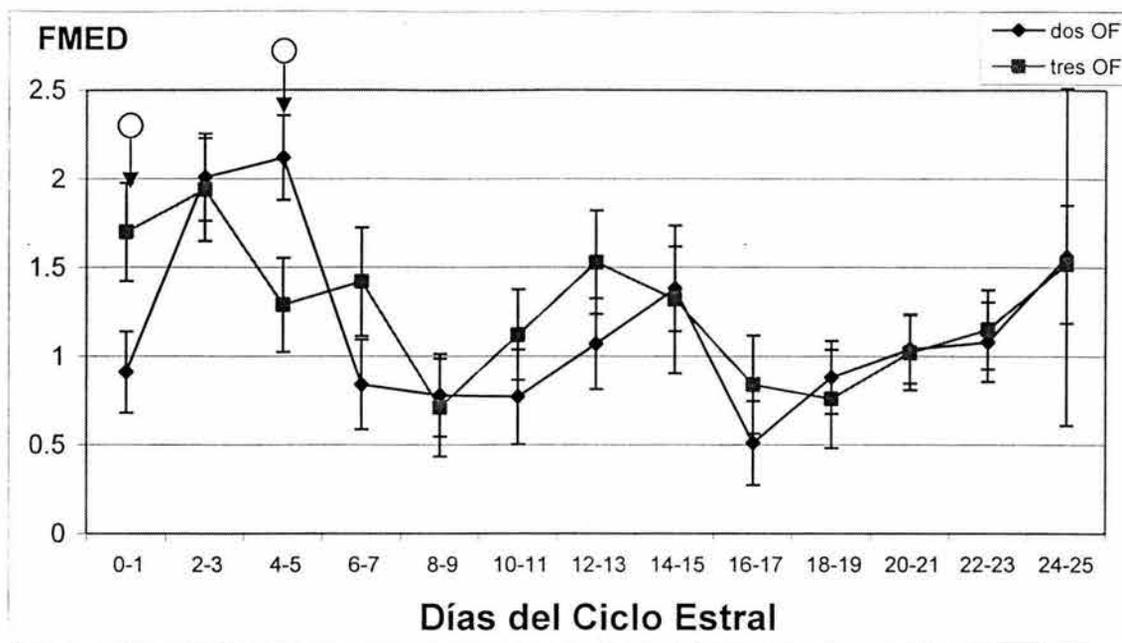
GRÁFICA 18. Número de folículos medianos (FMED) para el efecto de época durante el período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días



GRÁFICA 19. Número de folículos medianos (FMED) para el efecto de la época durante el período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

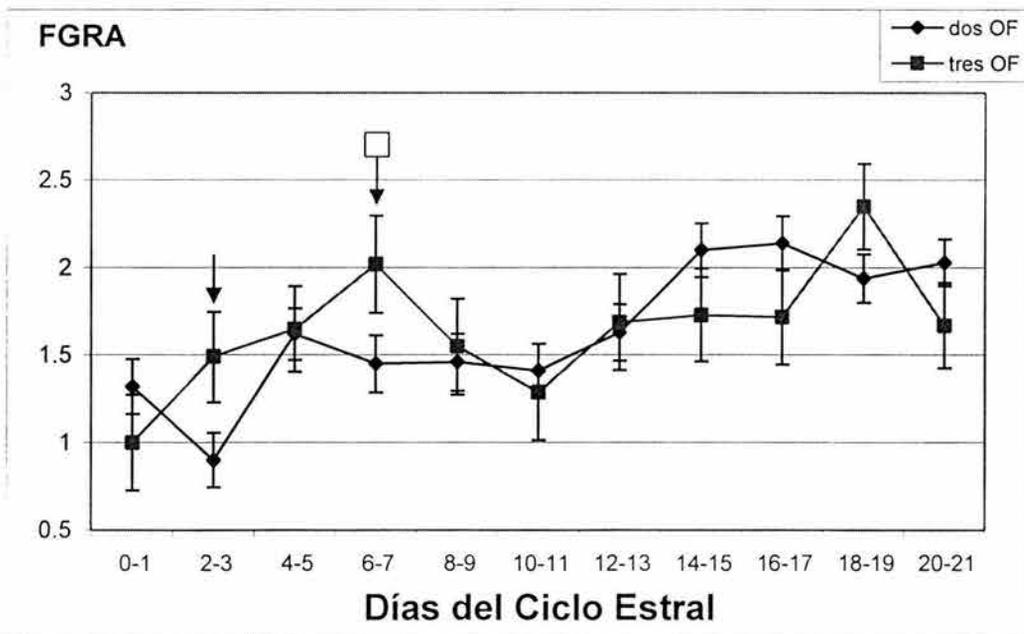


GRÁFICA 20. Número de folículos medianos (FMED) para el efecto del número de ondas foliculares, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



○ (P<0.05)

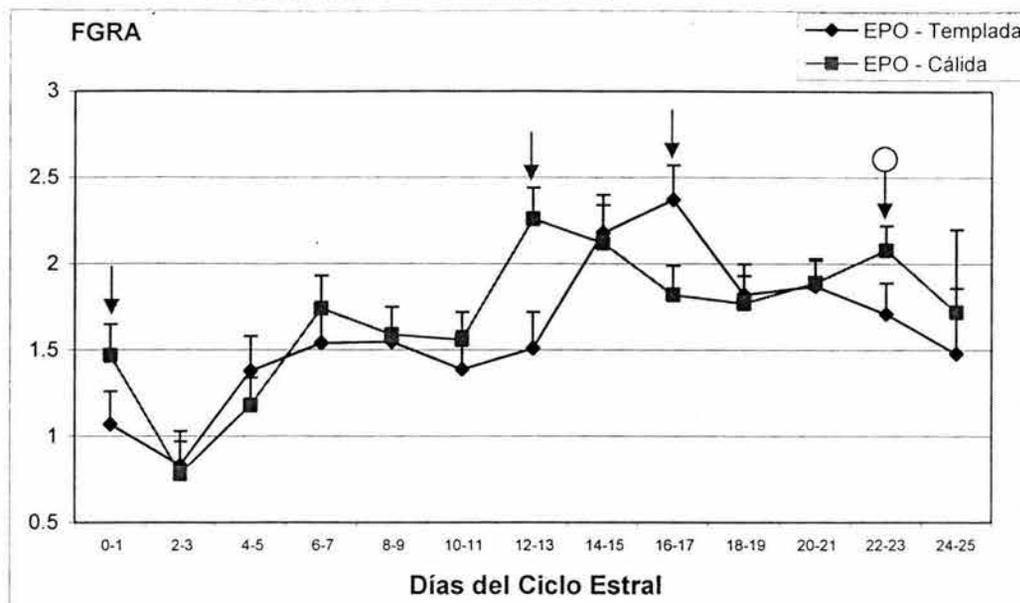
GRÁFICA 21. Número de folículos grandes (FGRA) para el efecto del número de ondas foliculares a lo largo del ciclo estral en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días



↓ (P<0.05)

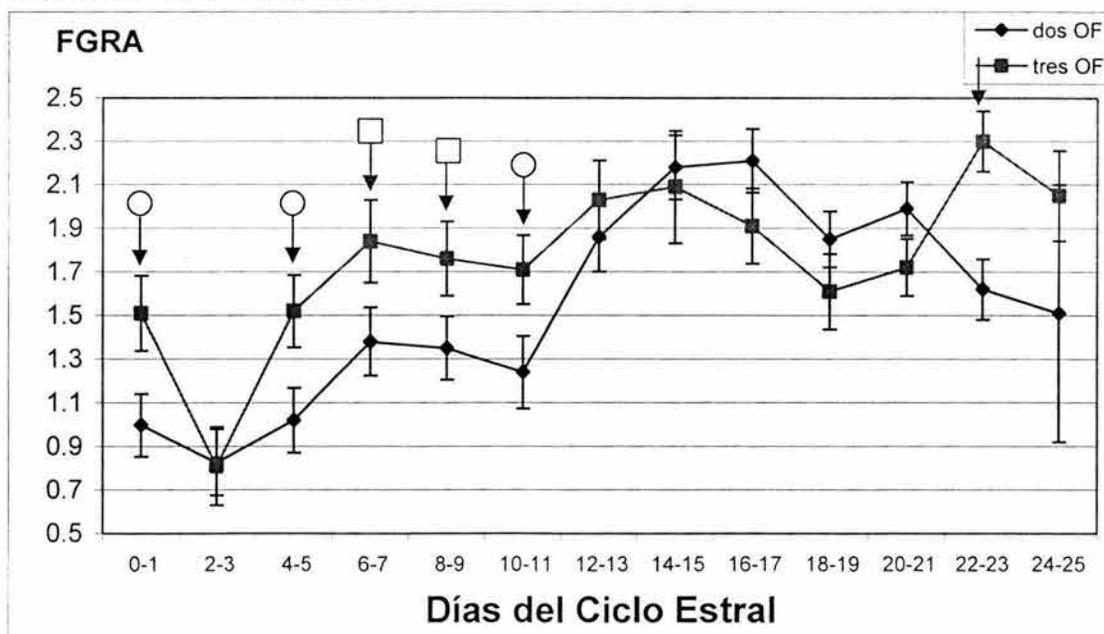
□ (P<0.1)

GRÁFICA 22. Número de folículos grandes (FGRA) para el efecto de la época durante el período de estudio EPO), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



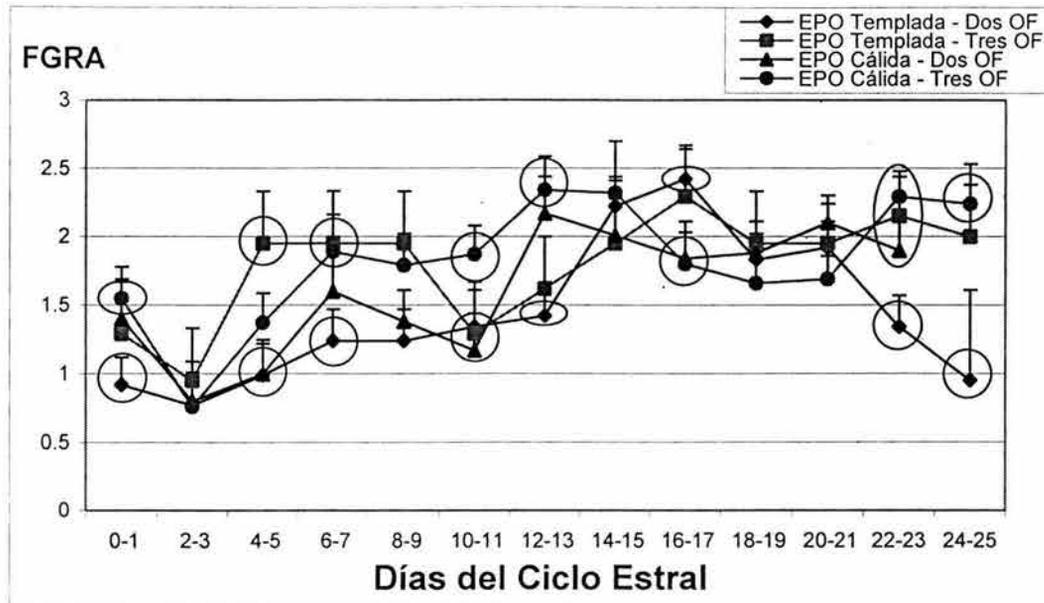
↓ (P<0.01) ○ (P<0.05)

GRÁFICA 23. Número de folículos grandes (FGRA) para el efecto del número de ondas foliculares, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



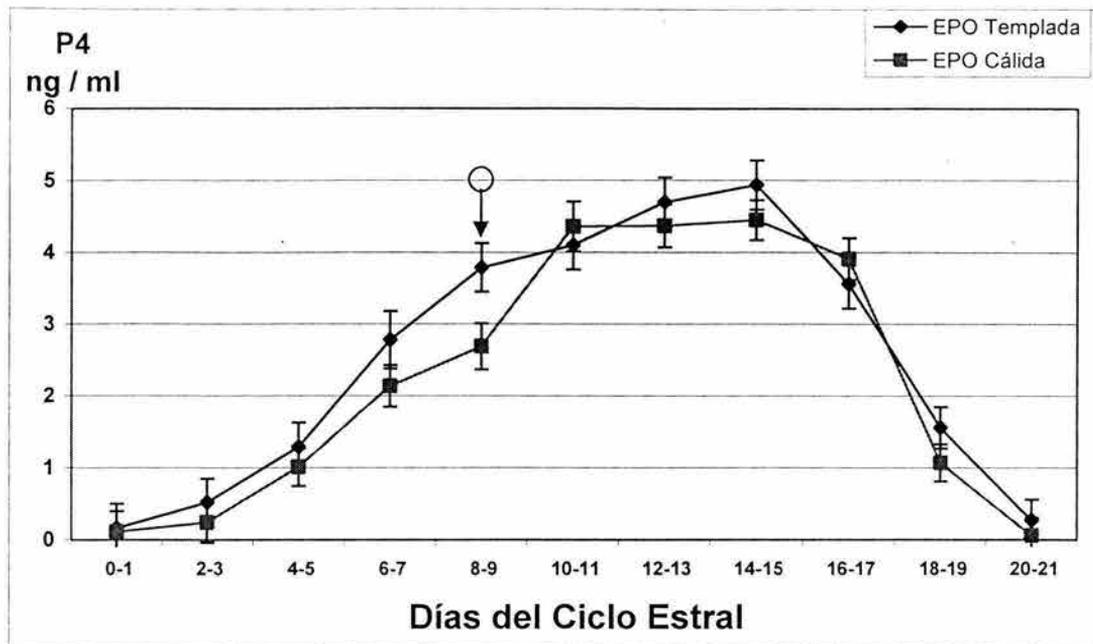
↓ (P<0.01) ○ (P<0.05) □ (P<0.1)

GRÁFICA 24. Número de folículos grandes (FGRA), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la época de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



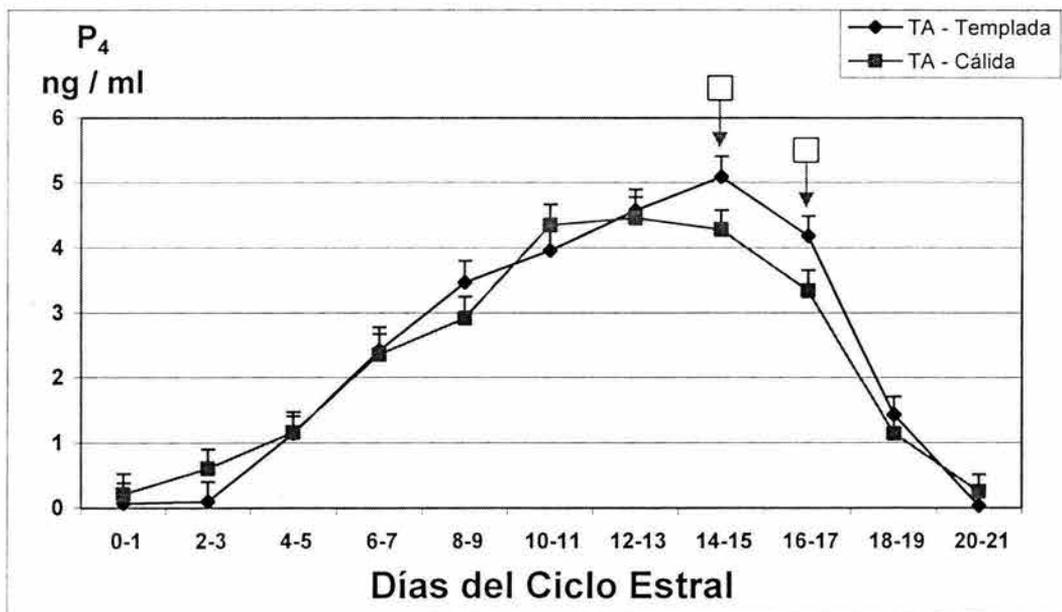
Valores circulados en los mismos días del ciclo estral, indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

GRÁFICA 25. Concentración sérica de progesterona (ng/ml) para el efecto de la época durante la época de estudio (EPO), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días



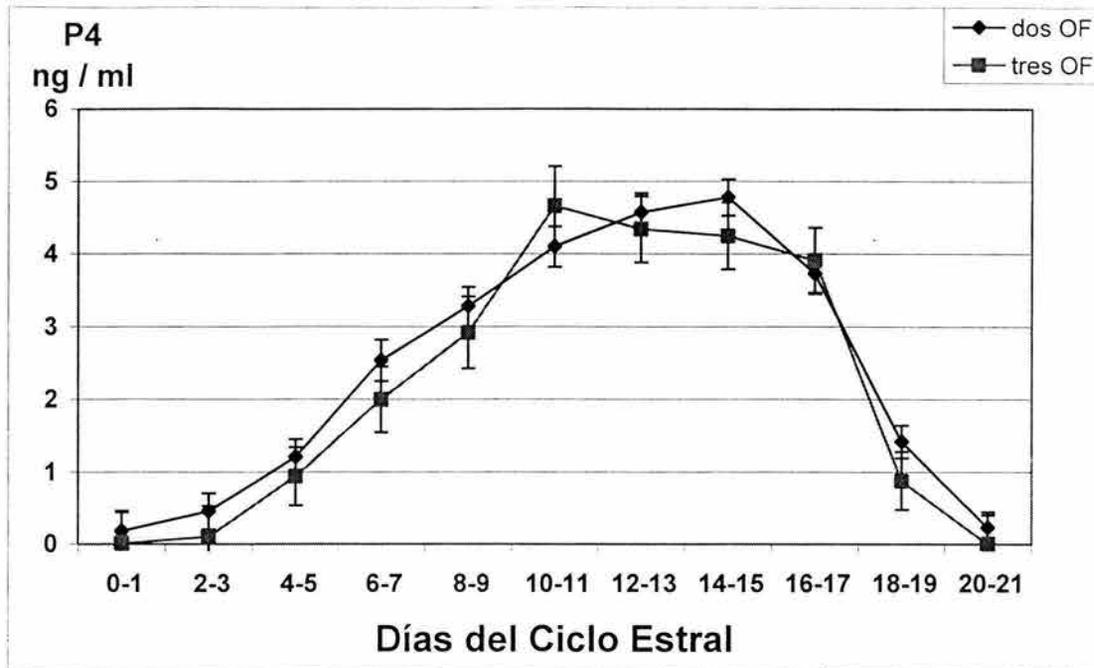
○ (P<0.01)
↓

GRÁFICA 26. Concentración sérica de progesterona (ng/ml) para el efecto de la época previa al estudio (TA), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

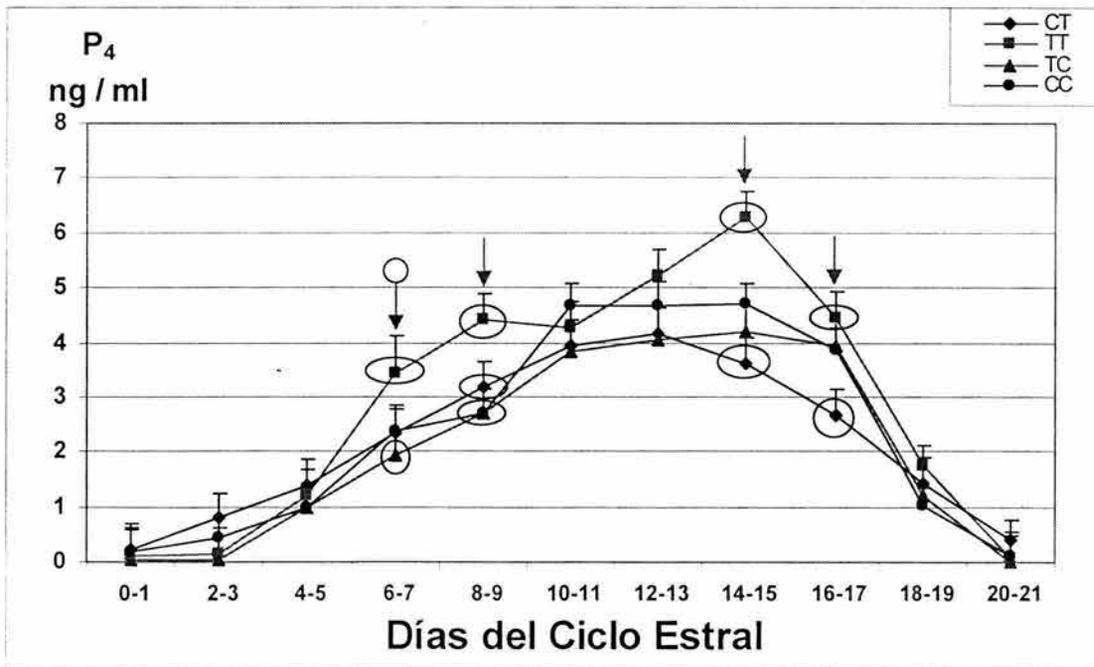


□ (P<0.1)
↓

GRÁFICA 27. Concentración sérica de progesterona (P_4 , ng / ml) para el efecto del número de ondas foliculares a lo largo del ciclo estral en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

