

BAC

MODULO DIGITAL



El documento fuente se encuentra en
La Biblioteca Agropecuaria de Colombia

ELEMENTOS BIBLIOGRAFICOS

AUTOR (ES): Flórez Díaz, H.

TITULO: Efecto del estrés por calor sobre el desarrollo del embrión
bovino

FUENTE: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Santafé
de Bogotá (Colombia). Programa Nacional de Ecofisiología Animal.
Curso Taller Manejo y Conservación del Espermatozoide y Ovulo Bovino,
Santafé de Bogotá (Colombia), 28-30 Sep 1994. Manejo y conservación
del espermatozoide y óvulo bovino. Santafé de Bogotá (Colombia),
CORPOICA, 1994. p. 92-132

Resumen
92

EFFECTO DEL ESTRES POR CALOR SOBRE EL DESARROLLO DEL EMBRION BOVINO*

Hernando Flórez Díaz**

INTRODUCCION

Las regiones tropicales en el mundo se caracterizan por ser calientes y húmedas. Estas áreas generalmente tienen dos épocas del año bien definidas (la estación seca y la estación de lluvias); las temperaturas del aire se encuentran entre los 22°C y 32°C y la Humedad relativa es del 50% durante el día y se aproxima al 100% en la noche. La combinación de ambientes cálidos y alta humedad en forma continua no favorece la producción animal. Adicionalmente, la baja calidad de las pasturas tropicales y las altas cargas de parásitos y enfermedades afectan los animales transferidos desde países de estaciones a países tropicales. Las tasas de crecimiento, la producción de leche y la fertilidad disminuyen como consecuencia de las enfermedades o la falta de tolerancia al calor. Por otra parte las razas nativas de animales están mejor adaptadas al ambiente y son más resistentes a las enfermedades, pero sus niveles de producción son menores que los de animales criados en climas templados.

El bovino posee la capacidad de reproducirse a lo largo de todo el año. Sin embargo en ambientes con temperaturas por encima de 21°C, las tasas de concepción disminuyen (Thatcher, 1974). Esta temperatura crítica varía con la raza y puede afectar la reproducción de la hembra en varias formas. Se ha observado que vacas sometidas a altas temperaturas ambientales manifiestan disminución de la duración e intensidad del estro, largos ciclos estrales y alteración de los perfiles de hormonas reproductivas. Sin embargo el principal efecto se relaciona con la alteración del cigoto y la viabilidad del embrión.

* Conferencia presentada en el curso taller "Manejo y conservación del espermatozoide y óvulo Bovino". C.I. Tibaitata, Septiembre 1994.

** M.V.Z., M.Sc., Investigador Asociado Programa Nacional de Ecofisiología Animal, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Regional Uno, C.I. Tibaitatá. Tel. 286 00 21.

La mortalidad embrionaria es un factor que se asocia con la reducción de la fertilidad del bovino en climas cálidos (Johnson, 1985). También se sabe que las tasas de concepción y la fertilidad disminuyen en el verano en países de estaciones y en los climas subtropicales y tropicales (Roman-Ponce y col., 1977). La exposición de vacas a elevadas temperaturas durante la maduración del oocito, la ovulación o durante los primeros 3 a 7 días de preñez disminuye el desarrollo y la viabilidad del embrión (Putney y col., 1988; Ealy y col., 1993).

Esta revisión tiene como objetivo principal, presentar los aspectos más importantes del efecto del estrés calórico sobre el desarrollo y la viabilidad del embrión bovino, pero también mencionará brevemente los principales efectos de las altas temperaturas sobre el comportamiento reproductivo y el microambiente uterino durante la gestación.

IMPACTO DE LAS ALTAS TEMPERATURAS AMBIENTALES SOBRE EL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DEL BOVINO

Los efectos del clima sobre el comportamiento reproductivo afectan la eficiencia productiva del hato y son muy importantes en zonas tropicales y subtropicales donde es mayor el impacto del ambiente.