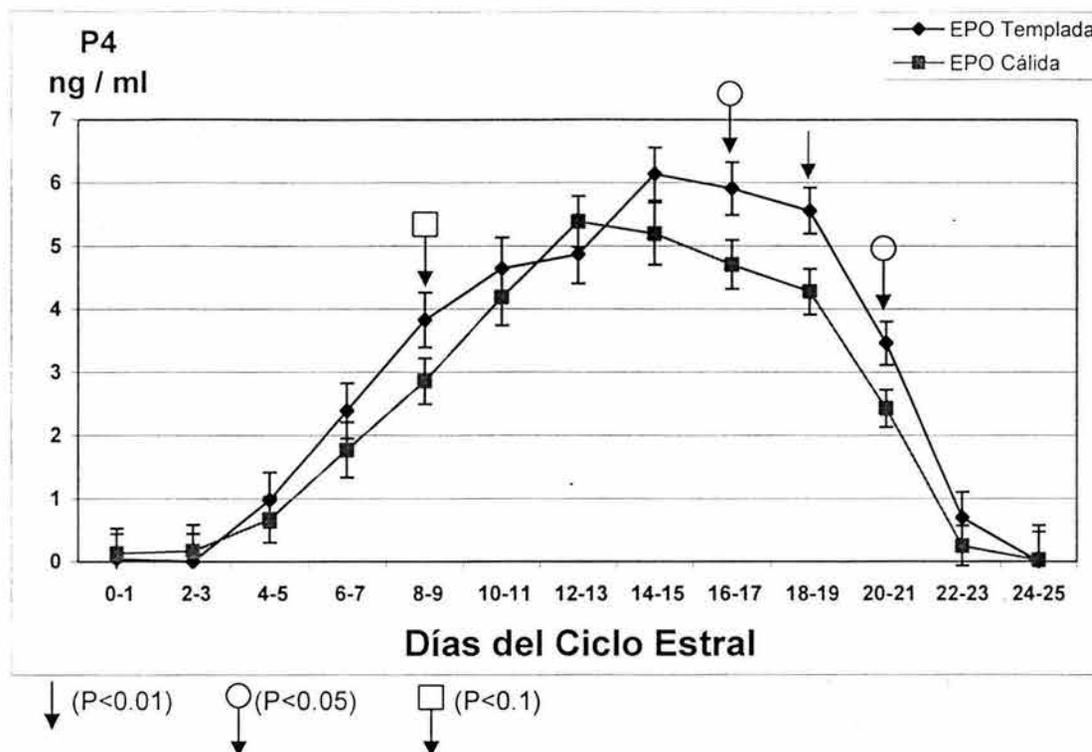


GRÁFICA 28. Concentración sérica de progesterona (P_4 , ng / ml) para el efecto de interacción de las épocas previa y durante el período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

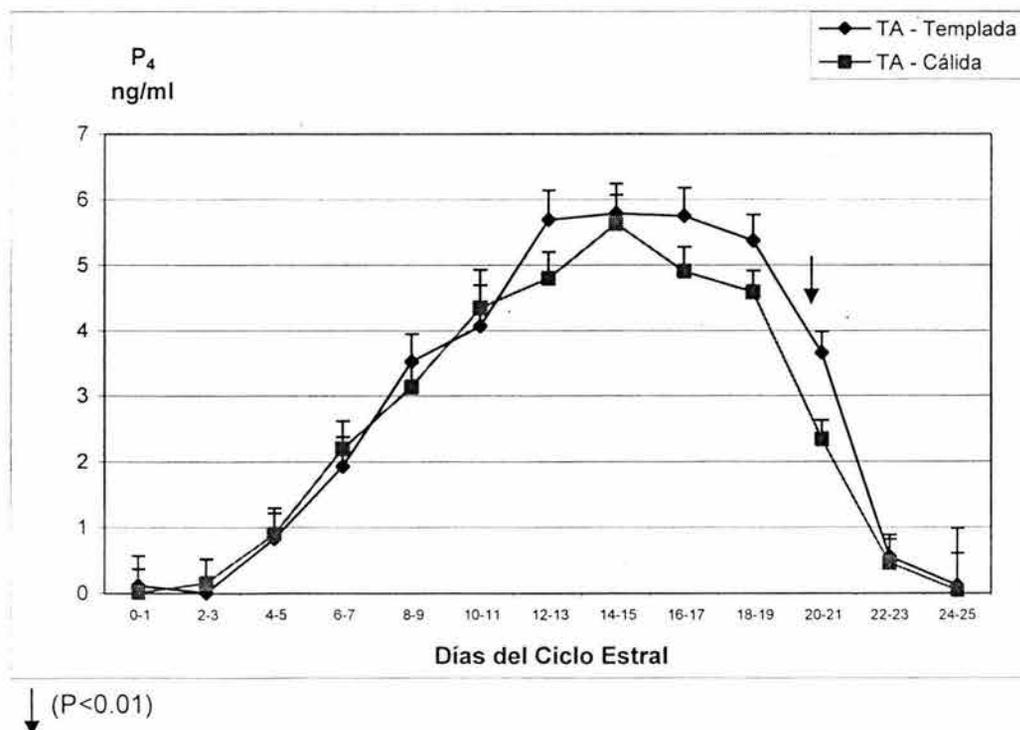


○ (P<0.05) ↓ (P<0.01)

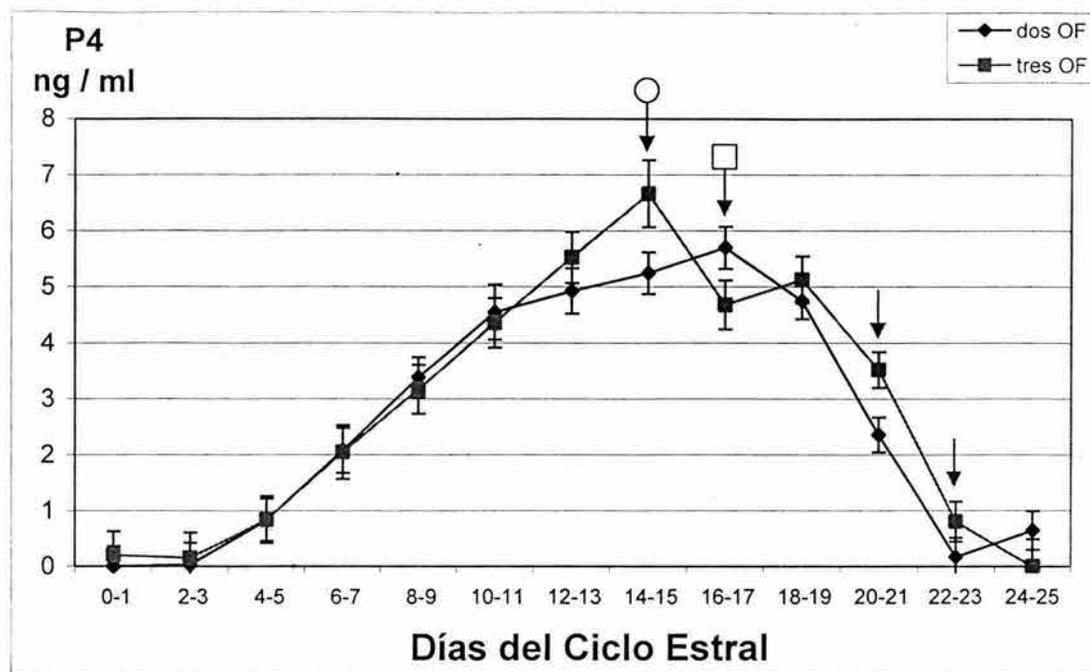
GRÁFICA 29. Concentración sérica de progesterona (P_4) para el efecto de la época durante el período de estudio (EPO), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



GRÁFICA 30. Concentración sérica de progesterona (P_4) para el efecto de época previa al período de estudio (TA), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

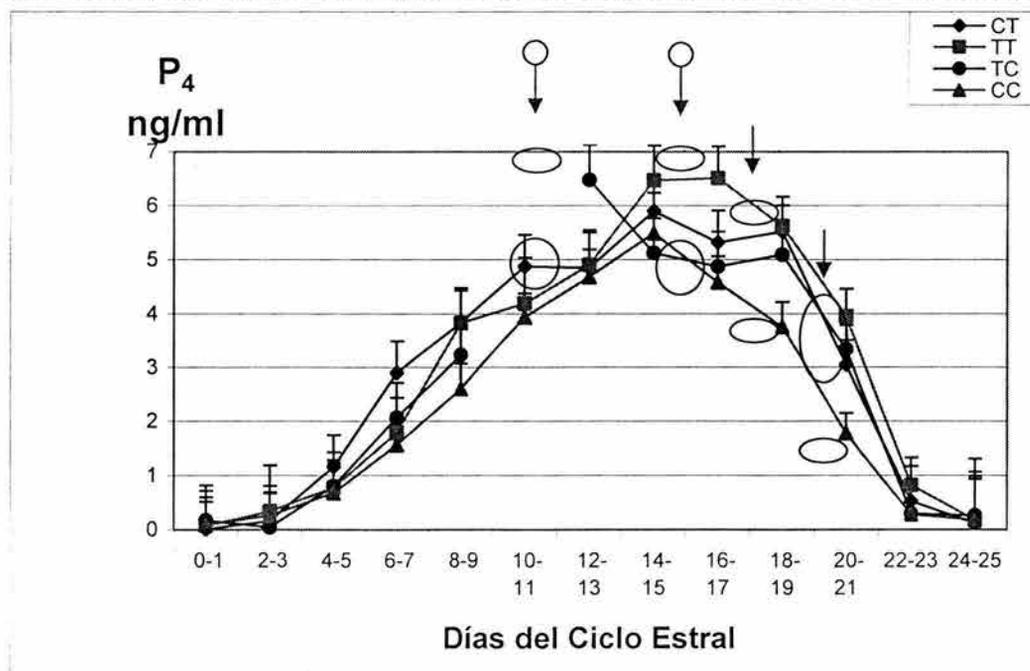


GRÁFICA 31. Concentración sérica de progesterona (P_4) para el efecto del número de ondas foliculares, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



↓ ($P < 0.01$) ○ ($P < 0.05$) □ ($P < 0.1$)

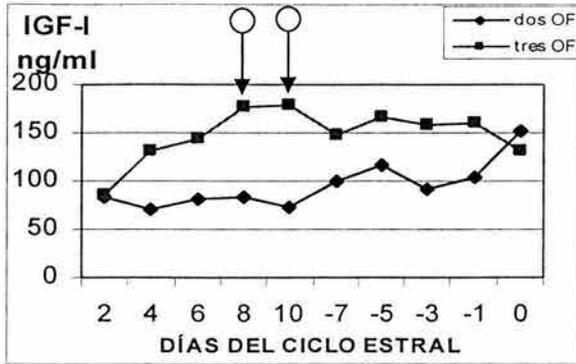
GRÁFICA 32. Concentración sérica de progesterona (P_4) para el efecto de la interacción de las épocas previa y durante el período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



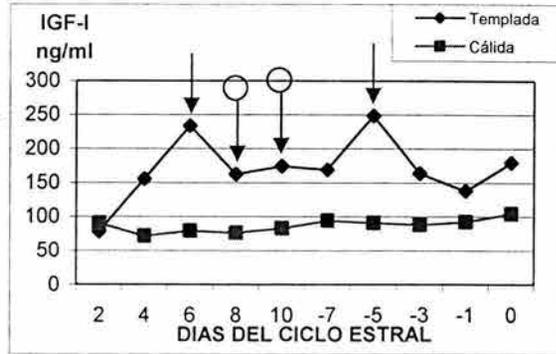
↓ ($P < 0.01$) ○ ($P < 0.05$)

GRÁFICAS 33, 34 y 35. Concentración sérica del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I) para el efecto del número de ondas foliculares, época de estudio y su efecto de interacción, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein

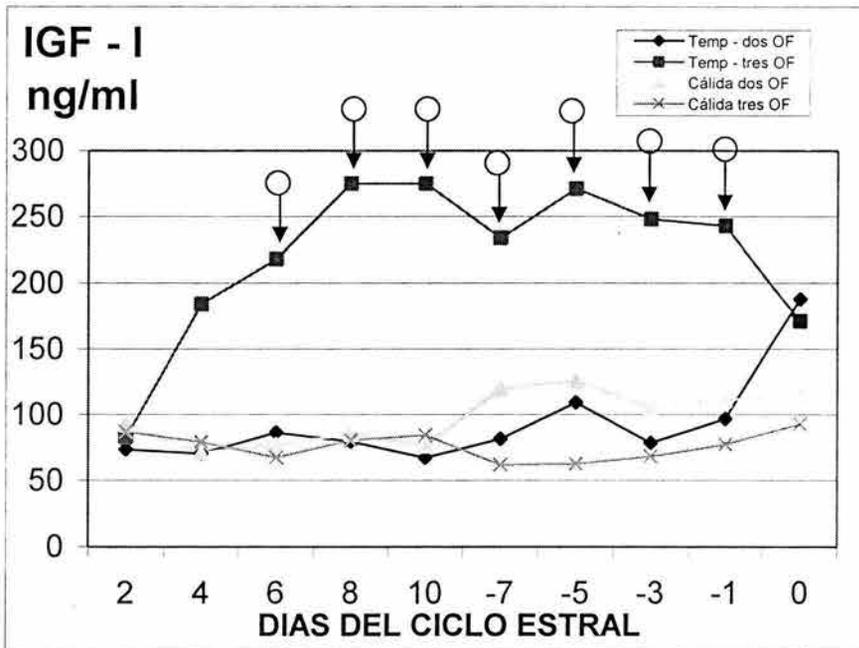
GRÁFICA 33



GRÁFICA 34



GRÁFICA 35



↓ (P<0.01) ○ (P<0.05)

LITERATURA CITADA

1. Al-Katanani, Y.M., Paula-Lopes, F.F., Hansen, P.J. 2002. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci*, 85:390-396.
2. Ambrose, J.D., Guzeloglu, A., Thatcher, M.J., Kassa, T., Díaz, T. and Thatcher, W.W. 1999. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to heat-stress. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 54:503-504.
3. Armstrong, D.G., Evoy, T.G., Baxter, G., Robinson, J.J., Hogg, C.O., Woad, K.J., Webb, R. and Sinclair, K.D. 2001. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol. Reprod.*, 64:1624-1632.
4. Badinga, I., Thatcher, W.W., Díaz, T., Drost, M. and Wolfenson, D. 1993. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 39:797-810.
5. Beam, S.W. and Butler, W.R. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.*, 56: 133-142.
6. Beam, S.W. and Butler, W.R. 1998. Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *J. Dairy Sci.*, 81: 121-131.
7. Bernal, A., DeMoraes, G.V., Thrift, T.A., Willard, C.C. and Randel, R.D. 1999. Effect of induced hypothyroidism on ovarian response to superovulation in Brahman (*Bos indicus*) cows. *J. Anim. Sci.*, 77:2749-2756.
8. Biggers, B.G., Geisert, R.D, Wetteman, R.P., Buchanan, D.S. 1987. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. *J. Anim Sci*, 64:1512-1518.
9. Bossis, I., Wettemann, R.P., Welty, S.D., Vizcarra, J. and Spicer, L.J. 2000. Nutritionally induced anovulation in beff heifers: Ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. *Biol. Reprod.*, 62:1436-1444.

10. Chase Jr., C.C., Kirby, C.J., Hammond, A.C., Olson, T.A. and Lucy, M.C. 1998. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. *J. Anim. Sci.*, 76: 212-219.
11. Driancourt, M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55:1211-1239.
12. Ferguson, J.D., Galligan, D.T. and Thomsen, N. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 77:2695-2703.
13. Garverick, H.A. 1997. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 80:995-1004.
14. Guzeloglu, A., Ambrose, J.D., Kassa, T., Diaz, T., Thatcher, M.J. and Thatcher, W.W. 2001. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. *Anim. Reprod. Sci.*, 66:15-34.
15. Howell, J.L., Fuquay, J.W. and Smith, A. E. 1994. Corpus luteum growth and function in lactating Holstein cows during spring and summer. *J. Dairy Sci.*, 77: 735-739.
16. Ingraham R.H., Stanley R.W. and Wagner W.C. 1975. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in Hawaii. *J. Dairy Sci.* 59(12): 2086.
17. Leon, H.V. 2004. *J. Anim. Sci.*, 82:445-451.
18. Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., Yaniz, J., Rutllent, J., Lopez-Bejar, M. 2001. Persisten ovarian follicles in dairy cows: a therapeutic approach. *Theriogenology*, 56(4): 649-59.
19. Lucy, M. 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.*, 83:1635-1647.
20. Mann, G.E., Lamming, G.E., Robinson, R.S., Wathes, D.C. 1999. The regulation of interferon tau production and uterine receptors during early pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 54:317-328.
21. Monget, P. and Monniaux, D. 1995. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J. Reprod. Fert.*, 49:321-333.

22. Perera, M.G., Falcon, A.A. y Salas, V.A. 1996. Estandarización de la técnica de radiomarcaje con IODO-GEN. XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas Puebla (Puebla) México.
23. Perera, M.G. 2003. Patrón de distribución de isoformas de la hormona luteinizante (LH) intrahipofisiaria y sérica en la especie bovina. Tesis doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM.
24. Pierson, R.A. and Ginther, O.J. 1988. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, 29: 21-37.
25. Pierson, R.A., Kastelic, J.P. and Ginther, O.J. 1988. Basic principles and techniques for transrectal ultrasonograph in cattle and horses. *Theriogenology*, 29: 3-20.
26. Roche, J.F. 1996. Control and regulation of folliculogenesis – a symposium in perspective. *J.Reprod. Fert.*, 1: 19-27.
27. Rosenberg, M., Folman, Y., Herz, Z., Flamenbaum, I., Berman, A. and Kaim, M. 1982. Effect of climatic conditions on peripheral concentrations of LH, progesterone and oestradiol-17B in high milk-yielding cows. *J. Reprod. Fert.*, 66:139-146.
28. Roth, Z., Meidan, R., Braw-Tal, R. and Wolfenson, D. 2000. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J. Reprod. Fert.*, 120:83-90.
29. Roth, Z., Arav, A., Zeron, Y., Braw-Tal, R. and Wolfenson, D. 2001 a. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction*, 122:737-744.
30. Roth, Z. Meidan, R., Shaham-Albalancy, A., Braw-Tal, R. and Wolfenson, D. 2001 b. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction*, 121:745-751.
31. SAS. SAS/STAT User's Guide (Release 6.03). 1988. Cary NC, USA: SAS Inst. Inc.

32. Spicer, L.J., Alonso, J. and Chamberlain, C.S. 2001. Effects of thyroid hormone on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins. *J. Dairy Sci.*, 84:1069-1076.
33. Staples, C.R. Thatcher, W.W. and Clark, J.H. 1990. Relationship between ovarian activity and energy status during the early post-partum period of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 73: 938-947.
34. Truth, P.J., McDowell. L.R. and Hansen, P.J. 1998. Characteristics of estrous cycle and antioxidant status of lactating holstein cows exposed to heat stress. *J. Dairy Sci.*, 81: 1244.
35. Webb, R., Nicholas, B., Gong, J.G., Campbell, B.K., Gutiérrez, C.G., Garverick, H.A. and Armstrong, D.G. 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *J. Reprod. Fert. Supplement* 61:1-20.
36. Wilson, S.J., Marion, R.S., Spain, J.N., Spiers, D.E., Keisler, D.H. and Lucy, M. 1998. Effect of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 81: 2124-2131.
37. Wolfenson, D., Luft, O., Berman, A. and Meidan, R. 1993. Effect of season, incubation temperature and cell age on progesterone and prostaglandin F₂ α production in bovine luteal cells. *Anim. Reprod. Sci.*, 32: 27-40.
38. Wolfenson, D., Thatcher, W.W., Badinga, L., Savio, J.D., Meidan, R., Lew, B.J., Braw-tal, R. and Berman, A. 1995. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol. Reprod.*, 52: 1106-1113.
39. Wolfenson, D., Lew, B.J., Thatcher, W.W., Graber, Y. , and Meidan R. 1997. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 47: 9-19.
40. Yung, M.C., VandeHaar, M.J., Fogwell, R.L. and Sharma, B.K. 1996. Effect of energy balance and somatotropin on insulin-like growth factor I in serum and weight and progesterone of corpus luteum in heifers. *J. Anim. Sci.*, 74: 2239-2244.