En ciertas zonas subtropicales del mundo se conoce muy bien que las tasas de concepción disminuyen durante ciertas épocas del año. Algunos trabajos realizados en hatos lecheros comerciales del estado de la Florida en los Estados Unidos, basados en el análisis de 6555 inseminaciones de tres razas (Jersey, Pardo Suizo, Holstein) durante un período de 3 años (1975-1977), mostraron por una parte que las novillas tienen mayores tasas de concepción que las vacas lactantes (47% -vs- 32%). Además las tasas de concepción de vacas disminuían más en el verano (Junio-Agosto) y solo se normalizaban hasta noviembre (Figura 1) (Thatcher y Collier, 1986).

De interés práctico, se observó que la temperatura ambiental máxima un día después de la inseminación, se asoció negativamente con las tasas de concepción de vacas lactantes y novillas. Las tasas de concepción en vacas disminuían en mayor proporción cuando la temperatura ambiental superaba los 30°C (Figura 2). En contraste, las tasas de concepción en las novillas permanecían relativamente constantes. Thatcher y Collier, (1986) mencionan que la disminución en las tasas de concepción en vacas lactantes, probablemente se deba a su incapacidad para mantener normal su temperatura corporal, bajo condiciones de estrés por calor. Esto se debe a

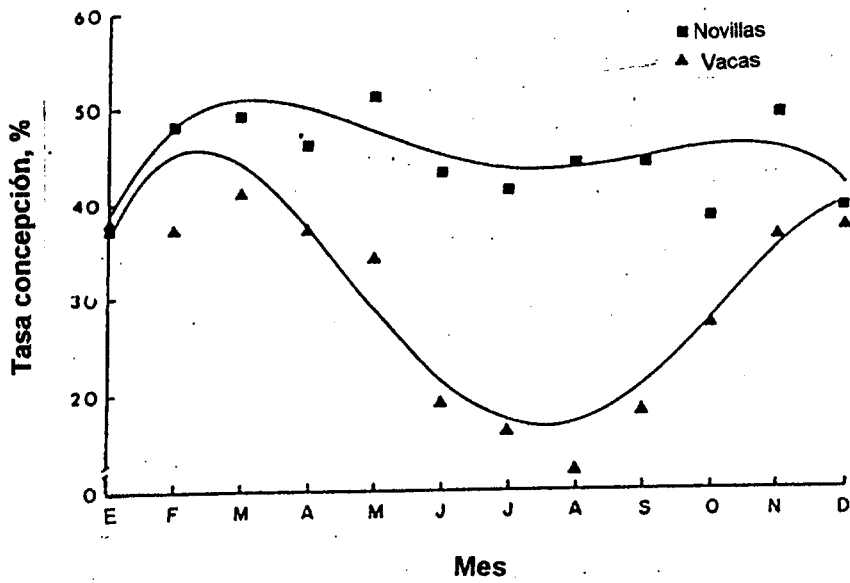


FIGURA 1. Valores medios de tasas de concepción en novillas y vacas, según la época del año (Thatcher y Collier, 1986).

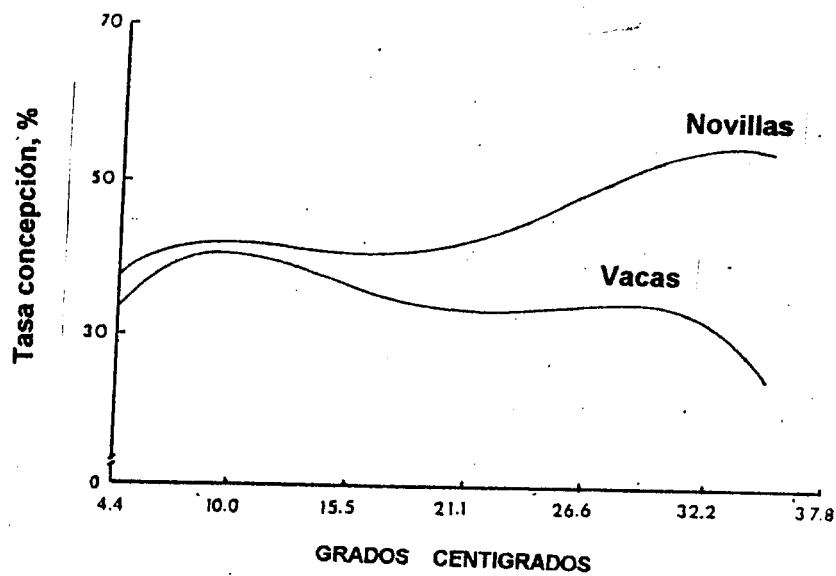


FIGURA 2. Curvas de regresión para tasas de concepción de vacas y novillas y temperatura ambiental máxima un día después de la inseminación (Thatcher y Collier, 1986).