REFERENCIAS

- Abe, H., Yamashita, S., Itoh, T., Satoh, T. and Hoshi, H. 1999. Ultrastructure, of bovine embryos developed from in vitro-matured and fertilized oocyte: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or serum-supplemented medium. *Mol. Reprod. Dev.*, 53:325-335.
- Achim, L., Sanjiv, A. and Rajindar, S. 1997. Mitochondrial ubiquinone homologues, superoxide radical generation, and longevity in different mammalian species. *The J. of Biol. Chem.*, 272:19199-19204.
- Adams, G.P., Matteri, R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C.H. and Ginther, O.J. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fert.*, 94:177-188.
- Adams, G.P. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fert.*, 54:17-32.
- Ahmad, N., Schrick, F.N., Butcher, R.L. and Inskeep, K. E. 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. of Reprod.* 52: 1129-1135.
- Ahmad, N., Townsend, E.C., Dailey, R.A. and Inskeep, E.K. 1997. Relationship of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 49:13-28.
- Akbar, A.M., Reichert, L.E. Jr., Dunn, T.G., Kaltenbach, C.C. and Niswender, G.D. 1974. Serum levels of follicle-stimulating hormone during the bovine estrous cycle. *J. Anim. Sci.*, 39:360-365.
- Aktas, H., Wheeler, M.B., First, N.L. and Leibfried, M.L. 1995. Maintenance of meiotic arrest by increasing (cAMP)_i may have physiological relevance in bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 105:237.
- Alberts, B. 1998. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc.
- Al-Katanani, M.Y., Webb, D.W. and Hansen, P.J. 1999. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J. Dairy Sci.*, 82:2611-2616.

- Al-Katanani, Y.M., Drost, M., Monson, R.L., Rutledge, J.J., Krininger, C.E., 3rd, Block, J., Thatcher, W.W., Hansen, P.J. 2002 a. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* 58: 171-182.
- Al-Katanani, Y.M., Paula-Lopes, F.F., Hansen, P.J. 2002 b. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci*, 85:390-396.
- Ambrose, J.D., Guzeloglu, A., Thatcher, M.J., Kassa, T., Díaz, T. and Thatcher, W.W. 1999 b. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to heat-stress. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 54:503-504.
- Ambrose J. D., Drost M., Monson R. L., Rutledge J. J., Leibfried-Rutledge M. L., Thatcher M-J, Kassa T., Binelli M., Hansen P. J., Chenoweth P. J. and Thatcher W. W. 1999 a. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. *J Dairy Sci.* 82:2369-2376.
- Anderson, E. and Albertini, D.F. 1976. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell Biol.*, 71:680-686.
- Aréchiga C.F., Ealy A.D. and Hansen P.J. 1992. Induction of thermotolerance in mouse embryos is blocked by the glutathione synthesis inhibitor, DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO). *J. Anim. Sci.* 70 (suppl 1): 265.
- Aréchiga C.F., Ealy A.D. and Hansen P.J. 1994. Effect of prepartum injection of vitamin E and selenium on postpartum reproductive function of dairy cattle. *Theriogenology.* 41: 1251.
- Aréchiga, C.F., Ealy A.D. and Hansen, P.J. 1995. Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos. *Biol. of Reprod.*, 52:1296-1301.
- Aréchiga, F.C., Vazquez-Flores, S., Ortiz, O., Hernández, C.J., Porras, A. A., McDowell, L.R. and Hansen, P.J. 1998 a. Effect of injection of beta-carotene or

vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*, 50:65-76.

Aréchiga, F.C., Staples, C.R., McDowell, L.R. and Hansen, P.J. 1998 b. Effects of timed inseminations and supplemental beta-carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. *J. Dairy Sci.*, 81:390-402.

Argentsinger, L.S., Campbell, G.S., Yang, X., Witthuhn, B.A., Silvennoinen, O., Ihle, J.N. and Carter, S. 1993. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74:237-244.

Arlotto, t., Schwartz, J.L., First, N.L. and Leifried, M.L. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect, in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45:943-956.

Armstrong, D.V., Welchert, W.T. and Wiersma, F. 1993. Environmental modifications for dairy cattle housing in arid climates. 4th International Livestock Environmental Symposium, Warnick, England. p. 1223-1231.

Armstrong, D.G., Evoy, T.G., Baxter, G., Robinson, J.J., Hogg, C.O., Woad, K.J., Webb, R. and Sinclair, K.D. 2001. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol. Reprod.*, 64:1624-1632.

Assey, R.J., Hyttel, P., Roche, J.F. and Boland, M. 1994. Oocyte steroid and follicular steroid and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. *Mol. Reprod. Dev.*, 39:8-16.

Attardi, B. and Happe, H.K. 1986. Modulation of the estradiol-induced luteinizing hormone surge by progesterone or antiestrogens: effects on pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology*, 119:274-283.

Attardi, B., Klatt, B., Hoffman, G.E. and Smith, M.S. 1997. Facilitation or inhibition of the estradiol-induced gonadotropin surge in the immature rat by progesterone: regulation of GnRH neurons. *J. Neuroendocrinol.*, 9:589-599.

Augstburger F., Zemp J. and Heusser H. 1988. A comparison of fertility, health and yields of dairy cows in herds under organic or conventional management. *Landwirtschaft Schweiz*. 1: 427.

Avendaño RL, Molina RL y Correa CA. Factores ambientales que influyen sobre la eficiencia reproductiva en un hato Holstein de Baja California. *Reun Nac Inv Pec Pec* 1990: 447.

Ayalon, N., Marcus, S., Feingold, D. and Lewis, S. 1988. Summer infertility in Holstein cattle. *Proc. XI th Congr. Anim. Reprod. A.I. (Dublin, Ireland)* 1:399 abstr.

Badinga, I., Thatcher, W.W., Dias, T., Drost, M. and Wolfenson, D. 1993. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 39:797-810.

Bao, B. and Garverick, H.A. 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.*, 76:1903-1921.

Bao, B, Calder, M.D., Sancai, X., Smith, M.F., Salfen, B.E., Youngquist, R.S. and Garverick, H.A. 1998. Expression of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid is limited to theca of healthy bovine follicles collected during recruitment, selection, and dominance of follicles of the first follicular wave. *Biol. Reprod.*, 59:953-959.

Barash, H., Silanikove, N., Shamay, A. and Ezrat, E. 2001. Interrelationships among ambient temperature, day length, and milk yield in dairy cows under a mediterranean climate. *J. Dairy Sci.*, 84:2314-2320.

Barnes, F.L. and Eyestone, W.H. 1990. Early cleavage and the maternal to zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology*, 33:141.

Barnes, F.L. and First, N.L. 1991. Embryonic transcription in vitro cultured bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 29:117.

Bauer-Dantoin, A.C., Weiss, J. and Jameson, J.L. 1995. Roles of estrogen, progesterone, and gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the control of pituitary GnRH receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropin surges. *Endocrinology*, 136:1014-1019.

- Bauman, D.E. and Currie, W.B. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.*, 63: 1514-1529.
- Beam, S.W. and Butler, W.R. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.*, 56: 133-142.
- Beam, S.W. and Butler, W.R. 1998. Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *J. Dairy Sci.*, 81: 121-131.
- Beam, S.W. and Butler, W.R. 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 54: 411-424.
- Becerril, C.M., Wilcox, C.J., Campos, M.S. and Hansen, P.J. 1994. Genetic effects and relationship of milk production and percentage of white coat in a subtropical Holstein herd. *Rev. Brasil Genet.* 17:65.
- Bendsaddoun, A. and Reid, J.T. 1962. Estimation of rate of portal blood flow in ruminants: effect of feeding, fasting and anesthesia. *J. Dairy Sci.*, 45:540-543.
- Benjamin, M.M. 1981. Fluid and electrolytes. In outline veterinary clinical pathology. Iowa State Univ. Press, Ames.
- Berman, A., Folman, Y., Kaim, M., Marmen, M., Herz, Z., Wolfenson, D., Ariell, A. and Graber, Y. 1985. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high yielding dairy cows in a subtropical climate. *J. Dairy Sci.*, 68:1488.
- Bernal, A., DeMoraes, G.V., Thrift, T.A., Willard, C.C. and Randel, R.D. 1999. Effect of induced hypothyroidism on ovarian response to superovulation in Brahman (*Bos indicus*) cows. *J. Anim. Sci.*, 77:2749-2756.
- Biggers, B.G., Geisert, R.D, Wetteman, R.P., Buchanan, D.S. 1987. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. *J. Anim Sci*, 64:1512-1518.
- Bilby, C.R., Macmillan, K.L., Verkerk, G.A., Peterson, J.A., Koenigsfeld, A., Lucy, M.C. 1998. A comparative study of ovarian function in American (US) and New

Binelli, M., Thatcher, W.W., Mattos, R. and Basurelli, P.S. 2001. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*, 56: 1451-1463.

Bo, G.A., Basurelli, P.S., Moreno, D., Caccia, M., Tribulo, R., Tribulo, H. and Mapletoft, R.J. 2001. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57:53-72.

BonDurant R.H., Revah I., Franti C., Harmon R.J., Hird D., Kilngbord D., McClosky M., Weaver L. and Wilgenburg B. 1991. Effect of gonadotropin releasing hormone on fertility in repeat breeder California dairy cows. *Theriogenology*. 35:365.

Borman, J.M., Radcliff, R.P., McCormack, B.L., Kojima, F.N., Patterson, D.J., Macmillan, K.L. and Lucy, M.C. 2003. Synchronization of oestrus in dairy cows using prostaglandin f2alpha, gonadotropin-releasing hormone, and oestradiol cypionate. *Anim. Reprod. Sci.*, 76:163-176.

Bossis, I., Wettemann, R.P., Welty, S.D., Vizcarra, J. and Spicer, L.J. 2000. Nutritionally induced anovulation in beff heifers: Ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. *Biol. Reprod.*, 62:1436-1444.

Brann, D.W., O'Conner, J.L., Wade, M.F., Zamorano, P.L. and Mahesh, V.B. 1993. Regulation of anterior pituitary gonadotropin subunit mRNA levels during the preovulatory gonadotropin surge: a physiological role of progesterone in regulating LH-beta and FSH-beta mRNA levels. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 46:427-437.

Breuel, K.F., Lewis, P.E., Schrick, E.N., Lishman, A.W., Inskeep, E.K. and Butcher, R.L., 1993. Factors affecting fertility in the postpartum cow: role of the oocyte and follicle in conception rate. *Biol. of Reprod.* 48: 655-661.

Brevini, G.T., Favetta, L.A., Lonergan, P. and Gandolfi, F. 2000. The mechanism regulating maternal mRNA stability and translation is affected in bovine embryos with low developmental competence. *Theriogenology*, 53:268 (Abtr.).

Britt J.H., Kittok R.J., and Harrison D.S. 1974. Ovulation, estrus and endocrine response after GnRH in early postpartum cows. *J. Anim. Sci.* 39:915.

Brody, S. 1954. The thermal effects of radiation intensity (light) on milk production, feed and water consumption and bodyweight in Holstein, Jersey and Brahman

cows at air temperature 45 F, 70 F, and 80 F. Missouri Agr. Exp. Res. Bull., 558: 1-20.

Brown, M.S. and Goldstein, J.L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232:34-47.

Buccione, R., Schroeder, A.C. and Eppig, J.J. 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod.*, 43:543-547.

Bucklin, R.A., Hahn, G.L., Beede, D.K. and Bray, D.R. 1992. Physical facilities for warm climates. *Large Dairy Herd Management*. Ed. H.H. Horn and C.J. Wilcox. p. 609-618.

Burrow, G.N. 1978. The thyroid gland and reproduction. In: S.S.C. Yen and R.B. Jaffe (Ed) *Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management*. P 424-440.

Butler, W.R. and Smith, R.D. 1989. Interrelationship between energy balance on postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 7:767-783.

Butler, W.R. 1998. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 81: 2533-2539.

Butler, W.R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 449-457.

Byung, P.Y. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74:139-162.

Caffrey, J.L., Fletcher, P.W., Diekman, M.A. , O'Callaghan, P.L. and Niswender, G.D. 1979. The activity of ovine luteal cholesterol esterase during several experimental conditions. *Biol. Reprod.*, 21:601-608.

Call E.P. 1978. Economics associated with calving intervals. p. 190 en *Large Dairy Herd Management*. Ed. Univ Press Florida, Gainesville.

Cartmill, J.A., El-Zarkouny, S.Z., Hensley, B.A., Rozell, T.G., Smith, J.F. and Stevenson, J.S. 2001. An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperatures before or after calving or both. *J. Dairy Sci.*, 84: 799-806.

- Cavestany D., El-Wishy A.B., Foote R.H. 1985. Effect of season and high environmental temperature on fertility of Holstein cattle. *J.Dairy Sci.* 68: 1471.
- Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L., Robaldo Silva, J. 2002. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*, 58:51-59.
- Chandolia, R.K., Reinertsen, E.M. and Hansen, P.J. 1999. Lack of breed difference in response of bovine spermatozoa to heat shock. *J. Dairy Sci.*, 82:2617-2619.
- Channig, C.P. 1969. Tissue culture of equine ovarian cell types culture methods and morphology. *J. Endocrinol.*, 43:381-390.
- Chasse, C.C.Jr., Kirby, C.J., Hammond, A.C., Olson, T.A. and Lucy, M.C. 1998. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. *J.Anim.Sci.*, 76:212-219.
- Chen, L., Russell, P.T. and Larsen, W.J. 1993. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid the cumulus mass. *Mol. Reprod. Dev.*, 34:87-93.
- Chen, L., Zhang, H., Powers, R.W., Russel, P.T. and Larsen, W.J. 1996. Covalent linkage between proteins of the inter- α inhibitor family and hialuronic acid is mediated by a factor produced by granulosa cell. *J. Biol. Chem.*, 271:19409-19414.
- Ciapa, B., Pesando, D., Wilding, M. and Whitaker, M.J. 1994. Cell cycle calcium transient driven by cyclic changes in inositol trisphosphate levels. *Nature*, 368:875-878.
- Collier, R.J., Doelger, S.G., Head, H.H., Thatcher, W.W. and Wilcox, C.J. 1982. Effect of heat stress during pregnancy on maternal hormone concentrations, calf birth weight and postpartum milk yield of Holstein cows. *J. Anim. Sci.*, 54: 309.
- Collier, R.J., Byatt, J.C., Curran, T., Eppard, P.J., Fabelat, A.C. , Hintz, R.L., Hoffman, R., McCrate, M.M., McLaughin, C.L., Sorbet, R.H. and Vicini, J.L. 1997. Post-approval evaluation of posilac bovine somatotropin in 28 commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 80(suppl 1):169 abst.

Cook, D.L., Parfet, J.R., Smith, C.A., Moss, G.E., Youngquist, R.S. and Garverick, H.A. 1991. Secretory patterns of LH and FSH during development and hypothalamic and hypophyseal characteristics following development of steroid-induced ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J. Reprod. Fert.*, 91:19-28.

Cooperative Regional Research Project, NE-161. 1996. Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. *J. Anim. Sci.*, 74:1943-1952.

Coulson A., Noakies D.E., Hamer J. and Cockrill, T. 1980. Effect of gonadotropin releasing hormone on levels of luteinizing hormone in cattle synchronized with dinoprost. *Vet.Rec.* 107:108.

Cummings, A.M. and Yochim, J.M. 1984. Differentiation of the uterus in preparation for gestation: a model for the action of progesterone. *J. Theor. Biol.*, 106:353-374.

Dado, R.G. and Allen, M.S. 1994. Variation in the relationship among feeding, chewing, and drinking variables for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 77:132.

Dalton, J.C., Nadir, S., Bame, J.H., Noftinger, M., Saacke, R.G. 2000. The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. *J. Anim Sci* 78(8): 2081-2085.

Davis, G.H., McEwan, J.C., Dodds, K.G., McNatty, K.P. 1992. Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecX1) for inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. *Biol. Reprod.*, 46:636-640.

Davis A.V. and Merilan C.P. 1960. Effect of constant environmental temperature and relative humidity on feed digestion by lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 43:871.

Davis, J.S., May, J.V. and Keel, B.A. 1996. Mechanisms of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, 45:1351-1380.

De la Sota, R.L., Burke, J.M., Risco, C.A., Moreira, F., DeLorenzo, M.A. and Thatcher, W.W. 1998. Evaluation of timed insemination during summer heat stress in lactating dairy cattle. *Theriogenology*, 49:761-770.

- Deguchi, R. and Osani, K. 1994. Repetitive intracellular calcium increases at fertilization and the role of Ca in meiosis reinitiation from the first metaphase in oocyte of marine bivalves. *Dev. Biol.*, 163:162-164.
- Deguchi, R. and Osanai, K. 1995. Serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase and from the first metaphase in oocytes of the marine bivalve *Hiatella flaccida*: respective changes in calcium and pH. *Dev. Biol.*, 171:483-496.
- Demmers, J.K., Derecka, K and Flint A. 2001. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction*, 121: 41-49.
- De Sousa, P.A., Caveney, A., Westhusin, M.E. and Watson, A.J. 1998. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenic factors. *Theriogenology*, 49:115-128.
- Díaz, T., Schmitt, E.J., Thatcher, M.J. and Thatcher, W.W. 1998. Human chorionic gonadotropin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers. *J. Anim. Sci.*, 76:1929-1936.
- Díaz, T., Pancarci, S.M., Drost, M., Schmitt, E.J., Ambrose, J.D., Fredriksson, W.E. and Thatcher, W.W. 2001. Effects of the persistent dominant follicle on the ability of follicle stimulating hormone to induce follicle development and ovulatory responses. *J. Dairy Sci.*, 84:88-99.
- Diskin, M.G., Austin, E.J. and Roche, J.F. 2002. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 23:211-228.
- Dochi, O., Yamamoto, Y., Saga, H., Yoshida, N., Kano, N., Macda, J., Miyata, K., Yamauchi, A., Tominaga, K., Oda, Y., Nakashima, T., and Inohara, S. 1998. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology*, 49:1051-1058.
- Dong, J. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383:531-535.
- Driancourt, M.A., Karine, R., Cortvriendt, R. And Smits, J. 2000. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Reviews of Reproduction*, 5:143-152.

Driancourt, M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55:1211-1239.

Drost M., Ambrose J.D., Thatcher M-J., Cantrell C.K., Wolsdorf K.E., Hasler J.F. and Thatcher W.W. 1999. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology* 52:1161.

Dunne, L.D., Diskin, M.G., Sreenan, J.M. 2000. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Animal Reproduction Science*, 58:39-44.

Ealy A.D., Drost M., Barros C.M. and Hansen P.J. 1992. Thermoprotection of preimplantation bovine embryos from heat shock by glutathione and taurine. *Cell. Biol.* 16: 125.

Ealy A.D., Drost M., and Hansen P.J. 1993. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.* 76: 2899.

Ealy, A.D. and Hansen, P.J. 1994. Induced thermotolerance during early development of murine and bovine embryos. *J. Cell Physiol.*, 160: 463.

Ealy, A.D., Aréchiga, F.C., Bray, D.R., Risco, C.A. and Hansen P.J. 1994. Effectiveness of short-term cooling and vitamin E for alleviation of infertility induced by heat stress in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 77:3601-3607.

Ealy, A.D., Howell, L.J., Monterroso, V.H, Aréchiga, C.F. and Hansen, P.J. 1995. Development changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. *J. Anim. Sci.*, 73:1401-1407.

Edwards, J.L., and Hansen, P.J. 1996. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol. of Reprod.*, 55:341-346.

Edwards, J.L., Ealy, A.D. and Hansen, P.J. 1995. Regulation of heat shock proteins 70 synthesis by heat shock in the preimplantation murine embryo. *Theriogenology*, 44:329-337.

- Edwards, J.L. and Hansen, P.J. 1997. Differential response of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.*, 46:138-145.
- Edwards, J.L., King, W.A., Kawarsky, S.J. and Ealy, A.D. 2001. Responsiveness of early embryos to environmental insults potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology*, 55:209-223.
- Ethier, Jean-Francois and Findlay, J.K. 2001. Roles of activin and its signal transduction mechanism in reproductive tissue. *Reproduction*, 121:667-675.
- El Amin F.M., Simerl N.A. and Wilcox C.J. 1986. Genetic and environment effects upon reproductive performance of Holstein crossbreds in the Sudan. *J. Dairy Sci.* 69: 1093.
- Ellington, J.E., Foote, R.H., Farrell, P.B., Hasler, J.F., Webb, J., Henderson, W.B., and McGrath, A.B. 1991. Pregnancy rates after the use of a gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology*, 36:1035-1042.
- Elsden, R.P. 1987. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*, 6: 523-532.
- Elvin, J.A., Clark, A.T., Wang, P., Wolfman, N.M. and Matzuk, M.M. 1999. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol. Endocrinol.*, 13:1035-1048.
- El Razeck, A., Charpigny, J.M., Kodja, S., Marquant, G., Mermillod, P., Guyader, J.C. and Humblot, P. 2000. Difference in lipid composition between in vivo and in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, 53:346 (Abtr.).
- Eppig, J.J. 1991. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Biol. Essays*, 13:569-574.
- Eppig, J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122:829-838.
- Erickson, R.P. 1995. Recent advances in development genetics: Growth factors and morphogens. *Biol. Reprod.*, 41:109.
- Evans, A.C.O., Komar, C.M., Wandji, S-A. and Fortune, J.E. 1997. Changes in androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with the

recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of the bovine estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 57:394-401.

Evans, A.C., Adams, G.P. and Rawling, N.C. 1994. Follicular and hormonal development in prepuberal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J. Reprod. Fert.*, 102:463-470.

Farin, C.E., Moeller, C.L. Sawyer, H.R., Gamboni, F. and Niswender, G.D. 1986. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 35:1299-1308.

Farin, C.E. and Yang, L. 1992. Inhibition of germinal vesicle breakdown by 5,6-dichlorobenzimidazole riboside in bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 37:208.

Farin, P.W., Farin C.E. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol Reprod* 52: 676-82.

Faust, M.A., McDaniel, B.T., Robison, O.W. and Britt, J.H. 1988. Environmental and yield effects on reproduction in primiparous Holstein. *J. Dairy Sci.*, 71: 3092-3099.

Felix, M.A., Labbe, J.C., Doree, M., Hunt, T. and Karsenti, E. 1990. Triggering of cyclin degradation in interphase extracts of amphibian eggs by cdc2 kinase. *Nature*, 346:379-382.

Fernández D.L.J. 1997. Evaluación de parámetros reproductivos en hatos de la comarca lagunera. *Unión Ganadera*. p. 12.

Finch, V.A. 1986. Body temperature in beef cattle: its control and relevance to production in the tropics. *J. Anim. Sci.*, 62:531.

Findlay, J.K. 1993. An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.*, 48:15.23.

Findlay J.K. 1994. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. *Reprod. Fert. Dev.* 6: 127.

- Flamenbaum, I. , Wolfenson, D., Mamen, M. and Berman, A. 1986. Cooling dairy cattle by a combination of sprinkling and forced ventilation and its implementation in the shelter system. *J. Dairy Sci.*, 69:3140-3147.
- Flamenbaum, I., Wolfenson, D., Kunz, P.L., Maman, M. and Berman, A. 1995. Interactions between body condition at calving and cooling of dairy cows during lactation in summer. *J. Dairy Sci.*, 78:2221.
- Fortune, J.E., Rivera, G.M., Evans, A.C.O. and Turzillo, A.M. 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol. Reprod.*, 65:648-654.
- First, N.L., Leibfried, M.L. and Sirard, M.A. 1988. Cytoplasmic control of oocyte maturation and species differences in the development of maturational competence. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 267:1-46.
- Funk D.A., Freeman A.E. and Berge, P.J. 1987. Effects of previous days open previous days dry, and present days open on lactation yield. *J. Dairy Sci.* 70: 2366.
- Fuquay J.W. 1981. Heat stress as it affects animal production. *J. Anim. Sci.* 52:164.
- Gabbitia, P.S., Butterfield, A.D., Hensley, K., Shaw, W. and Carney, J.M. 1997. Aging and caloric restriction affect mitochondrial respiration and lipid membrane status: an electron paramagnetic resonance investigation. *Free Radicals Biol. and Med.*, 23:191-201.
- Ganong, F.W. 2002. *Fisiología Médica*. XX edición. Editorial Manual Moderno. p. 307-416.
- Garverick, H.A. 1997. *J. Dairy Sci.*, 80:995-1004.
- Geisert, R.D., Fox, T.C., Morgan, G.L., Wells, M.E., Wettemann, R.P., Zavy, M.T. 1991. Survival of bovine embryos transferred to progesterone-treated asynchronous recipients. *J. Reprod Fert.*, 92: 475-482.
- Geisert, R.D., Everett, C.S. and Zavy, M.T. 1992. Maternal recognition of pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.*, 8:287.
- Gilad, E., Meidan, R., Bernan, A., Graber, Y. and Wolfenson, D. 1993. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *J. Reprod. Fert.*, 99: 315-321.

Ginther, O.J., Kastelic, J.P. and Knopf, L. 1989 a. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.*, 20:187-200.

Ginther, O.J., Knopf, L. and Kastelic, J.P. 1989 b. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fert.*, 87:223-230.

Ginther, O.J., Kot, K., Kulick, K., Mrtin, S. and Wiltbank, M.C. 1996. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 108:271-279.

Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Gibbons, J.R. and Kot, K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.*, 55: 1187-1194.

Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Kulick, L.J. and Kot, K. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol. Reprod.*, 63:383-389.

Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Beg, M.A. and Kot, K. 2001. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biol. Reprod.*, 64:197-205.

Gong, G.J., Campbell, B.K., Bramley, T.A., Gutiérrez, C.G., Peters, A.R. and Webb, R. 1996. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol. Reprod.*, 55:68-74.

Grazul, A.T. , Redmer, D.A., Jablonka, A., Biondini, M.E. and Reynolds, L.P. 1995. Proliferation and progesterone production of ovine luteal cells from several stages of the estrous cycle: effects of fibroblast growth factors and luteinizing hormone. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 73:491-500.

Grohn, Y.T. and Rajaal-Schultz, P.J. 2000. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 605-614.

Grummer, R.R. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J. Anim. Sci.*, 73:2820-2833.

Gumen, A. and Wiltbank, M.C. 2000. Follicular cysts in cattle involve an alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure. *Biol. Reprod.*, 62:160 abst.

Gustafson H., Larson K., Kindhal H. and Madej A. 1986. Sequential endocrine changes and behavior during oestrus and metoestrus in repeat breeder and virgin heifers. *Anim.Reprod. Sci.* 10: 261.

Gutiérrez, G.C. 1999. Dinámica y etiología de los quistes foliculares en ganado lechero post-parto. VIII Curso Internacional de Reproducción Bovina. México 1999. p. 14-20.

Guzeloglu, A., Ambrose, J.D., Kassa, T., Diaz, T., Thatcher, M.J. and Thatcher, W.W. 2001. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. *Anim. Reprod. Sci.*, 66:15-34.

Gwazdauskas, F.C., Thatcher, W.W., Kiddy C.A., Paape, M.J. and Wilcox, C.J. 1981. Hormonal patterns during heat stress following PGF2 alpha tam salt induced luteal regression in heifers. *Theriogenology*, 16 : 271-285.

Gwazdauskas, F.C., Whittier, W.D., Vinson, W.E. and Pearson, R.E. 1986. Evaluation of reproductive efficiency of dairy cattle with emphasis on timing of breeding. *J. Dairy Sci.*, 69: 290.

Haccard, O., Lewellyn, A., Hartley, R.S., Erikson, E. and Maller, J.L. 1995. Induction of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by MAP kinase. *Dev. Biol.*, 168:677-682.

Hamilton, S.A., Garverick, H.A., Keisler, D.H., Xu, Z., Loos, K., Youngquist, R.S. and Salfen, B.E. 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol. Reprod.*, 53:890-898.

Hansen, L.B., Freeman, A.E. and Berger, P.J. 1983. Yield and fertility relationships in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 66: 293-305.

Hansen, P.J. 1994. Causes and possible solutions to the problem of heat stress in reproductive management of dairy cows. National Reproduction Symposium, Pittsburg, PA. p. 161-170.

Hansen, P.J. 1997. Effects of environment on bovine reproduction. In: Youngquist RS (ed), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders Co. p. 403-415.

Hansen P.J. Drost M., Rivera R.M., Paula-Lopes F.F., Al-Katanani Y.M., Krininger C.E. III, and Chase C.C. Jr. 2001. Adverse Impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*. 55:91.

Hartl, P., Gottesfeld, J. and Forbes, D.J. 1993. Mitotic repression of transcription in vitro. *J. Cell Biol.*, 120:613.

Hasler, J.F. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 1;56:1401-15.

Herbison, A.E. 1997. Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. *Reviews of Reproduction*, 2:1-6.

Hermas, S.A., Young, C.W., Rust, J.W. 1987. Genetic relationship and additive genetics variance of productive and reproductive traits in Guernsey dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 1252-1257.

Hernández-Cerón, J., Chase, C.C. and Hansen, P.J. 2004. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. *J.Dairy Sci.*, 87:53-58.

Hiroko, N., Tomoko, K., Yoko, I., Kozo, U., Midori, H., Akitane, M. and Lester, P. 1998. Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM). *Free Radical Biol. & Med.*, 24:85-92.

Hollmann, F.J. , Shumway, C.R., Blake, R.W., Schwart, R.B. and Sudweeks, E.M. 1984. Economic value of days open for Holstein cows of alternative milk yield with varying calving intervals. *J. Dairy Sci.*, 67:636-643.

Hoyer, P.B., Fitz, T.A. and Niswender, G.D. 1984. Hormone-independent activation of adenylate cyclase in large steroidogenic ovine luteal cells does not result in increased progesterone secretion. *Endocrinology*, 114:604-608.

Howell, J.L., Fuquay, J.W. and Smith, A. E. 1994. Corpus luteum growth and function in lactating Hosltein cows during spring and summer. *J. Dairy Sci.*, 77: 735-739.

Hubber, J.T. 1993. Feeding for high production during heat stress. *Western Large Herd Management*. P. 183.

Hubber, J.T. 1994. Heat stress interactions with protein supplemental fat and fungal cultures. *J. Dairy Sci.*, 77:2080.

Hyntell, P.K., Xa, K.P., Smith, S. and Greve, T. 1986. Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 78:615-625.

Hyttel, P., fair, T., Callesen, H. and Greve, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47:23-32.

Ing, N.H. and Tornesi, M.B. 1997. Estradiol upregulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine cells. *Biol. Reprod.*, 56:1215-1215.

Ingraham R.H., Gillete D.D. and Wagner W.D. 1971. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in subtropical climate. *J.Dairy Sci.* 57: 476.

Ingraham R.H., Stanley R.W. and Wagner W.C. 1975. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Hosltein cows in Hawai. *J. Dairy Sci.* 59: 2086.

Ireland, J.J. and Roche, J.F. 1983. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology*, 112:150-156.

Ireland, J.J.,Mihm, M., Austin, E., Diskin, M.G. and Roche, J.F. 2000. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *J. Dairy Sci.*, 83:1648-1658.

Ittner, N.R. and Kelly, C.F. 1951. Cattle shades. *J. Anim. Sci.*, 10:184.

Jabolnka, A.A., Grazul, A.T. Redmer, D.A. and Reynolds, L.P. 1993. Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology*, 133: 1871-1879.

Janovick, J.A. and Conn, P.M. 1996. Progesterone diminishes the sensitivity of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone (LH) release and protects an LH pool from desensitization: action opposed by cholera toxin. *Endocrinology*, 137:1823-1827.

Johnson H.D. and Yeck R.G. 1964. Environmental physiology and shelter engineering. LXVIII. Age temperature effects on TDN, water consumption and balance of dairy calves and heifers exposed to environmental temperatures of 35 to 95 F. Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 865.

Johnson, H.D. 1983. Temperature-humidity effects including influence of acclimatation in feed and water consumption of Holstein cattle. Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bulletin 846, p. 1-22.

Joshi B.C., Joshi H.B., McDowell R.E. and Sadhu D.P. 1968. Composition of skin secretions of three Indian breeds of cattle under thermal stress. J. Dairy Sci. 51:917.

Joyce, I.M., Pendola, F.L., O'Brien, M.J. and Eppig, J.J. 2001. Regulation of prostaglandin –endoperoxidase synthase 2 (COX-2) mRNA expression in mouse granulosa cells during ovulation. Endocrinology, 142:3187-3197.

Juengel, J.L., Nett, T.M., Anthony, R.V. and Niswender, G.D. 1997. Effects of luteotropic and luteolytic hormones on expression of mRNA encoding insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor in the ovine corpus luteum. J. Reprod. Fert., 110:291-298.

Juengel, J.L., Nett, T.M., Tandeski, T.M., Eckery, D.C., Sawyer, H.R. and Niswender, G.D. 1995. Effect of luteinizing hormone and growth hormone on luteal development in hypophysectomized ewes. Endocrine 3:323-326.

Karp, G. 1998. Cell and Molecular Biology. Concepts and experiments. McGraw-Hill. p. 627-670.

Kaye, P.L., Bell, K.L., Dungleison, L.F., Gardner, H.G. and Harvey, M.B. 1992. Insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation and development. Reprod. Fert. Dev., 4:373-386.

Kendrick, K.W., Bailey, L.T., Garst, S.A., Pryor, A.W., Ahmadzadeh, A., Akers, R.M., Eyestone, W.E., Pearson, R.E. and Gwazdauskas, F.C. 1999. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating holstein cows using transvaginal follicular aspiration. J. Dairy Sci., 82:1731-1740.

Kibler, H.H. 1950. Environmental physiology with special reference to domestic animals. Influence of temperature, 5 to 95 F, on evaporative cooling from the respiratory and exterior surfaces in Jersey and Holstein cows. Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bul, 481: 1-18.

Kim, I.H., Son D.S., Yeon, S.H., Choi, S.H., Park, S.B., Ryu, I.S., Suh, G.H., Lee, D.W., Lee, C.S., Lee, H.J., Yoon, J.T. 2001. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*, 55: 937-945.

Kirby, C.J., Smith, M.F., Keisler, D.H. and Lucy, M.C. 1997. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained released bovine somatotropin. *J. Dairy Sci.*, 80:273-285.

Kirby, C.J., Wilson, S.J. and Lucy, M.C. 1997. Response of dairy cows treated with somatotropin to a luteolytic dose of prostaglandin F₂ α. *J. Dairy Sci.*, 80:286-294.

Knijn, H.M., Wrenzycki, C., Hendriksen, J.M., Vos, P.L., Herman, D., Van der Weijden, G.C., Niemann, H. and Dieleman, S.J. 2002. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. *Reproduction*, 124:365-375.

Kraus, W.L. and Katzenellenbogen, B.S. 1993. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonist. *Endocrinology*, 132:2371-2379.

Krisher, R.L. 2004. The effect of oocyte quality on development. *J. Anim. Sci.*, 82(E.Suppl.):E14-E23.

Kubiak, J.Z. Weber, M., de Pennart, H., Winston, N. and Maro, B. 1993. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *Dev. Endocrinol.*, 12:3773-3778.

Kulick, L.J., Kot, K., Wiltbank, M.C. and Ginther, O.J. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*, 52: 913-921.

- Larsen, W.J., Wert, S.E. and Brunner, G.D. 1986. A dramatic loss of cumulus cell gap junction is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev. Biol.*, 113:517-521.
- Lech M.E., and Alrrich R.D. 1997. *Reproduction in dairy cattle*. Purdue University. Cooperative Extension Service.
- Lee, M. and Nurse, P. 1987. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene. *Nature*, 327:31-35.
- Leibfried, M.L. 1996. Gene expression during early embryonic development. *J. Anim. Sci.*, 74:36-49.
- Lenz, R.W., Ball, G.D., Leibfried, M.L., Ax, R.L. and First, N.L. 1983. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biol. Reprod.*, 29:173-179.
- Levesque, J.T. and Sirard, M.A. 1995. Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 42:114-121.
- Lewis G. S., Thatcher W.W., Bliss E. L., Drost M. and Collier R. J. 1984. Effects of heat stress during pregnancy on postpartum reproductive changes in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 58:174.
- Li, R., Norman, R.J., Armtrong, D.T. and Gilchrist, R.B. 2000. Oocyte-secreted factor(s) determine functional difference between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 63:839-845.
- Liebermann, J. and Schams, D. 1994. Actions of somatotropin on oxytocin and progesterone release from the microdialysed bovine corpus luteum in vitro. *J. Endocrinol.*, 143:243-250.
- Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J.F., Clark, B.J., Stocco, D.M., Saenger, P., Rogol, A. and Miller, W.L. 1995. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science*, 267:1828-1831.
- Lin, G.J. 1997. Nutritional management of lactating dairy cows during periods of heat stress. University of Minnesota. Dairy update issue 125.

- Ling, Z.J., Shi, D.S., Huang, H.M., Wei, Y.M., Jiang, R.M., and Lu, K.H. 1989. Pregnancy rate following transfer of bovine embryos at different developmental stages. *Theriogenology*, 31:266.
- Loeckie, L. De Zwart, Meerman, H.N., Commandeur, N.M. and Vermeulen, P.E. 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biol. Med.*, 26:202-226.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P. and Gordon, I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and development competence following maturation, fertilization and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, 37:48-53.
- Lonergan, P., Gutiérrez, A., Pintado, B., Fair, T., Ward, F.A., de la Fuente, J. and Boland, M.P. 2000. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocyst produced in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, 57:146-152.
- Lonergan, P.L., Rizos, D., Ward, F. and Boland, M.P. 2001. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, 41:427-437.
- Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., Yaniz, J., Rutllent, J., Lopez-Bejar, M. 2001. Persisten ovarian follicles in dairy cows: a therapeutic approach. *Theriogenology*, 56: 649-659.
- Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., Yaniz, J., Rutllant, J., Lopez-Bejar, M. 2002. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogenology*, 57:1251-1261.
- Lozano D.R., Leyva R.G. y Moreno F.L. 1992. Efecto del medio ambiente sobre el comportamiento reproductivo y la fertilidad de vacas de la raza Suizo americano en el trópico subhúmedo. *Tec. Pec. Mex.* 30:208.
- Lozano D.R., Gutiérrez G.J., Ornelas J., González R.P., y González P.E. 1999. Efecto de los factores liberadores de las gonadotropinas y la vitamina E al servicio sobre la fertilidad en vacas lecheras. XXXV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Yucatán 1999. México. p. 31.
- Lozano, D.R. y González, P.E. 2003. Efecto del estrés calórico sobre la reproducción de vacas lecheras en sistemas intensivos de producción en México.

Memorias del Simposio Internacional sobre Infertilidad en Vacas Lecheras. Torreón, Coahuila, México.

Lu, K.P. and Means, A.R. 1993. Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. *Endocrinol. Reviews*, 14:40-58.

Lucy, M.C., Staples, C.R., Thatcher, W.W., Erickson, P.S., Cleale, R.M., Firkins, J.L., Clark, J.H., Murphy, M.R. and Brodie, B.O. 1992. Influence of diet composition, dry matter intake, milk production and energy balance on time of postpartum ovulation and fertility in dairy cows. *Anim. Prod.*, 54:323-331.

Lucy, M. 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.*, 83:1635-1647.

Lucy, M.C. and Crooker, B.M. 2001. Physiological and genetic difference between low and high index dairy cows. In *Fertility in High Producing Dairy Cow*. Br. Soc. Anim. Sci. Occasional Publication No 26 Vol. 1, Calway, Ireland. P. 223-226.

Lucy, M.C. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?. *J. Dairy Sci.*, 84:1277-1293.

Luna-Domínguez, J.E., Enns, R.M., Armstrong, D.V. and Ax, R.L. 2000. Reproductive performance of Holstein cows receiving somatotropin. *J. Dairy Sci.*, 83:1451-1455.

Lussier, J.G., Matton, P. And Dufour, J.J. 1987. Growth rates follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fert.*, 81: 301-307.

Lyung, P.Y. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Review*, 74:139-162.

Mann, G.E. and Lamming, G.E. 1995. Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. *J. Reprod. Fert.*, 104:1-5.

Mann, G.E., Lamming, G.E. and Fray, M.D. 1995. Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with Buserelin. *Anim. Reprod. Sci.*, 37:121-131.

Mackey, R.D., Sreenan, M.J., Roche, F.J. and Diskin, G.M. 1999. Effect of acute nutritional restriction on incidence of anovulation and periovulatory estradiol and gonadotropin concentration in beef heifers. *Biol. Reprod.*, 61:1601-1607.

- Marshall, C.J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80:179-185.
- Magdub, A., Johnson, H.D. and Belyea, R.L. 1982. Effect of environmental heat and dietary fiber on thyroid physiology of lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 65:2323-2331.
- Malayer, J.R., Hansen, P.J. and Buhi, W.C. 1988. Effect of day of the oestrus cycle, side of the reproductive tract and heat shock on in-vitro protein secretion by bovine endometrium. *J. Reprod. Fert.*, 84:567-578.
- Malayer J.R. and Hansen P.J. 1990. Differences between Brahman and Holstein cows in heat-shock induced alterations of protein synthesis and secretion by oviducts and uterine endometrium. *J.Anim. Sci.* 68: 266.
- Martín J.M., Wilcox C.J., Moya J. and Klebanow E.W. 1986. Effects of retained fetal membranes on milk yield and reproductive performance. *J.Dairy Sci.* 69:1166.
- Maslar, I.A., Powers.Craddock, A.P. and Ansbacher, R. 1986. Decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium: effects of continuous and intermittent progesterone treatment. *Biol. Reprod.*, 34:741-750.
- Mathew, L., Stevenson, J.S. and Call, E.P. 1986. Controlling first service and calving interval by prostaglandin F2 alpha, gonadotropin releasing hormone, and time of insemination. *J. Dairy Sci.*, 52: 813.
- Markette, K.L., Seidel, G.E., Jr., and Elsdon, R.P. 1985. Estimation of embryonic losses in bovine embryo transfer recipients from progesterone profiles and returns to estrus. *Theriogenology*, 23:45-62.
- McArdle, C.A. and Holtorf, A.P. 1989. oxytocin and progesterone release from bovine corpus luteal cells in culture: effects of insulin-like growth factor I, insulin, and prostaglandins. *Endocrinology*, 124:1278-1286.
- McDowell R.E., Hooven N.W. and Camoens J.K. 1976. Effects of climate on performance of Holstein in first lactation. *J.Dairy Sci.* 59:965.
- McGuire, M.A. 1989. Effects of thermal stress and level of feed intake on portal plasma flow and net fluxes of metabolites in lactating holstein cows. *J. Anim. Sci.*, 67:1050-1060.