su alta tasa de producción de calor interno, asociada con la producción de leche. Por su parte las novillas no lactantes debido a la menor producción de calor metabólico, soportan más las temperaturas ambientales críticas y mantienen un mayor equilibrio térmico para proteger la fertilidad. Sin embargo, esto no implica que las novillas sean resistentes al estrés térmico. Trabajos realizados por Dunlap y Vincent, (1971) en novillas para carne sometidas a elevadas temperaturas en cámaras climáticas, demuestran que ninguna de 23 novillas utilizadas mostraron concepción cuando fueron expuestas por 72 horas después de la inseminación a temperatura constante de 32.2°C, mientras que 12 de 25 novillas quedaron gestantes cuando se mantuvieron en un ambiente de 21.1°C. Las novillas del grupo de temperatura de 32.2°C tenían temperaturas rectales de 40°C. Badinga y col., (1985), demostraron en condiciones de campo que la tasa de concepción de novillas disminuye cuando las temperaturas ambientales superan los 35°C.

El trabajo de Thatcher y Collier, también encontró diferencias en las tasas de concepción entre razas (Jersey vs Holstein y Pardo Suizo: 45% vs 39 y 41% respectivamente). Esto probablemente refleja diferencias asociadas con la producción de leche y con las respuestas termorregulatorias durante los períodos de estrés térmico, características de cada raza.

Los cambios de temperatura en el medioambiente afectan el medio interno del animal, lo que se refleja en cambios en la fertilidad; en este sentido es importante la relación entre el microambiente uterino y la viabilidad del embrión. Experimentos desarrollados por Gwazdauskas y col., (1973), muestran que la temperatura uterina el día de la inseminación y un día después de ésta, se asocia negativamente con la tasa de concepción. Un aumento de 0,5°C por encima de la temperatura el día de la inseminación (38.6°C) y un día después (38.3°C), disminuye la tasa de concepción 12.8% y 6.9% respectivamente. En otros trabajos se ha demostrado que cuando la temperatura rectal de vacas aumenta 1°C las tasas de concepción disminuye 16% (Ulberg y Burfening, 1967; citado por Lee, 1993). Es común en vacas en ambientes cálidos y húmedos encontrar durante el día temperaturas rectales por encima de 39°C (Lee y col., 1994).

Con respecto a la relación de varios factores climáticos (temperatura media, precipitación pluvial, viento, radiación solar, etc), y la fertilidad; se estima que en condiciones subtropicales la temperatura ambiental máxima el día de la inseminación es el factor ambiental que más se relaciona con el comportamiento reproductivo (Gwazdauskas y col., 1975). En condiciones

tropicales, sin embargo la combinación de factores como temperatura y humedad relativa pueden ser más críticos para la fertilidad.

La zona termoneutral en la vaca lechera se encuentra entre 0° y 16°C (Bianca, 1970), estos animales experimentan estrés calórico cuando la temperatura aumenta por encima de 23.8°C y la humedad relativa alcanza el 80% (Nickerson, 1984). Actualmente se utilizan los valores del índice temperatura y humedad (ITH), para estimar en forma práctica la exposición del bovino al estrés calórico (Yousef, 1985; citado por Dupreez y col., 1991). El promedio ITH determinado el segundo día después del servicio en vacas se correlaciona fuertemente con la tasa de concepción (Ingraham, 1974).