McGuire, M.A., Beede, D.K., Collier, R.J., Buonomo, F.C., DeLorenzo, M.A., Wilcox, C.J., Huntington, G.B. and Reynolds, C.K. 1991. Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows. *J. Anim. Sci.*, 69:2050-2056.

McMillan, K.L., Taufa, V.K. and Day, A.M. 1986. Effects of an agonist of gonadotropin releasing hormone (Buserelin) in cattle. III. Pregnancy rates after a postinsemination injection during metaestrous or diestrus *Anim. Reprod. Sci.*, 11:1.

McNatty, K.P., Health, D.A., Lundy, T., Fidler, A.E., Quircke, L., O'Connell, A.O., Smith, P., Groome, N. and Tisdall, D.J. 1999. Control of early ovarian follicular development. *J. Reprod. Fert.*, 54:3-16.

Melvin, E.J., Lindsey, B.R., Quintal, J., Zanella, E., Fike, K.E. Van Tassel, C.P. and Kinder, J.E. 1999. Circulating concentrations of estradiol, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone during waves of ovarian follicular development in prepubertal cattle. *Biol. Reprod.*, 60:405-412.

Mihm, M., Baguisi, A., Boland, M.P. and Roche, J.F. 1994. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J. Reprod. Fert.*, 102:123-130.

Mihm, M., Baguisi, A. and Bleach, E. 1998. FSH decline and dominant follicle selection in heifers. *Animal Reprod Sci.*, 56:1325-1337.

Mihm, M. and Bleach, E.C.L. 2003. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Animal Reprod. Sci.*, 78: 217-237.

Minshull, J. 1993. Cyclin synthesis: who needs it?. *Bioessays*, 15:149-155.

Moor, R. and Dai, Y. 2001. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Reproduction (Suppl)* 58:91-104.

Moller, K. and Fielden, E.D. 1984. Pre-mating injection of an analogue of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and pregnancy rates to first inseminations. *NZ Vet. J.*, 29:214-215.

- Moncef, B. and Stevenson, J. 1981. Gonadotropin releasing hormone and prostaglandin f2 alpha for postpartum dairy cows: estrous, ovulation, and fertility traits. *J. Dairy Sci.*, 69:800.
- Monget, P. and Monniaux, D. 1995. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J. Reprod. Fert.*, 49:321-333.
- Morales-Roura, J.S., Zarco, L., Hernández-Ceron, J. and Rodríguez, G. 2001. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. *Theriogenology*, 55:1831-1841.
- Moreira, F., Orlandi, C., Risco, C.A., Mattos, R., Lopes, F.L. and Thatcher, W.W. 1999. Effects of pre-synchronization and bST treatment on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 77(suppl 1): 222. Abst.
- Moreira, F., Risco, C.A., Pires, M.F., Ambrose, J.D., Drost, M. and Thatcher, W.W. 2000. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.*, 83: 1237-1247.
- Moreira F., Badinga L., Burnley C., and Thatcher W.W. 2001. Effects of bovine somatotropin on embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 55: 535 (abstr).
- Moreira, F., Badinga, L., Burnley, C., Thatcher, W.W. 2002. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*, 57:1371-1387.
- Monniaux, D., Chupin, D.D. and Saumande, J. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19:55-81.
- Monty, D.E. Jr. and Racowsky, C. 1987. In vitro evaluation of early embryo viability and development in summer heat-stressed, superovulated dairy cows. *Theriogenology*, 28: 451-465.
- Nebel, R.L. and McGilliard, M.L. 1993. Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 76: 3257-3268.

Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K. and McIntush, E.W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, 80:1-29.

Olsson, S.E. and Seidel, G.E.Jr. 2000. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biol. Reprod.*, 62:248-252.

Opsomer, G., Coryn, M., Deluyker, H. and de Kruif, A. 1998. An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. *Reprod. Domest. Anim.*, 33: 193-204.

Opsomer, G., Grohn, Y.T., Hertl, J., Coryn, M., Deluyker, H. and de Kruif, A. 2000. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology*, 53: 841-857.

Osen, S., Misztal, I., Tsuruta, S. and Rekaya, R. 2003. Seasonality of days open in US Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 86: 3718-3725.

Oltenacu P.A., Britt J.H., Braun R.K. and Mellenberger R.W. 1983. Relationship among type of parturition, types of discharge from genital tract, involution of cervix and subsequent reproductive performance in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 66: 612.

Oltenacu, P.A., Frick, A. and Lindhe, B. 1991. Relationship of fertility to milk yield in Swedish cattle. *J. Dairy Sci.*, 74: 264-268.

Padykula, H.A., Coles, L.G., Okulicz, W.C., Rapaport, S.I., McCracken, J.A., King, N.W., Longcope, C. And Kaiserman-Abramof, J.R. 1989. The basalis of the primate endometrium a bifunctional germinal compartment. *Biol. Reprod.*, 40:681-690.

Palma, G.A., Clement, S.A. and Krefft, H. 1993. In vitro production of cattle embryos from calf oocytes. *Theriogenology*, 39:278 (Abstr.).

Palma, G.A., Muller, M. and Brem, G. 1997. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 110:347-353.

Papadopoulos, V., Amri, H., Boujrad, N., Vidic, B. and Garnier, M. 1997. Targeted disruption of the peripheral-type benzodiazepine receptor gene inhibits

steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line. *J. Biol. Chem.*, 272:32129-32135.

Parmer, T.G., Roberts, C.T., Leroith, D., Adashi, E.Y., Khan, I., Solan, N., Nelson, S., Zelberstein, M. and Gibori, G. 1991. Expression, action, and steroidal regulation of insulin-like growth factors-I (IGF-I) and IGF-I receptor in the rat corpus luteum: their differential role in the two cell population forming the corpus luteum. *Endocrinology*, 129:2924-2932.

Pate, J.L. and Condon, W.A. 1982. Effects of serum and lipoprotein on steroidogenesis in cultured bovine luteal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 28:551-562.

Payas, A.J., Broadbent, P.J., Dolman, D.F., and Christie, W.B. 1989. Factors affecting pregnancy rate in embryo transfer recipients with reference to plasma progesterone. *Theriogenology*, 31:238.

Pavlok, A., Lucas, A.H. and Nieman, H. 1992. Fertilization and development competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, 31:63-67.

Payton, R.R., Lawrence, J.L., Saxton, A.M., Dunlap, J.R. and Lannett, E.J. 2001. Cytoplasmic and nuclear maturation of bovine oocytes after exposure to elevated temperature during maturation. *J. Cell Biol.*, 34:312-324.

Perks, M.C., Denning, P.A., Gilmour, R.S. and Wathes, D.C. 1995. Localization of messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factor (IGF-I), IGF-II and type I IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrus cycle. *Endocrinology*, 136:5266-5273.

Peters, M.W. and Pursley, J.R. 2002. Fertility of lactating dairy cows treated with ovsynch after presynchronization injections of PGF_{2α} and GnRH. *J. Dairy Sci.*, 85:2403-2406.

Prasad, G.S., Butterfield, D.A., Hensley, K., Shaw, W. and Carney, J.M. 1997. Aging and caloric restriction affect mitochondrial respiration and lipid membrane status: an electron paramagnetic resonance investigation. *Free Radical Biol. Med.*, 23(2):191-201.

Pursley, J.R., Mee, M.O. and Wiltbank, M.C. 1995 b. Synchronization of ovulation in dairy cows using PgF₂ alpha and GnRH. *Theriogenology*, 44:915-923.

- Pursley, J.R., Fricke, P.M., Garverick, H.A., Kesler, D.J., Ottobre, J.S., Stevenson, J.S. and Wiltbank, M.C. 2001. NC-113 Regional Research Project. Improved fertility in noncycling lactating dairy cows treated with exogenous progesterone during Ovsynch. Midwest Branch ADSA 2001. Meeting, Des Moines, IA, 63. abst.
- Putney, D.J. Mullins, S., Thatcher, W.W. Drost, M. and Gross, T.S. 1989 b. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 19:37.
- Putney, D.J. Mullins, S., Thatcher, W.W. Drost, M. and Gross, T.S. 1989 c. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post-inseminations. *Theriogenology*, 30:195.
- Putney, D.J., Drost, M. and Thatcher, W.W. 1989 a. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology*, 31: 765-778.
- Ray D. E., Halbach T. J. and Armstrong D. V. 1992. Season and lactation number effects on milk production and reproduction of dairy cattle in Arizona. *J. Dairy Sci.*75:2976.
- Ravagnolo, O. and Misztal, I. 2002. Effect of heat stress on nonreturn rate in Holsteins: fixed-model analyses. *J. Dairy Sci.*, 85: 3101-3106.
- Reed, S.I. 1992. The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 8:529.
- Reed, M.L., Roussel, J.D., and Seybt, S.H. 1985. Repeatability of clod serum progesterone levels in dairy heifers on day 7 of the estrous cycle. *Theriogenology*, 24:643-646.
- Rettmer, I. Stevenson, J.S. and Corah, L.R. 1992. Pregnancy rates in beef cattle after administering a GnRH agonist 11 to 14 days after insemination. *J. Anim. Sci.*, 70:7-12.
- Revah, I. and Butler, R. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 106:39-47.

- Reynaud, K., Cortvrindt, R., Smitz, J. and Driancourt, M.A. 2000. Effects of a kit ligand and anti-kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, 56:483-494.
- Ribadu, A.Y., Nakada, K., Tanaka, Y., Moriyoshi, M., Zhang, W. and Nakao, T. 1999. Lack of LH response to exogenous estradiol in heifers with ACTH-induced ovarian follicular cysts. *J. Vet. Med. Sci.*, 61:979-981.
- Ribadu, A.Y., Nakada, K., Moriyoshi, M., Zhang, W.C., Tanaka, Y., Nakao, T. 2000. The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 64:21-31.
- Risco, M. 2002. *J. Dairy Sci.*, 85:345-364.
- Rivera, R.M. and Hansen, P.J. 2001. Development of culture bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *J. Reprod. Fert.*, 121: 107-115.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P. and Lonergan, P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.*, 61:234-248.
- Rocha A., Randel R. D., Broussard J. R., Lim J. M., Blair R. M., Roussel J. D., Godke R. A. and Hansel W. 1998. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *bos taurus* but not in *bos indicus* cows. *Theriogenology*. 49:657.
- Roche, J.F. 1996. Control and regulation of folliculogenesis – a symposium in perspective. *J.Reprod. Fert.*, 1: 19-27.
- Roche, J.F., Austin, E.J., Ryan, M., Rourke, M.O., Mihm, M. and Diskin, M.G. 1999. Regulation of follicle waves to maximize fertility in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 54:61-71.
- Roche, J.F., Mackey, D. and Diskin, M.D. 2000. Reproductive management of postpartum cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:703-712.

- Remsen, L.G., Roussel, J.D. and Karihaloo, A.K. 1982. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. *Theriogenology* 18: 365-372.
- Rodríguez, L.A. 1985. Effects of relative humidity, maximum and minimum temperature, pregnancy, and stage of lactation on milk composition and yield. *J. Dairy Sci.*, 68: 973-978.
- Roman-Ponce H., Thatcher W.W., Buffington D.E., Wilcox C.J. and Van Horn H.H. 1977. Physiological and production responses of dairy cattle to a shade structure in a tropical environment. *J. Dairy Sci.* 60:424.
- Rosenberg, M., Folman, Y., Herz, Z., Flamenbaum, I., Berman, A. and Kaim, M. 1982. Effect of climatic conditions on peripheral concentrations of LH, progesterone and oestradiol-17B in high milk-yielding cows. *J. Reprod. Fert.*, 66:139-146.
- Rosenfeld, C.S., Wagner, J.S., Roberts, R.M. and Lubahn, D.B. 2001. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction*, 122:215-226.
- Roth, Z., Meidan, R., Braw-Tal, R. and Wolfenson, D. 2000. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J. Reprod. Fert.*, 120:83-90.
- Roth, Z., Meidan, R., Shaham-Albalancy, A., Brawl, R. and Wolfenson, D. 2001 a. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction*, 121:745-751.
- Roth, Z., Arav, A., Zeron, Y., Braw-Tal, R. and Wolfenson, D. 2001 b. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction*, 122:737-744.
- Royal, M.D., Darwash, A.O., Flint, A.P.F. Webb, R., Wolliams, J.A. and Lamming, G.E. 2000. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Anim Sci.*, 70: 487-501.
- Royal, M., Mann, G.E. and Flint, A.P. 2000. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, 160: 53-60.

Rousel, J.D. and Chandler, J. 1984. Dairy Science Research 1929-1984. LSU Department of Dairy Science, Baton Rouge, LA.

Rutledge, J.J. 2001. Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. *Theriogenology*, 55: 105-11.

Ruíz-Cortes, Z.T. and Olivera, M. 1999. Ovarian follicular dynamics in suckled zebu (*Bos indicus*) cows monitored by real time ultrasonography. *Anim. Reprod. Sci.*, 54:211-220.

Ryan, D.P., Prichard, J.F., Kopel, E. and Godke, R.A. 1993. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology*, 39: 719-737.

Sagata, N. Watanabe, Vande, G.F and Ikawa, Y. 1989. The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for mitotic arrest in vertebrate eggs. *Nature*, 342:512-518.

Sakaguci, M., Dominko, T., Yamauchi, N., Liebfried, M.L., Nagai, T. and First, N.L. 2002. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. *Reproduction*, 123:135-142.

Sánchez, T., Wehrman, M.E., Bergfeld, E.G., Peters, K.E., Kojima, F.N., Cupp, A.S., Mariscal, R.J., Rasby, R.J. and Kinder, J.E. 1993. Pregnancy rate is greater when the corpus luteum is present during the period of progestin treatment to synchronize time of estrus in cows and heifers. *Biol. Reprod.*, 49:1102-1107.

Sánchez, T., Wehrman, M.E., Kojima, F.N., Cupp, A.S., Bergfeld, E.G., Peters, K.E., Mariscal, R.J. and Kinder, J.E. 1995. Dosage of the synthetic progestin, norgestomet, influences luteinizing hormone pulse frequency and endogenous secretion of 17 β -Estradiol in heifers. *Biol. Reprod.*, 52:464-469.

Santos, J.E.P., Thatcher, W.W., Pool, L. and Overton, M.W. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high producing lactating Holstein dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 56:213-224.

Sartori, S., Sartor-Bergfeld, R., Mertens, S.A., Guenther, J.N., Parrish, J.J., Wiltbank, M.C. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and

lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.*, 85:2803-12.

Sauerwien, H., Miyamoto, A., Gunther, J., Meyer, H.D. and Schams, D. 1992. Binding and action of insulin-like growth factors and insulin in bovine luteal tissue during the oestrus cycle. *J. Reprod. Fert.*, 96:103-115.

Savio, J.D., Keenan, L., Boland, M.P. and Roche, J.F. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fert.*, 83: 663.

Savio, J.D., Boland, M.P. Hynes, N., Mattiacci, M.R. and Roche, J.F. 1990 a. Will the first dominant follicle of the estrous cycle of heifers ovulate following luteolysis on day 7 ?. *Theriogenology*, 33:677-687.

Savio J.D., Thatcher W.W., Badinga L. and De la Sota R.L. 1990 b. Turnover of dominant ovarian follicles as regulated by progestins and dynamics of LH secretion in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 6: 23.

Savio, J.D., Boland, M.P., Hynes, N. and Roche, J.F. 1990 c. Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. *J. Reprod. Fert.*, 88:569-579.

Savio, J.D. Thatcher, W.W., Badinga, L., De la Sota, R. and Wolfenson, D. 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrus cycle in cows. *J. Reprod. Fert.*, 97: 197-203.

Schneider, P.L. 1984. Influence of dietary sodium and potassium bicarbonate and total potassium on heat-stressed lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 67:2546-2553.

Schneider, P.L., Beede, D.K. and Wilcox, C.J. 1988. Nycterothermal patterns of acid-base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat environments. *J. Anim. Sci.*, 66:112-125.

Segerson E.C. Jr., Murray F.A., Moxon A.L., Redman D.R. and Conrad H.R. 1977. Selenium/vitamin E: role in fertilization of bovine ova. *J. Dairy Sci.* 60: 1001.

Schwarze, S.R., Weindruch, R. and Aiken, J.M. 1998. Oxidative stress and aging reduce cox I RNA and cytochrome oxidase activity in drosophila. *Free Radical Biol. Med.*, 25:740-747.

- Scott, H. L, Meint, J de Vries and Ynte, H. S. 1999. The effects of time of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 82: 2589-2604.
- Shearer, J.K. and Beede, D.K. 1990 a. Thermoregulation and physiological response of dairy cattle in hot weather. *Agri-Practice* 11:4.
- Shearer J. K. and Beede D. K. 1990 b. Effects if high environmental temperature on production, reproduction, and health of dairy cattle. *Agri Practice* 11:6.
- Shearer, J.K. and Bray, D.R. 1994. Maintenance of udder health and milk quality during periods of hot weather. University of Florida Extension Service VI-2-1.
- Shearer, J.K. 1996. Utilizing shade and cooling to reduced heat stress. Dairy Management Seminar.State University. P.1.
- Shimada, M.A. 2003. Nutrición Animal. Metabolismos. Ed. Trillas. p. 134-176.
- Short, R.E., Belows, R.A., Staigmiller, R.B., Berardinelli, J.G. and Custer, E.E. 1990. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 68:799-816.
- Sianangama, P.C. and Rajamahendran, R. 1992. Effect of human chorionic gandotropin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. *Theriogeneology*, 38:85-96.
- Silva H.M., Wilcox C.J., Spurluck A.H., Martín F.G. and Becker R.B. 1986. Factors affecting age at first parturition, lifespan, and vital statistics of Florida dairy cows. *J.Dairy Sci.* 69: 470.
- Simpson, E.R. and Waterman, M.R. 1983. Regulation by ACTH of steroid hormone biosynthesis inthe adrenal cortex. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, 61:692-707.
- Sirois, J. and Fortune, J.E. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.*, 39: 308.
- Smith, A.K., Broadbent, P.J., Dolman, D.F., Grimmer, S.P., Davies, D.A. and Dobson, H. 1996. Norgestomet implants, plasma progesterone concentrations and embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Vet. Rec.*, 139:187-191.

- Smith, L.C., Olivera-Angel, M., Groome, N.P., Bathia, B. and Price, C.A. 1996. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 106:193-199.
- Smith, J.M. and Jennes, L. 2001. Neural signals that regulate GnRH neurons directly during the oestrus cycle. *Reproduction*, 122:1-10.
- Smith, A.K., Grimmer, S.P. 2002. Pregnancy rates for grade 2 embryos following administration of synthetic GnRH at the time of transfer in embryo-recipient cattle. *Theriogenology*, 57:2083-2091.
- Sorensen, R. and Wassarman, P.M. 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.*, 50:531-536.
- Shultz, G.A., Hahnel, A., Arcellana, P.L., Wang, L., Goubau, S., Watson, A. and Harvey, M. 1993. Expression of IGF ligand and receptor genes during preimplantation mammalian development. *Biol. Reprod.*, 35:414.
- Shultz, G.A., Harvey, M.B., Watson, A.J., Arcellana, M.Y., Jones, K. and Westhusin, M.E. 1996. Regulation of early embryonic development by growth factors: growth factor gene expression in cloned bovine embryos. *J. Anim. Sci.*, 74(supl. 3):50-57.
- Spell, A.R., Beal, W.E, Corah, L.R., Lamb, G.C. 2001. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, 56:287-297.
- Spicer, L.J., Chamberlain, C.S. and Francisco, C.C. 2000. Ovarian action of leptin – effects on insulin-like growth factor-I – Stimulated function of granulosa and thecal cells. *Endocrine*, 12:53-59.
- Spicer, L.J., Alonso, J. and Chamberlain, C.S. 2001. Effects of thyroid hormone on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins. *J. Dairy Sci.*, 84:1069-1076.
- Sreenan, J.M. and McDonagh, T. 1979. Comparison of the embryo survival rate in heifers following artificial insemination, non-surgical blastocyst transfer or both. *J. Reprod. Fert.*, 56:281-284.