Un valor de ITH de 70 o menos se considera normal; valores por encima de 70 se consideran estresantes para el bovino. Ingraham y col., (1976) asociaron la tasa de concepción en el verano en la Isla de Hawaii con el ITH. Las concepciones fueron del 55% cuando el ITH era de 72 y de 25 a 30% cuando este se incrementó a 76 ó 77. Así mismo Du Preez y col., (1991) en Surafrica, encontraron que la tasa promedio de concepción fue menor en el mes de enero (36.4%) (verano) mientras que el ITH fue el mayor de todo el año (71.9). Por el contrario la tasa promedio de concepción para el mes de junio (invierno) fue del 70% y el valor de ITH fue el menor de todo el año (57.7). Johnson, (1985) demostró que el valor crítico de ITH para producción de leche es 72. En igual forma du-Preez y col., (1991), proponen un valor umbral para la reproducción de bovinos lecheros de 65 cuando se observa el efecto del ITH sobre la tasa de concepción. En la Figura 3, se observa la comparación de las tasas de concepción en dos áreas geográficas con relación al ITH.

CAMBIOS FUNCIONALES DEL MICROAMBIENTE UTERINO EN RESPUESTA AL ESTRES POR CALOR

El establecimiento y mantenimiento de la gestación involucra una comunicación muy estrecha entre la madre y el conceptus que se desarrolla. Se ha demostrado ampliamente en estudios de transferencia de embriones, la importancia de la sincronía en el desarrollo de estos dos sistemas biológicos a medida que la gestación avanza (Wilmot y Gales, 1981).

Las alteraciones del tracto reproductivo después del estro inducidas por esteroides son críticas para la sobrevivencia embrionaria. Además, la capacidad de desarrollo del embrión en la oveja y la vaca puede alterarse

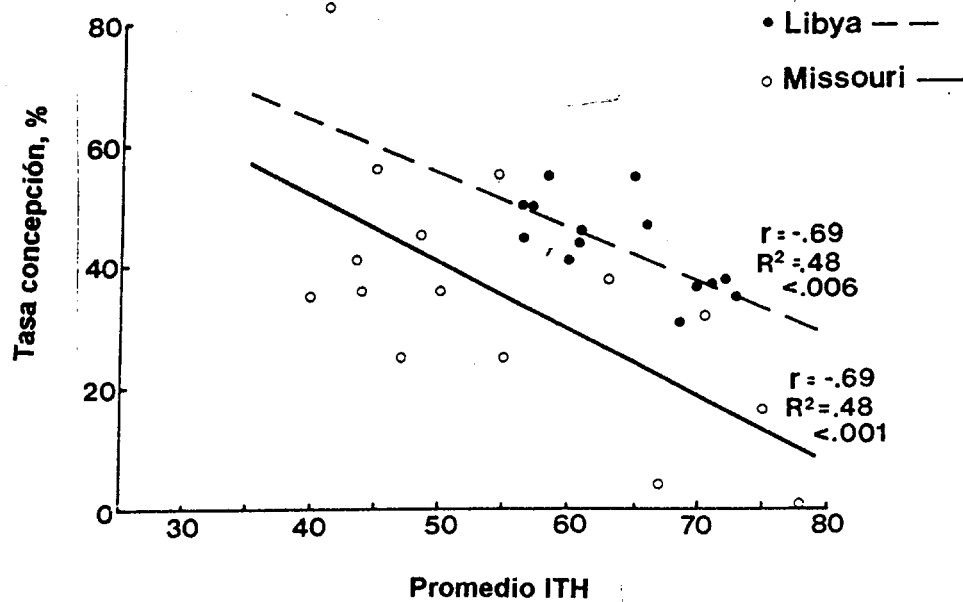


FIGURA 3. Comparación de tasas de concepción y promedios de ITH en Libia y Missouri (El Rabeie, 1983).

ITH: Índice temperatura-humedad

por cambios en el microambiente uterino (Wilmut y Gales, 1981). Presumiblemente, muchas de las funciones del útero controladas por los esteroides, dependen de proteínas. En el endometrio bovino se ha identificado la producción y secreción de proteínas (Roberts y Parker, 1974). Las proteínas endometriales cumplen funciones como moléculas transportadoras, inhibidores de proteasas, enzimas lisosomales y moléculas inmunoreguladoras. En igual forma, tiene gran importancia la mediación que cumplen las proteínas endometriales en la interacción entre el conceptus y el endometrio materno. Por tanto, es muy importante conocer si las temperaturas ambientales elevadas, que ocasionan aumento en la mortalidad embrionaria temprana en la vaca (Thatcher y Collier, 1986), también alteran la secreción endometrial de proteínas.