- Stagg, K., Diskin, M.G. , Sreenan, J.M. and Roche, J.F. 1995. Follicular development in long-term anoestrous suckler beef cows fed two levels of energy postpartum. *Anim. Reprod. Sci.*, 38:49-61.
- Staples, C.R. Thatcher, W.W. and Clark, J.H. 1990. Relationship between ovarian activity and energy status during the early post-partum period of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 73: 938-947.
- Sterner, R.A. 1986. Effect of drinking water temperature on heat stress of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 69:546.
- Stevens, V.L., Xu, T. and Lambeth, J.D. 1993. Cholesterol trafficking in steroidogenic cells: reversible cycloheximide-dependent accumulation of cholesterol in a presteroidogenic pool. *J. Biochem.*, 216:557-563.
- Stevenson J.S., Frantz K.D. and Call E.P. 1988. Conception rates in repeat-breeders and dairy cattle with unobserved estrus after prostaglandin f2 alpha and gonadotropin-releasing hormone. *Theriogenology*, 29: 451.
- Stevenson, J.S. 1997. Costo – beneficio del manejo reproductivo. *Memorias del 5o Encuentro Nacional de Ganaderos Lecheros 1997*. p. 20-39.
- Stevenson, J.S., Kobayashi, Y. and Thompson, K.E. 1999. Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including Ovsynch and combinations of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F_{2α}. *J. Dairy Sci.*, 82:506-515.
- Stevenson J.S., Schmidt M.K. and Call E.P. 1984. Gonadotropin releasing hormone and conception of Holstein. *J. Dairy Sci.* 67: 140.
- Stott G.H. 1961. Female, and breed associated with seasonal fertility variations in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 44: 1698.
- Strinden, S.T. and Shapiro, S.S. 1983. Progesterone-altered secretory proteins from cultured human endometrium. *Endocrinology*, 112: 862-870.
- Sylvie, B. 2001. Effect of oocyte quality on the relative abundance of specific gene transcripts in bovine mature oocytes and 16-cell embryo. Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge Research Centre.

- Taft, R.A., Denegre, J.M., Pendola, F.L. and Eppig, J.J. 2002. Identification of genes encoding mouse oocyte secretory and transmembrane proteins by a signal sequence trap. *Biol. Reprod.*, 67:953-960.
- Talavera J.C., De la Fuente E.G. y Berruecos V. J.M. 1973. Pérdidas económicas por problemas reproductores. III. Edad y causas por las que son desechadas en México las vacas lecheras estabuladas. *Tec. Pec. Mex.* 24:21.
- Tezuka, N. , Ali, M., Chawalis, K. and Gardfield, R.E. 1995. Changes in the transcripts encoding calcium channel subunits of rat myometrium during pregnancy. *AM. J. Physiol.*, 269:1008-1017.
- Thatcher, W.W. 1974. Effect of season climate, and temperature on reproduction and lactation. *J. Dairy Sci.*, 57:360-368.
- Thatcher, W.W., Hansen, P.J., Gross, T.S., Helmer, S.D., Plante, C. and Bazer, F.W. 1989. Antiluteolytic effects of bovine trophoblast protein – 1. *J. Reprod. Fert.*, 37:91.
- Thatcher, W.W., Staples, C.R., Danet-Desnoyers, G., Oldick, B. and Smitt E.J. 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. Anim. Sci.*, 72:16-30.
- Thatcher, W.W., de la Sota, R.L., Schmitt, E. J.-P., Díaz, T.C., Badinga, L., Simmens, F.A., Staples, C.R. and Drost, M. 1996. Control and management of ovarian follicles in cattle to optimize fertility. *Reprod. Fert. Dev.*, 8:203-217.
- Thompson, J.A., Magee, D.D., Tomaszewski, M.A., Wilks, D.L. and Fourdraine, R.H. 1996. Management of summer infertility in Texas Holstein dairy cattle. *Theriogenology*, 46:547-558.
- Thuemmel, A.E., Gwazdauskas, F.C., Whittier, W.D., McGilliard, M.L. 1992. Effect of progesterone supplementation in repeat-breeder cattle on conception and plasma progesterone. *J. Endocrinol Inves*, 15:393-396.
- Tiirats, T. 1997. Thyroxine, triiodothyronine and reverse-triiodothyronine concentrations in blood plasma in relation to lactational stage, milk yield, energy and dietary protein intake in Estonian dairy cows. *Acta Vet. Scand.*, 38:339-348.

Townson, D.H., Tsang, P.C., Butler, W.R., Frajblat, M., Griel, L.C. Jr., Johnson, C.J., Milvae, R.A., Niksic, G.M. and Pate, J.L. 2002. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 80:1053-1058.

Trenckle, A. 1978. Relation of hormonal variations to nutritional studies and metabolic of ruminants. *J. Dairy Sci.*, 61:281-293.

Trout, P.J., McDowell. L.R. and Hansen, P.J. 1998. Characteristics of estrous cycle and antioxidant status of lactating holstein cows exposed to heat stress. *J.Dairy Sci.*, 81: 1244.

Turner, W.L., Warner, R.C. and Chastain, J.P. 1994. Micro-sprinkler and fan cooling for dairy cows: practical design considerations. Cooperative Extension Service. University of Kentucky. College of Agriculture.

Ullah, G., Fuquay, J.W., Keawkhong, T., Clark, B.L., Pogue, D.E. and Murphey, E.J. 1997. Effect of gonadotropin-releasing hormone at estrus on subsequent luteal function and fertility in lactating Holstein during heat stress. *J. Dairy Sci.*, 79:1950-1953.

Umphrey, J.E., Moss, B.R., Wilcox, C.J. and Van Horn, H.H. 2001. Interrelationships in lactating holstein of rectal and skin temperatures, milk yield and composition, dry matter intake, body weight, and feed efficiency in summer in Alabama. *J. Dairy Sci.*, 84:2680-2685.

Valdespino, O.R. 1991. Principales causas que reducen la vida productiva de las vacas y su costo para el establo. Estudio de caso. *Reun. Nac. Inv. Pec. Mex.*, p. 165.

Vasconcelos, J.L.M., Sartori, R., Oliveira, H.N., Guenther, J.G. and Wiltbank, M. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56:307-314.

Verbeck, R., Smith, F.J. and Armstrong, V.D. 1994. Heat stress in dairy cattle. New México State University and the department of agriculture cooperating.

- Vozzi, C., Formenton, A., Chanson, A., Senn, A., Sahli, R., Shaw, P., Nicod, P., Germond, M. and Haefliger, J.A. 2001. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. *Reproduction*, 122:619-628.
- Washburn, S.P., Silva, W.J., Brown, C.H., McDaniel, B.T. and McAllister, A.J. 2002. Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J. Dairy Sci.*, 85: 244-251.
- Watson, A.J., Westhusin, M.E., De Sousa, P.A., Betts, D.H. and Barcroft, L.C. 1999. Gene expression regulating blastocyst formation. *Theriogenology*, 51:117-133.
- Wayman O., Johnson H.D., Merilan C.P. and Berry I.I. 1962. Effect of ad libitum and force feeding of two rations on lactating dairy cows subject to temperature stress *J. Dairy Sci.* 45:1472.
- Webb, R., Campbell, B.K., Garverick, H.A., Gong, J.G., Gutiérrez, G.C. and Armstrong, D.G. 1999. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J. Reprod. Fert.*, suppl 54: 33-48.
- Webb, R.J., Bains, H., Cruttwell, C. and Carroll, J. 2002. Gap-junctional communication in mouse cumulus-oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction*, 123:41-52.
- Webb, R., Nicholas, B., Gong, J.G., Campbell, B.K., Gutiérrez, C.G., Garverick, H.A. and Armstrong, D.G. 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *J. Reprod. Fert.*, 61:1-20.
- West, N.B., McClellan, M.C., Sternfeld, M.D. and Brenner, R.M. 1987. Immunocytochemistry versus binding assays of the estrogen receptor in the reproductive tract of spayed and hormone-treated macaques. *Endocrinology*, 121:1789-1800.
- West, J.W. 1991. The use of bovine somatotropin in heat stress conditions. *J. Dairy Sci.*, 74 (suppl 1):302.
- West, J.W., Mullinix, B.G., and Sandifer, T.G. 1991. Effects of physiologic responses of lactating Holstein and Jersey cows during hot, humid weather. *J. Dairy Sci.*, 74: 840-851.

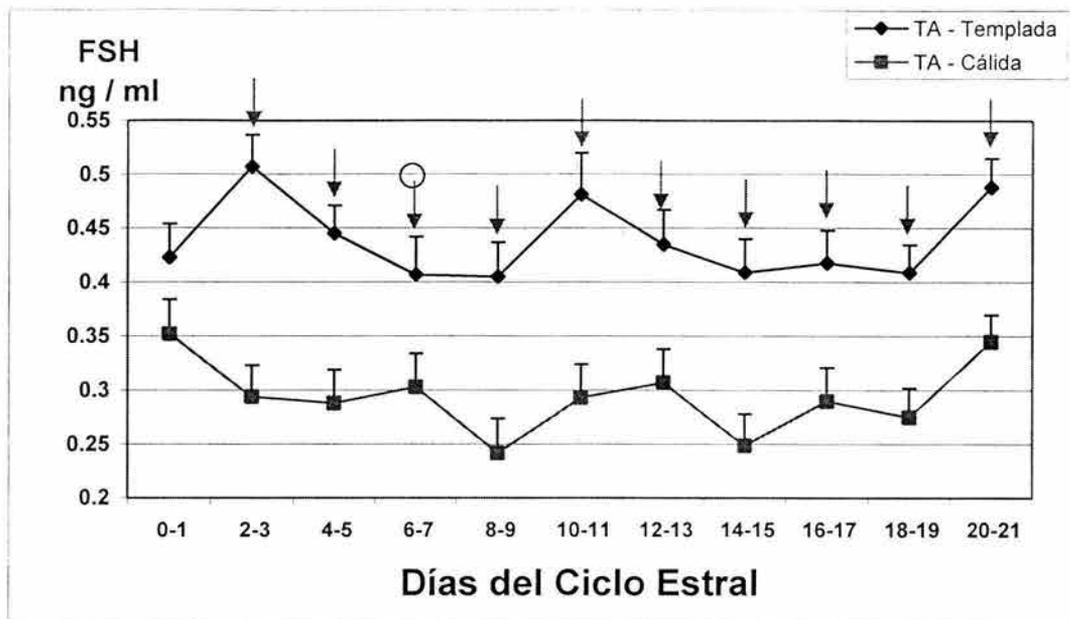
- West, J.W. 1995. Managing and feeding lactating dairy cows in hot weather. Cooperative Extension Service. University of Georgia. College of Agricultural and Environmental Sciences.
- West, J.W. 1996. Dietary Management of heat stress cows: secrets of southern cooking. Proc., 1996. Heart of America Dairy Management. Kansas State University. p. 135.
- West J.W. 1999. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. J. Anim. Sci. 77: 21.
- West, J.W. 2003. Effects of heat stress on production in dairy cattle. J.Dairy Sci., 86:2131-2144.
- Whitaker, M. 1996. Control of meiotic arrest. Reviews of Reprod., 1:127-135.
- Willard, S., Gandy, S., Bowers, S., Graves, K., Elias, A., Whisnant, C. 2003. The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. Theriogenology, 59:1799-1810.
- Wilson, S.J., Marion, R.S., Spain, J.N., Spiers, D.E., Keisler, D.H. and Lucy, M. 1998. Effect of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. J.Dairy Sci., 81: 2124-2131.
- Wilson, S.J., Kirby, C.J., Koenigsfeld, A.T., Keisler, D.H. and Lucy, M.C. 1998. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. J. Dairy Sci., 81:2132-2138.
- Wise, M.E., Armstrong, D.V., Huber, J.T., Hunter, R. and Wiersma, F. 1988. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. J. Dairy Sci., 71: 2480-2485.
- Wolfenson, D., Flamenbaum, I. And Berman, A. 1988. Hyperthermia and body energy store effects on estrous behavior, conception rate, and corpus luteum function in dairy cows. J. Dairy Sci., 71:3497-3504.
- Wolfenson, D., Luft, O., Berman, A. and Meidan, R. 1993. Effect of season, incubation temperature and cell age on progesterone and prostaglandin f2 alpha production in bovine luteal cells. Anim. Reprod. Sci., 32: 27-40.

- Wolfenson D., Kaim M., Rosenberg M., 1994. Conception rate of cows supplemented with progesterone post-insemination in the summer. *J. Anim. Sci.* 72 (Suppl. 1). 280.
- Wolfenson, D., Thatcher, W.W., Badinga, L., Savio, J.D., Meidan, R., Lew, B.J., Braw-tal, R. and Berman, A. 1995. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol. Reprod.*, 52: 1106-1113.
- Wolfenson, D., Lew, B.J., Thatcher, W.W., Graber, Y. and Meidan R. 1997. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 47: 9-19.
- Wolfenson, D., Roth, Z. and Meidan, R. 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.*, 60:535-547.
- Wray, C. 1975. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. *Vet. Bulletin*, 45:543-553.
- Yan, C., Wang, P. and De Mayo, J. 2001. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol. Endocrinol.*, 15:854-866.
- Yau-Huei, W. 1998. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging (44205). *Society for Experimental Biology and Medicine*. P. 53-63.
- Yeates N.T.M. 1956. The influence of nutritional state on heat tolerance of cattle. *Nature*. 178:702.
- Yoshioka, K., Iwamura, S. and Kamomae, H. 1998. Changes of ovarian structures, plasma LH, FSH, progesterone and estradiol-17 β in cow with ovarian cysts showing spontaneous recovery and relapse. *J. Vet. Med. Sci.*, 60:257-260.
- Yuan, W., Bao, B., Garverick, H.A., Youngquist, R.S. and Lucy, M.C. 1998. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Domestic Anim. Endocrinology*, 15:55-63.
- Yu P., Huber J.T., Theurer C.B., Chen K.H., Nussio L.G., and Wu Z. 1997. Effect of steam-flaked or steam-rolled corn with or without *Aspergillus oryzae* in the diet on performance of dairy cows fed during hot weather. *J. Dairy Sci.* 80:3293.

Zeron, Y., Ocheretny, A., Kedar, O., Borochoy, A., Sklan, D. and Arav, A. 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*, 121:447-454.

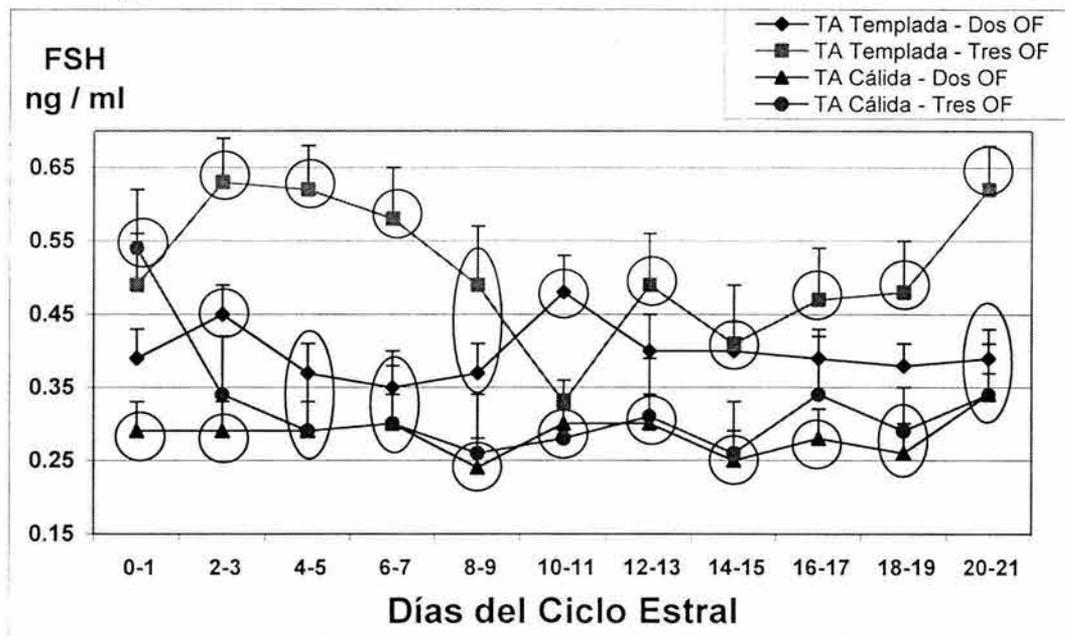
APENDICE I
Gráficas que no fueron incluidas en el artículo del capítulo tres

GRÁFICA 1. Concentraciones séricas de la hormona folículo estimulante (FSH) para el efecto de época previa al período de estudio (TA), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días



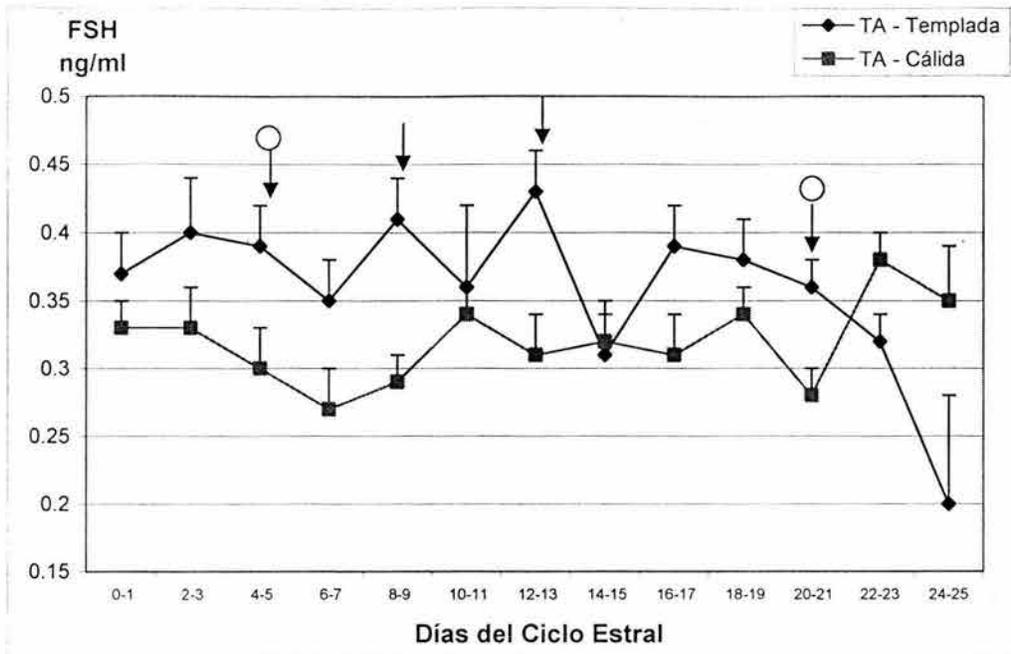
↓ (P<0.01) ○ (P<0.05)

GRÁFICA 2. Concentraciones séricas de la hormona folículo estimulante (FSH) a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la época previa al estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

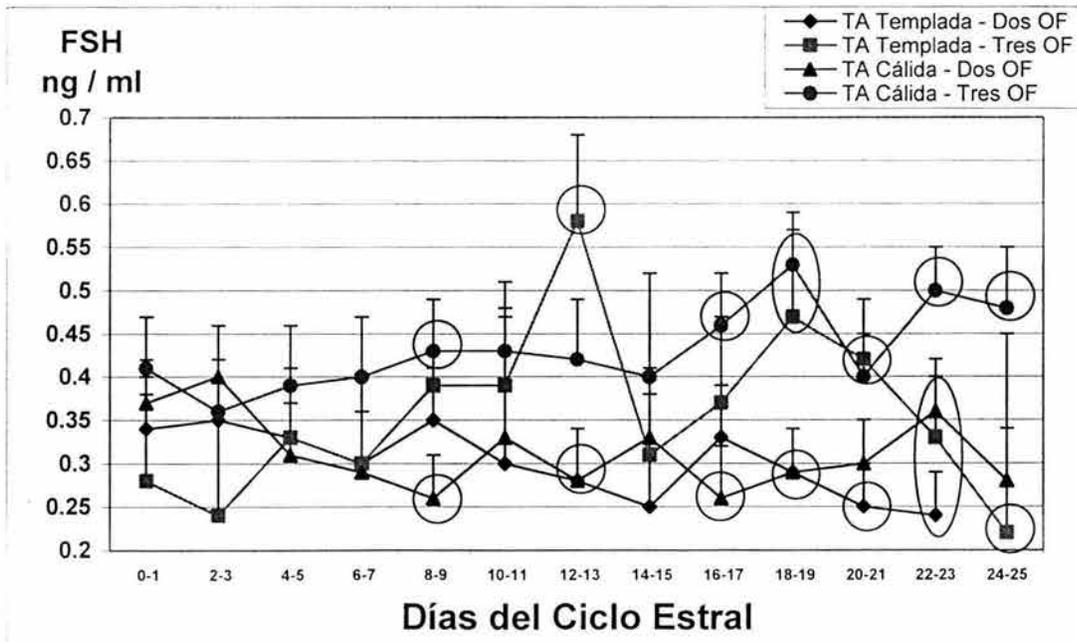


Valores circulados entre ellos indican diferencia, dentro de los mismos días del ciclo estral, Indican diferencia significativa (P<0.05).