A nivel celular las células eucarióticas responden a los agentes estresantes produciendo un tipo específico de proteínas conocidas como proteínas del choque calórico o proteínas de estrés (Craig, 1985; Lindquist, 1986; citados por Guerriero y Raynes, 1990), tanto el calor como otros factores, son capaces de inducir la producción de estas proteínas. No es muy claro el papel que desempeñan estas proteínas; pero éstas posiblemente ayuden a la célula a sobrevivir al estrés.

Varios trabajos experimentales han demostrado que la hipertermia en el animal induce la síntesis de proteínas de estrés (Dean y Atkinson, 1985; Rodenkiser y col., 1985; citados por Guerriero y Raynes, 1990); pero no se conoce si la adquisición de termotolerancia se relaciona con el aumento de la síntesis de proteínas del estrés. Las proteínas más conocidas tienen pesos moleculares de 90, 70 y 27 kilo Daltons (Kda) y se denominan proteínas de estrés calórico 90 (PEC 90);, proteína de estrés calórico 70 (PEC 70) y proteína de estrés calórico 27 (PEC 27) (Guerriero y Raynes, 1990).

Con el fin de observar el efecto del estrés calórico sobre la secreción de proteínas del endometrio, Malayer y col., (1988), desarrollaron un experimento *In vitro* que consistía en evaluar la secreción de proteínas de cultivos endometrio bovino a 39°C (Homeotérmico) y 43°C (Choque calórico), los días 0, 2, 5 y 8 del ciclo estral. Los resultados mostraron que la secreción de macromoléculas por los cultivos fue mayor el día 0 del ciclo en comparación con los otros días. Esto posiblemente se relacione con el nivel de estrógenos, que se encuentran elevados el día del estro (día cero), o se deba a bajas concentraciones de progesterona, puesto que la

progesterona puede inhibir la secreción de ciertas proteínas endometriales (Salamonsen y col., 1985; citado por Malayer y col., 1988).

También se observó, que la secreción total de proteínas sintetizadas de novo por el endometrio aumentó significativamente el día 0 en los cultivos sometidos a estrés calórico, pero no en los días siguientes. Estas proteínas fueron la PEC 70 y la PEC 90. Por el contrario el choque calórico redujo la secreción de 7 polipéptidos provenientes del tejido tomado de cuerno uterino ipsilateral, con respecto al ovario que contenía el cuerpo lúteo. Esto supone que el choque calórico del endometrio puede asociarse con la supresión de proteínas específicas, mas que una inhibición general de la síntesis de proteínas. Los autores mencionan que no existe certeza si estos efectos puedan ser causa suficiente para producir mortalidad embrionaria, pero sugieren que si existe alteración de la interrelación entre el ovario activo y el cuerno uterino gestante, el estrés calórico puede inducir asincronía en el desarrollo del endometrio y el conceptus, dando como resultado un incremento en la mortalidad embrionaria.

Se ha demostrado que los animales pueden adquirir termotolerancia cuando se someten al calor en forma continua (Li y col., 1983). El ganado Cebú es un ganado adaptado a condiciones de alta temperatura, características de su zona de origen en el trópico y regiones semiáridas (Bonsma, 1973). Varios autores mencionan que en ambientes tropicales y subtropicales la eficiencia reproductiva de las vacas Cebú, es superior a la de vacas originarias de países templados (Peacock y col., 1971; 1977; Turner, 1982). Aunque no se encontraron diferencias significativas, Turner (1982), encontró que por cada unidad de incremento en la temperatura corporal la fertilidad tiende a disminuir menos en las vacas Cebú que en vacas europeas. Esto sugiere que el ganado Cebú durante los períodos de hipertermia desarrolla mecanismos de protección de los tejidos del tracto reproductivo.

Para comprobar la hipótesis anterior, Malayer y Hansen (1990), de la Universidad de la Florida, diseñaron un estudio que tenía como objetivo, determinar si los tejidos de oviducto y endometrio de vacas Brahman (*Bos indicus*) y Holstein (*Bos taurus*), difieren en la síntesis y secreción de proteínas y prostaglandinas, en respuesta al choque calórico *In Vitro*. Las muestras de tejido de vacas cíclicas se tomaron el día del estro debido a que éste representa en términos de efectos adversos sobre las tasas de concepción el período de mayor susceptibilidad al estrés por calor (Dunlap y Vincent, 1971; Gwazdauskas y col., 1973). Los tejidos de oviducto y endometrio se sometieron a temperaturas de 39°C (Homeotermico) y 43°C

(choque calórico). En general los resultados mostraron, que la respuesta tisular al choque calórico es similar en ambas razas. Sin embargo se encontraron diferencias entre razas con respecto a la respuesta al calor. Los tejidos tomados de vacas Brahman disminuyeron la síntesis de novo de proteínas durante los primeros 30 minutos del choque calórico. Esta disminución puede reflejar la respuesta clásica al estrés calórico descrita por Nover (1984); la cual no ocurre en los tejidos de vacas Holstein. La alteración del tracto reproductivo de vacas *Bos taurus*, puede asociarse con su baja resistencia al estrés calórico, debido a que esta respuesta inicial, disminuye la cantidad de proteínas desnaturalizadas que se forman en tejidos no tolerantes al calor.

La síntesis de ADN en células endometriales también es diferente entre razas. El aumento de la temperatura de 39°C a 43°C aumenta la síntesis de ADN en los tejidos de vacas Brahman y disminuye en los de vacas Holstein. Por otra parte la secreción de prostaglandinas (PG) no fue diferente entre razas. Sin embargo, se ha visto que tejidos de endometrio *In Vitro* tomados el día 17 del ciclo responden al choque por calor aumentando la secreción de prostaglandina (PGF_{2α}) (Putney y col., 1988).

Los autores también encontraron variación entre razas, con respecto al tipo de proteínas, secretadas por el endometrio. El principal producto de secreción de los tejidos de vacas Brahman fue una proteína con peso molecular de 57.500, siendo de menor peso molecular (55.600), para los de vacas Holstein. Estas proteínas secretadas son análogas a la proteína descrita como proteína endometrial secretoria número 10 (Malayer y col., 1988). Esta proteína es la que se secreta en mayor cantidad el día del estro y disminuye hasta el día 8 del ciclo. También, se encontró en las vacas Holstein baja actividad secretoria del oviducto ipsilateral al cuerpo lúteo debido al choque calórico. Esta respuesta no se encontró en el oviducto de vacas Brahman.

Esta información presentada, implica que existen diferencias entre bovinos *Bos taurus* y *Bos indicus*, en cuanto a la respuesta al estrés calórico de los tejidos del tracto reproductivo. Así mismo plantea que existe variación en el comportamiento cualitativo de proteínas secretadas por cultivos *In Vitro* de endometrio. A pesar de esto, los autores concluyen que si tales variaciones son suficientes para disminuir el efecto de calor sobre la mortalidad embrionaria de vacas.

EFFECTO DEL ESTRES TERMICO SOBRE EL DESARROLLO DE EMBRIONES BOVINOS EN LOS PRIMEROS DIAS DE LA GESTACION

Existen dos problemas que afectan la eficiencia reproductiva del hato; uno es la presencia de calores silenciosos y la falta de su detección y otro son los servicios infértiles, que se relacionan aproximadamente con el 15% de la mortalidad embrionaria en ganado de leche (Hawk, 1979; citado por Thatcher y Collier, 1986). Agravando la situación, se conoce que la magnitud de estos problemas aumenta durante los períodos de altas temperaturas ambientales. Uno de los hallazgos más comunes durante los períodos de estrés térmico, es la reducción en la duración e intensidad del estro aproximadamente 5-6 horas (Drost y Thatcher, 1987). Esta respuesta parece ser un mecanismo compensatorio ya que la baja actividad sexual disminuye la producción de calor metabólico y por ende deprime la cantidad de calor que debe disipar el animal. Si el estro ocurre de noche (horas más frías), no es fácilmente detectado y si este ocurre en el día (horas más calientes) el animal permanece inactivo, haciendo difícil su estimación. Este tipo de comportamiento contribuye a la poca detección del estro en los programas de inseminación artificial, que se lleva a cabo en zonas cálidas.