GRÁFICA 3. Concentración sérica de la hormona folículo estimulante (FSH) para el efecto de la época previa (TA) al período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

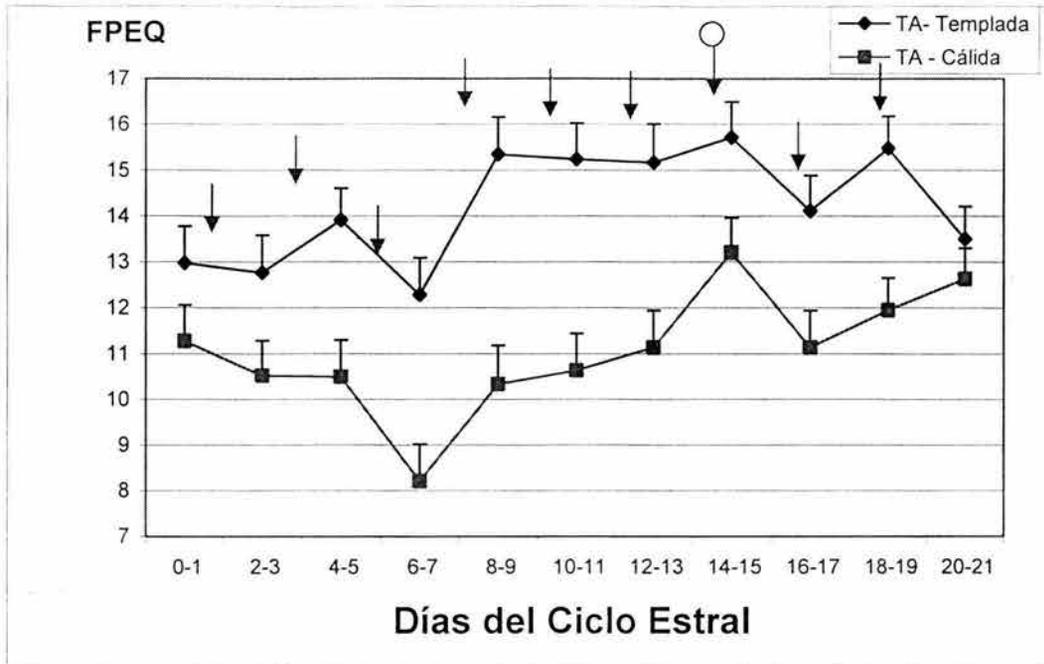


GRÁFICA 4. Concentraciones séricas de hormona folículo estimulante (FSH), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la fase previa al estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



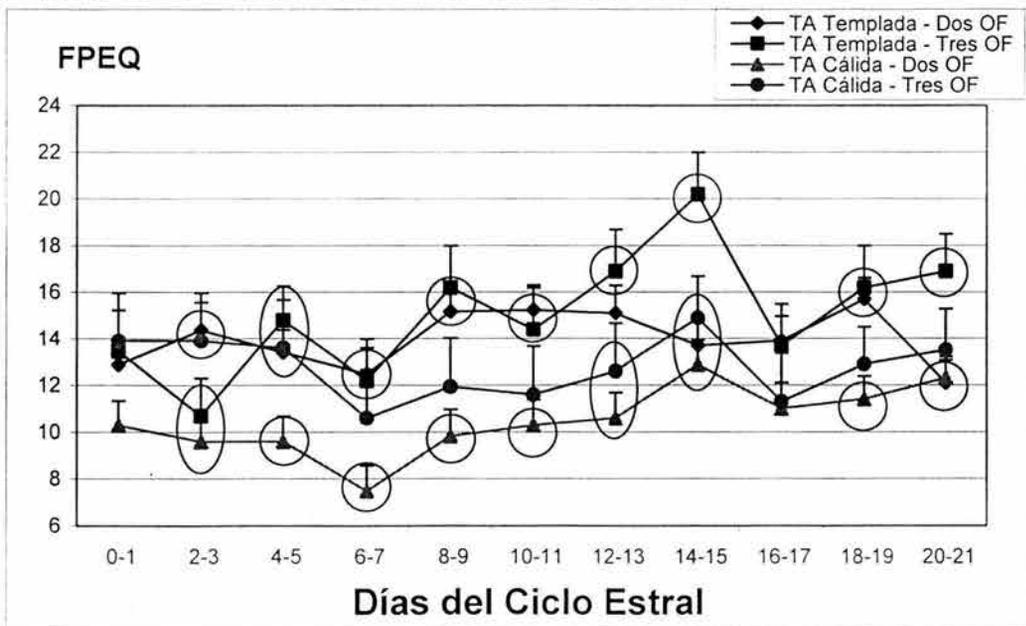
Valores circulados entre ellos indican diferencia, dentro de los mismos días del ciclo estral, Indican diferencia significativa (P<0.05).

GRÁFICA 5. Número de folículos menores de 5 mm (FPEQ) para el efecto de época (TA) previa al estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días



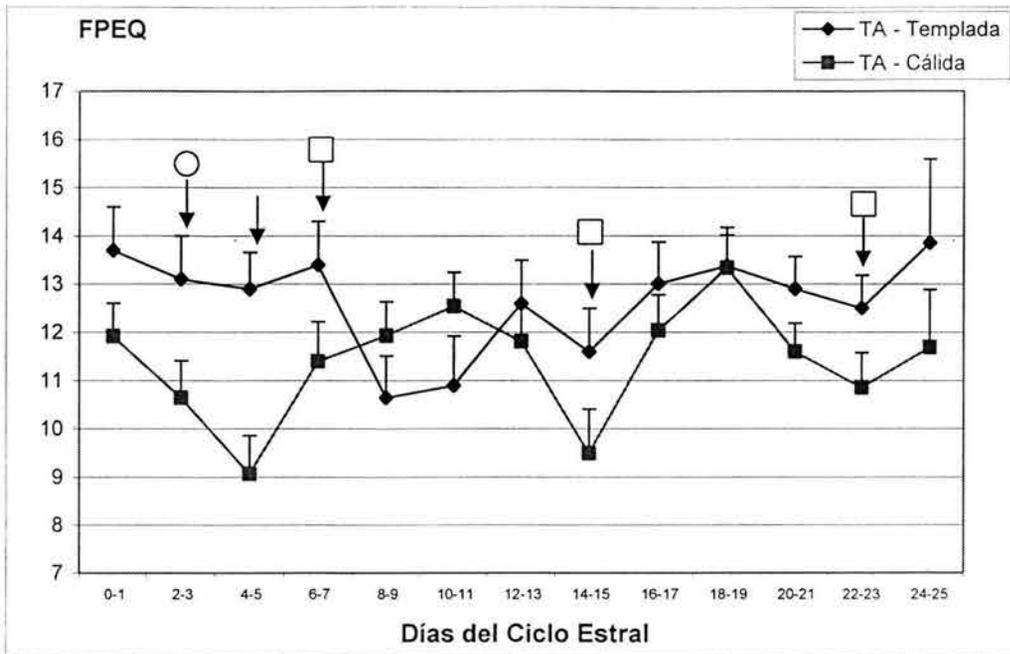
↓ (P<0.01) ○ (P<0.05)

GRÁFICA 6. Número de folículos pequeños (FPEQ), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas previa a la fase de estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días



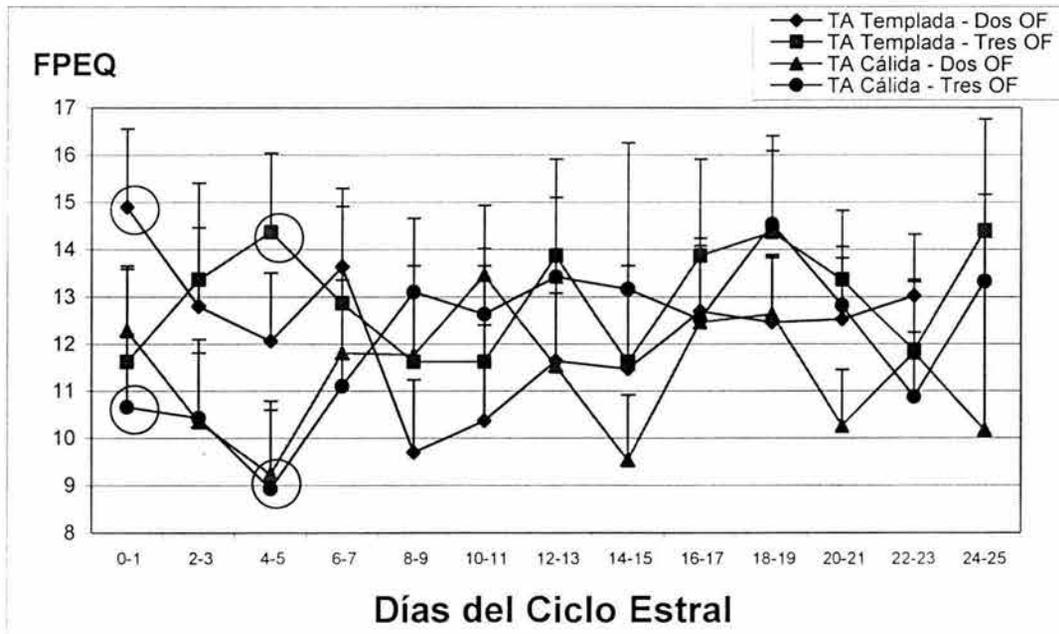
Valores circulados en los mismos días del ciclo estral, indican diferencia significativa (P<0.05).

GRÁFICA 7. Número de folículos pequeños (FPEQ) para el efecto de la época previa al período de estudio (TA), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



↓ (P<0.01) ○ (P<0.05) □ (P<0.1)

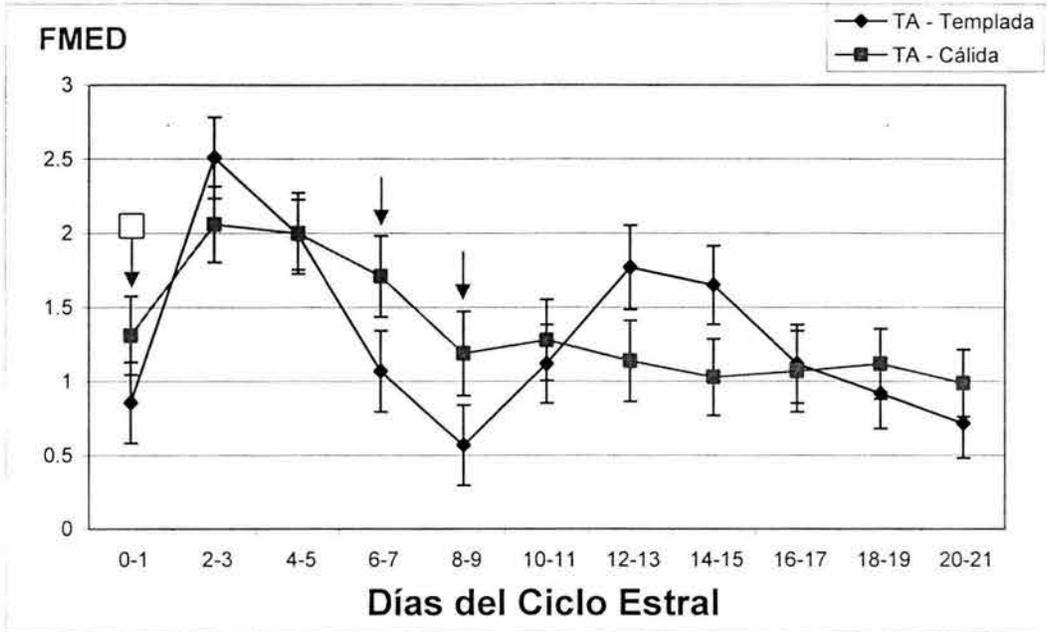
GRÁFICA 8. Número de folículos pequeños (FPEQ), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la fase previa al estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



Valores circulados en los mismos días del ciclo estral, indican diferencia significativa (P<0.05).

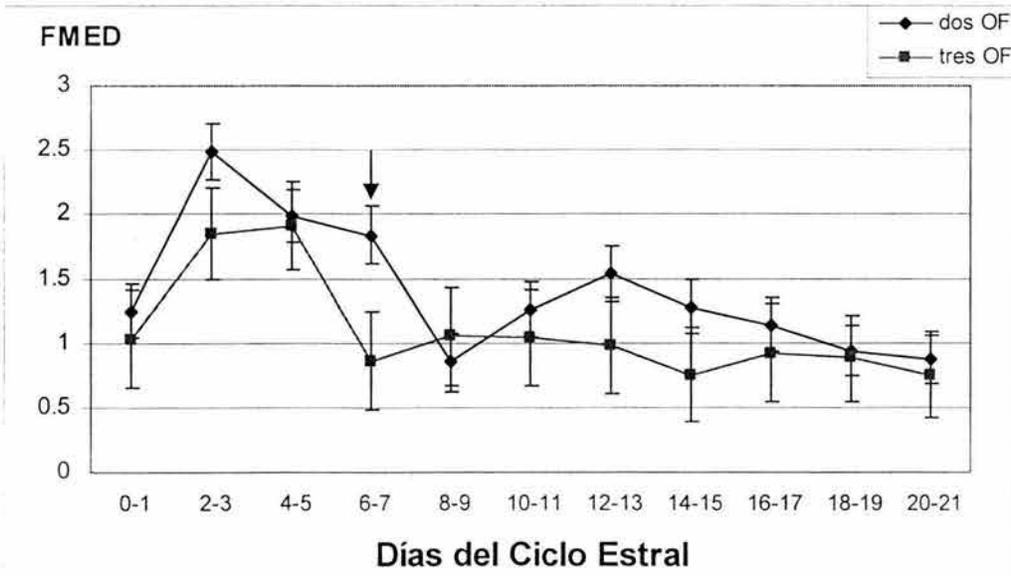
Valores circulados en los mismos días del ciclo estral, indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

GRÁFICA 9. Número de folículos medianos (FMED) para el efecto de época previa al estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días



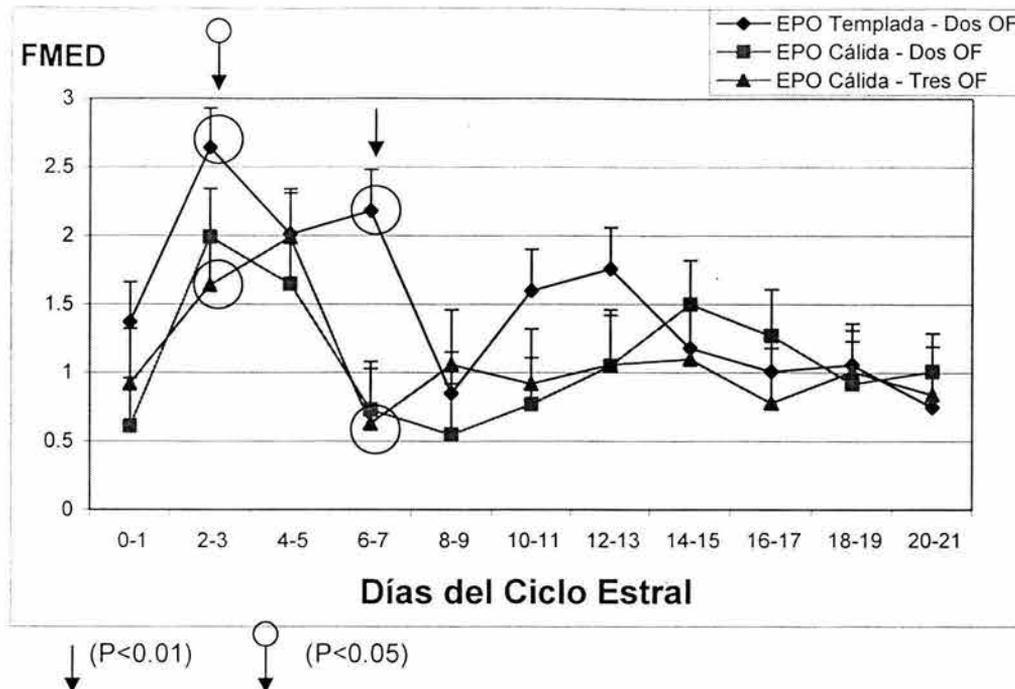
↓ ($P < 0.01$) □ ($P < 0.1$)

GRÁFICA 10. Número de folículos medianos (FMED) para el efecto del número de ondas foliculares, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

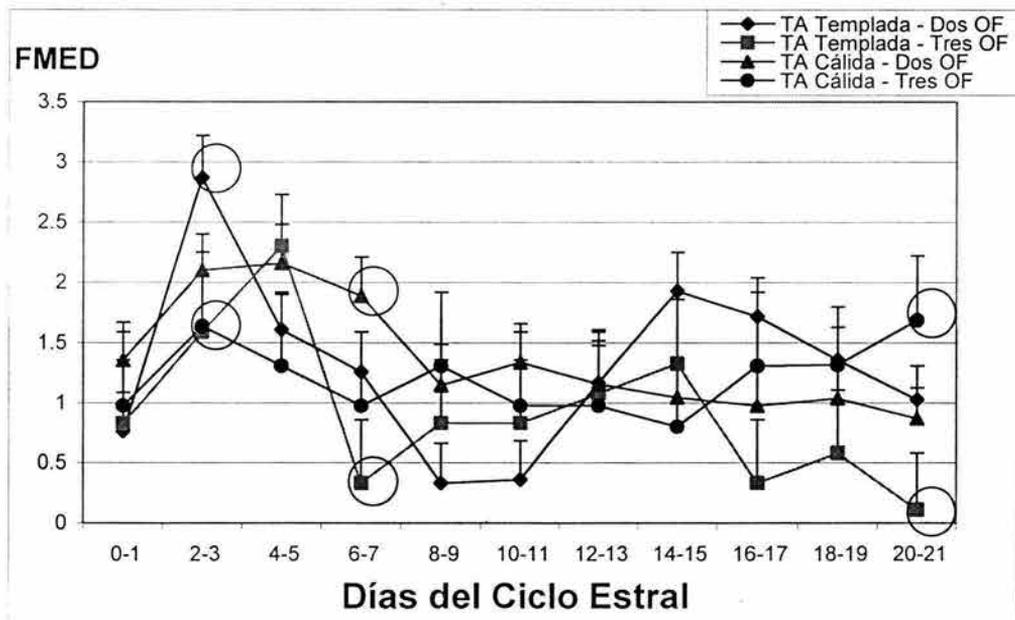


↓ ($P < 0.05$)

estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días



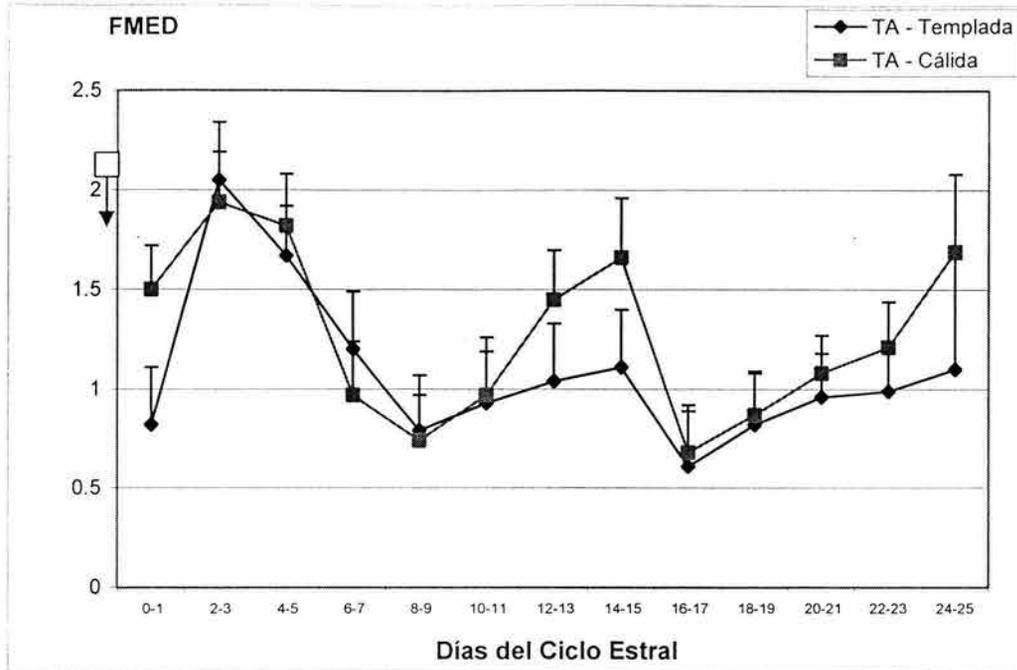
GRÁFICA 12. Número de folículos pequeños (FMED), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas en la fase previa del estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días



Valores circulos en los mismos días del ciclo estral, Indican diferencia significativa (P<0.05).