Adicionalmente las altas temperaturas ambientales alteran los perfiles de hormonas de la reproducción en vacas. Varios estudios han demostrado que vacas en condiciones de estrés por calor, secretan altos niveles de progesterona (Dunlap y Vincent, 1971; Gwazdauskas y col., 1973), sugiriendo que la glándula adrenal es la fuente de esta hormona. Un nivel de progesterona mayor de 0.7 ng/ml puede inhibir el pulso preovulatorio de hormona luteinizante (HL) al estro y evitar la ovulación (Sirois y Fortune, 1990; citado por Lee, 1993). El comportamiento de la HL se altera en condiciones de estrés por calor. Lee y col., (1994) demuestran falta de sincronía en los picos de HL en vacas mantenidas en ambientes cálidos.

En la Florida Roman-Ponce y col., (1981), monitorean en el verano los cambios diarios durante el ciclo estral de los niveles sanguíneos de progesterona, estradiol, hormona luteinizante y cortisol, de 5 vacas mantenidas en condiciones de sombra y 4 vacas manejadas sin sombra. Los perfiles hormonales de los 2 grupos indican que el estrés térmico no inhibe la presentación regular de los ciclos estrales. Sin embargo durante la fase luteal de vacas manejadas sin sombra, se detectaron elevaciones leves

de las concentraciones de progesterona y cortisol, mientras que la elevación del estradiol durante el proestro fue levemente menor (Figura 4). La importancia biológica de las diferencias puede estar asociada con la calidad del desarrollo del folículo preovulatorio, la intensidad del estro y el posterior desarrollo de microambiente del oviducto y el útero.

A partir de 1986, se empezó a generar información sobre el período de sensibilidad térmica del bovino, durante los primeros días de la gestación. Varios experimentos In Vivo en In Vitro en otras especies animales domésticas (Ej: oveja), han demostrado que la exposición al calor del cigoto, durante los estados tempranos de división, aumenta apreciablemente la frecuencia de muertes embrionarias. En el bovino en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de las épocas críticas del desarrollo embrionario, en condiciones de estrés térmico. Se ha establecido que las tasas de fertilización son normales en vacas sometidas a estrés por calor (Drost y Thatcher, 1987); así mismo se conoce que la exposición al calor de la vaca, su cigoto o del embrión en desarrollo produce mortalidad embrionaria. Esta mortalidad se presenta mientras que el embrión se encuentra en el oviducto o después de que este llega al útero, pero antes del reconocimiento materno de la gestación (día 15 a 17), puesto que no hay efecto sobre la longitud del ciclo estral (Drost y Thatcher, 1988).

Otro factor importante que se ha estudiado, son los mecanismos fisiológicos que controlan la temperatura del útero en los períodos del estrés calórico. Como se mencionó anteriormente una elevada temperatura ambiental y por consiguiente una alta temperatura del útero, alrededor del momento de la fertilización afectan las tasas de concepción. El estrés por calor disminuye significativamente el flujo sanguíneo al útero (Roman-Ponce y col., 1978). La disipación del calor metabólico uterino depende de la tasa de flujo sanguíneo, puesto que la temperatura de la sangre es más baja que la del útero (Gwazdauskas y col., 1974). Por tanto la reducción del flujo sanguíneo al útero, incrementa su temperatura, lo cual se relaciona con bajas tasas de preñez (Drost y Thatcher, 1978). La reducción del flujo sanguíneo al útero puede afectar la disponibilidad de oxígeno, nutrientes, agua, electrolitos y hormonas para el embrión en desarrollo (Senger y col., 1967; citado por Thatcher y Collier, 1986). Estos cambios pueden ser críticos durante los períodos de elevado flujo sanguíneo al útero, como normalmente ocurre durante el estro o en los primeros días de la gestación (días 14 a 16). Como resultado de esto, el balance y la sincronía entre el embrión y el endometrio puede alterarse, por tanto disminuye la posibilidad del mantenimiento de la gestación.