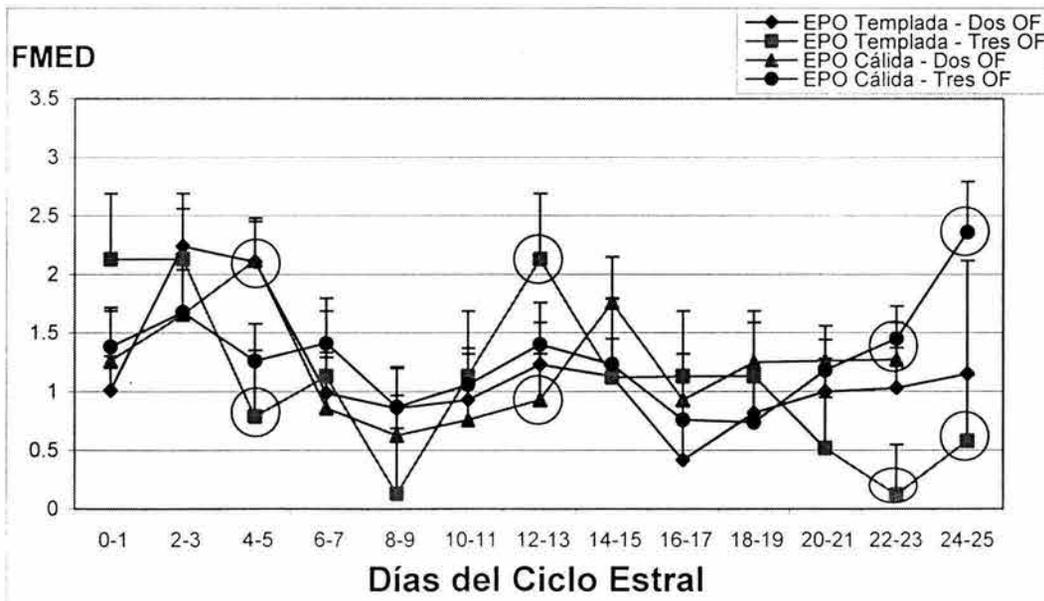
GRÁFICA 13. Número de folículos medianos (FMED) para el efecto de la época previa al estudio (TA), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

GRÁFICA 13. Número de folículos medianos (FMED) para el efecto de la época previa al estudio (TA), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



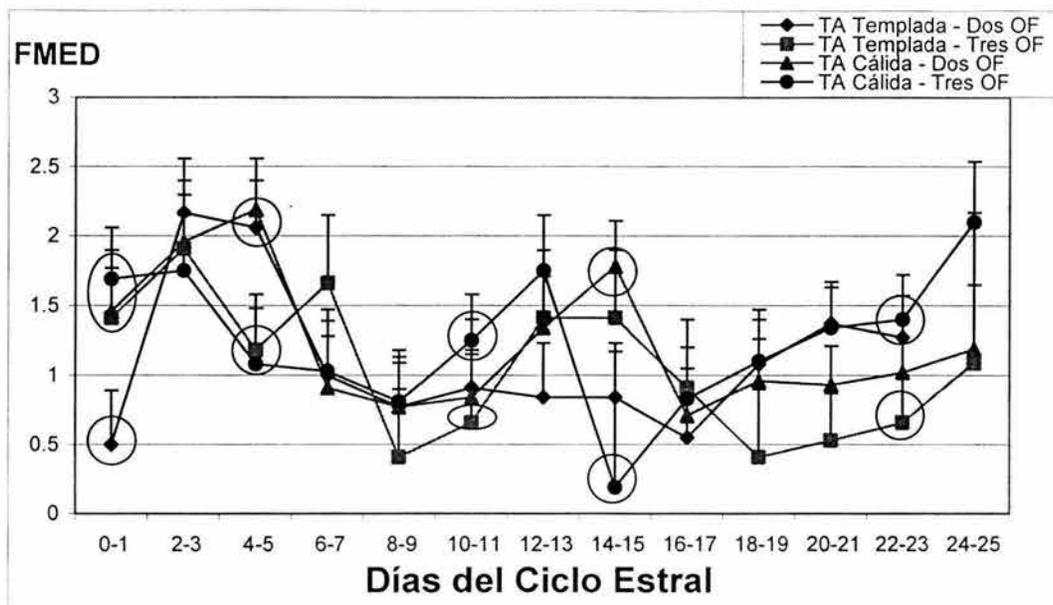
□ (P<0.1)
↓

GRÁFICA 14. Número de folículos medianos (FMED), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la época de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



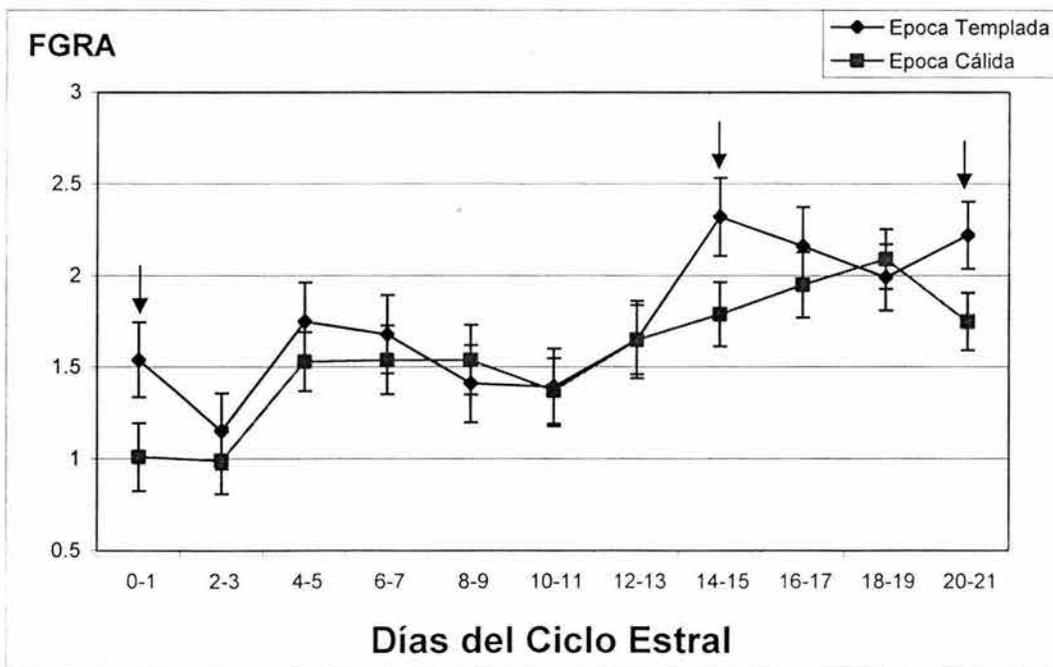
Valores circulados en los mismos días del ciclo estral, indican diferencia significativa (P<0.05).

GRÁFICA 15. Número de folículos medianos (FMED), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la fase previa al estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



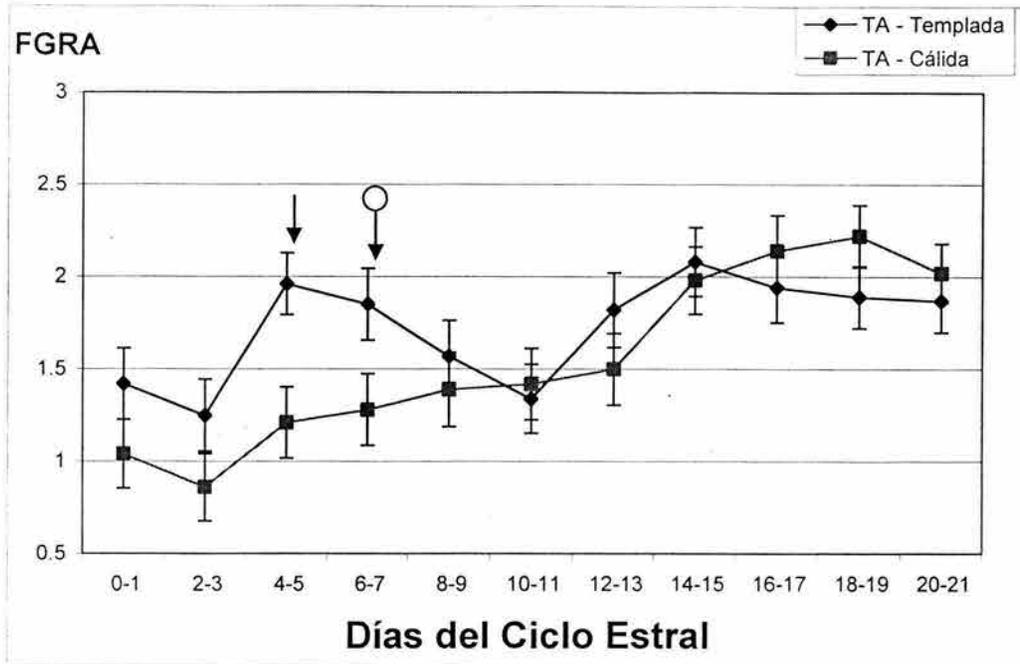
Valores circulados entre ellos indican diferencia, dentro de los mismos días del ciclo estral, Indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

GRÁFICA 16. Número de folículos grandes (FGRA) para el efecto de la época durante el período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

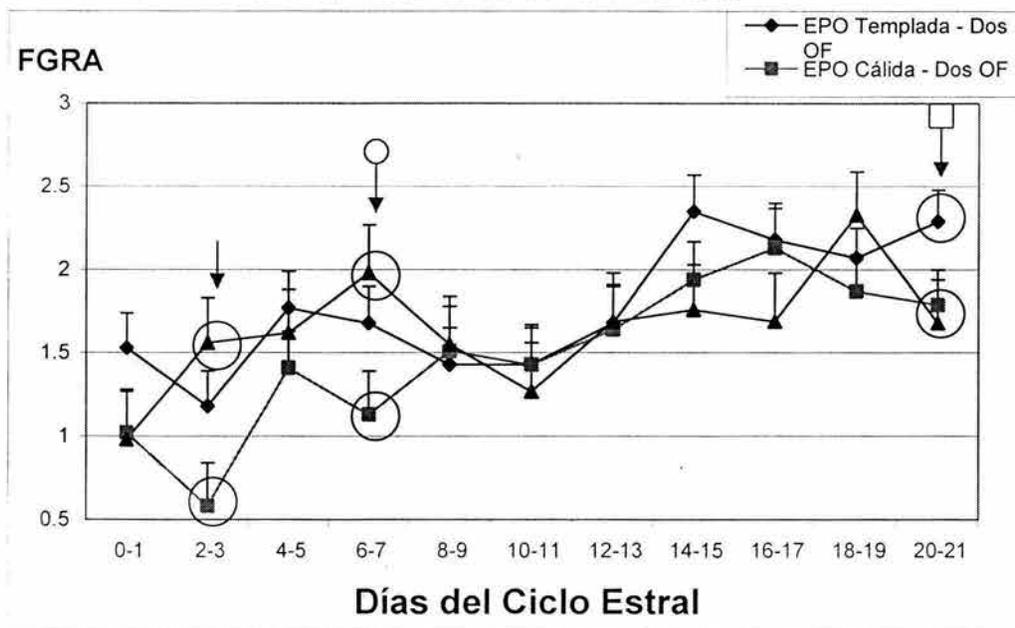


↓ ($P < 0.05$)

GRÁFICA 17. Número de folículos grandes (FGRA) para el efecto de la época previa al período de estudio, a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

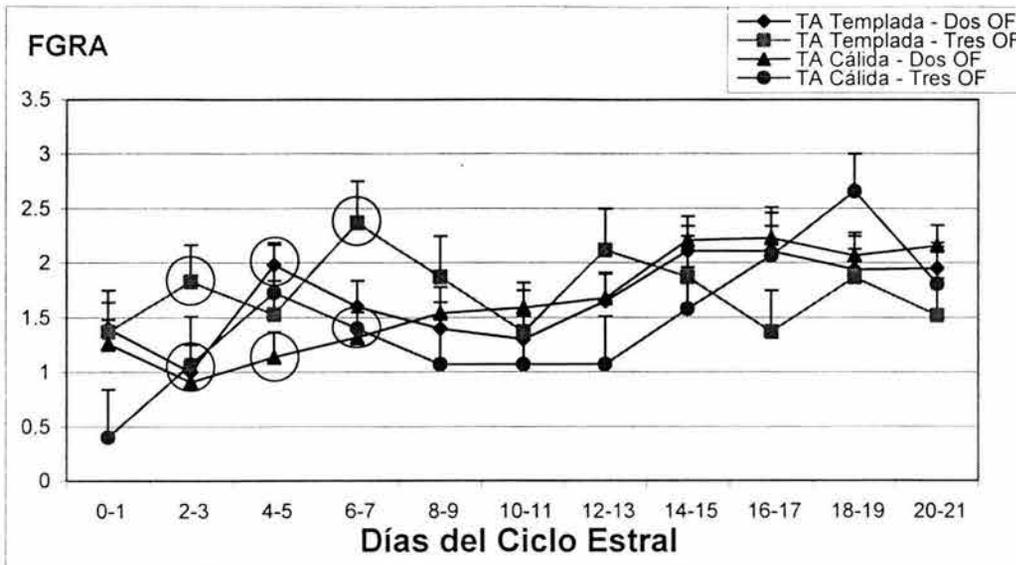


GRÁFICA 18. Número de folículos grandes (FGRA), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la fase de estudio (EPO y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días



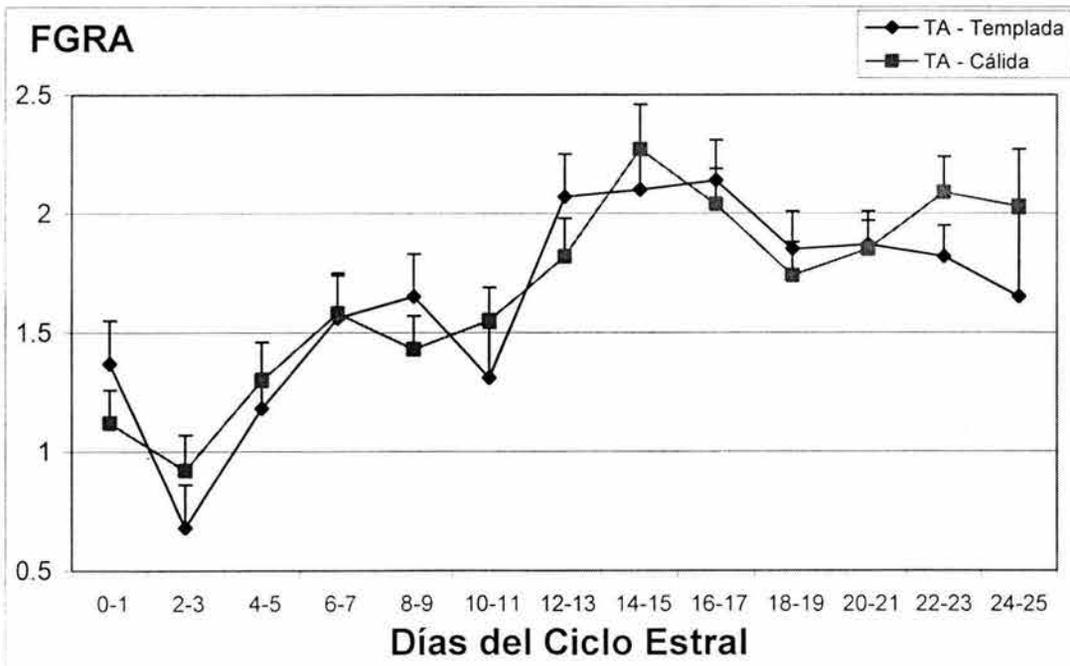
↓ (P<0.01) ⊙ (P<0.05) ⊓ (P<0.1)

GRÁFICA 19. Número de folículos grandes (FGRA), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas en la fase previa al estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 18 a 21 días

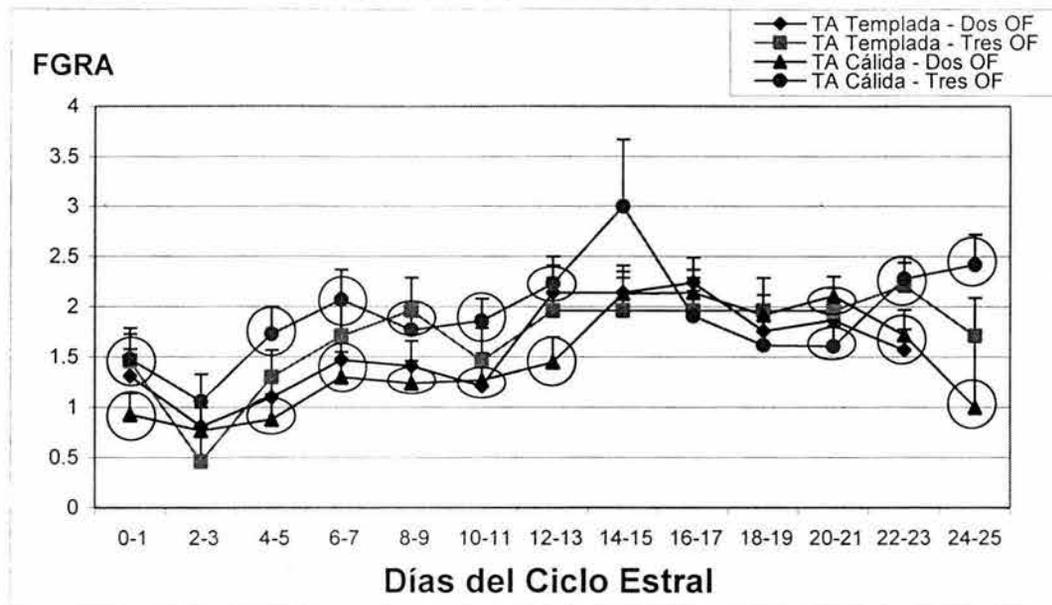


Valores circulosados en los mismos días del ciclo estral, indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

GRÁFICA 20. Número de folículos grandes (FGRA) para el efecto de la época previa al período de estudio (TA), a lo largo del ciclo estral, en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días

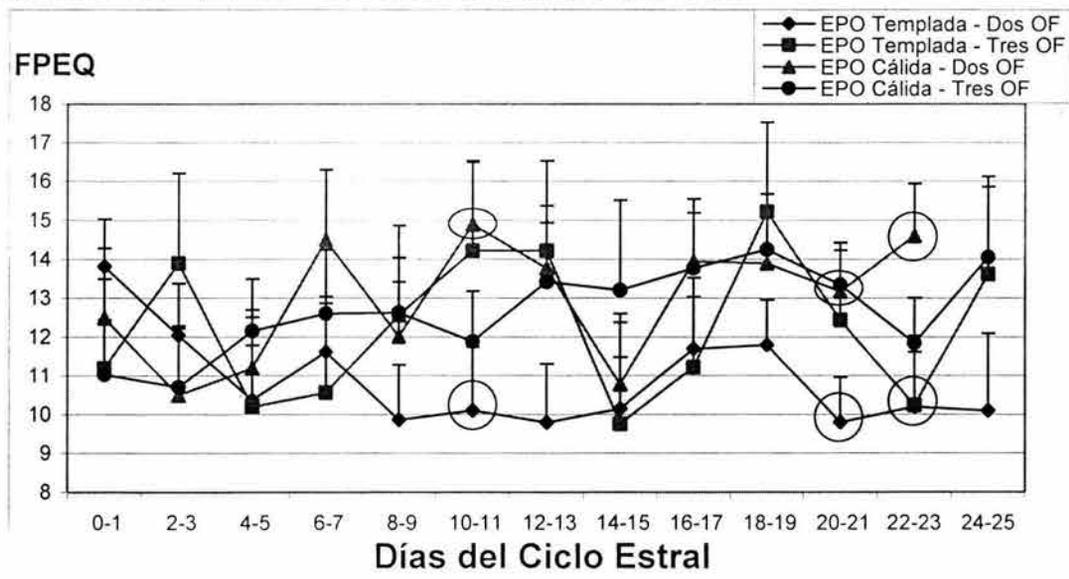


GRÁFICA 21. Número de folículos grandes (FGRA), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas de la fase previa al estudio (TA) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



Valores circulados en los mismos días del ciclo estral, indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

GRÁFICA 22. Número de folículos pequeños (FPEQ), a lo largo del ciclo estral, para el efecto de interacción de las condiciones climáticas durante la época de estudio (EPO) y el número de ondas foliculares (Dos OF o Tres OF), en vacas Holstein con un intervalo entre celos de 22 a 25 días



Valores circulados, en los mismos días del ciclo estral, indican diferencia significativa ($P < 0.05$).