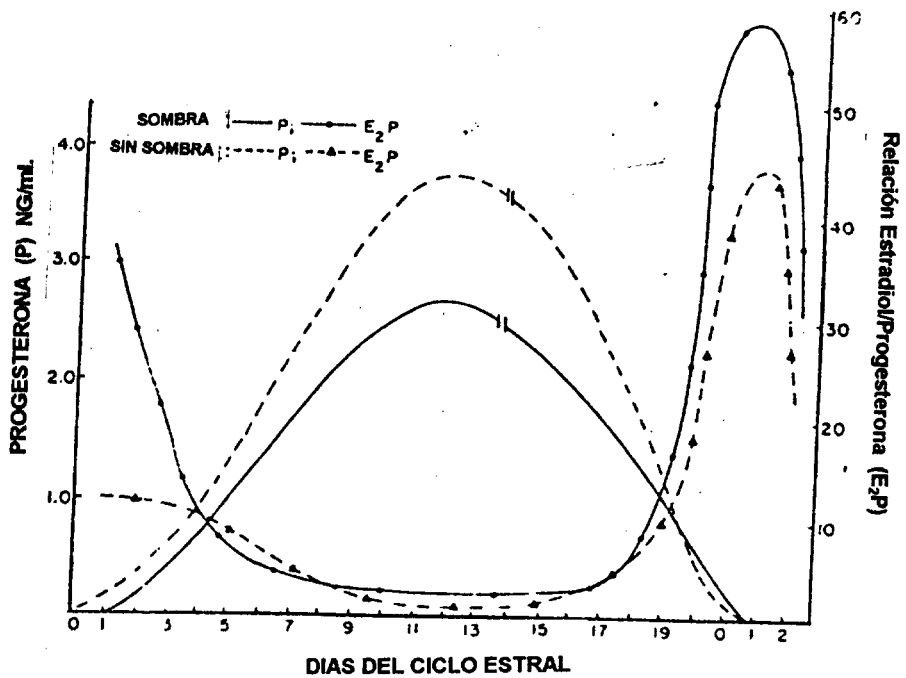


FIGURA 4. Concentración de progesterona y relación estrógeno/progesterona durante el ciclo estral en vacas mantenidas con sombra o sin sombra durante el verano (Thatcher y Collier, 1986).

Thatcher y Collier, (1986), han reunido las evidencias anteriores en el llamado "síndrome de infertilidad por estrés calórico", debido a que la combinación potencial de estos factores, comprometen el desarrollo del embrión en su microambiente uterino. La elevación de la temperatura en el tracto reproductivo, los cambios en el balance hormonal y la reducción del flujo sanguíneo al útero pueden alterar la sincronía requerida entre el desarrollo del embrión y los cambios adaptativos de la madre.

A continuación se presentan una serie de estudios del efecto de calor sobre el desarrollo del embrión bovino entre el día 0 y 21 de la gestación.

Los trabajos se han enfocado a varias áreas de investigación: primero a evaluar en países de estaciones el efecto de la época del año (Verano-Invierno) sobre las respuestas superovulatorias, la viabilidad y desarrollo del embrión (Gordón y col., 1987; Monty y Racowsky, 1987; Ryan y col., 1992), segundo a evaluar el efecto de la temperatura y humedad ambiental sobre el desarrollo embrionario en los primeros 7 días de gestación (Putney y col., 1989; Putney y col., 1988) y sobre el desarrollo de conceptus en la segunda y tercera semana de preñez (Biggers y col., 1987; Geisert y col., 1988) y tercero a estudiar el desarrollo de la termotolerancia de embriones bovinos In vitro (Ryan y col., 1992) e In vivo (Ealy y col., 1993).

Con el fin de evaluar el efecto de la estación sobre la viabilidad y desarrollo del embrión Monty y Racowsky, (1987) en el estado de Arizona de los estados unidos, tomaron un grupo de vacas lecheras en producción en la época de verano y otro en la época de invierno, al cual sometieron a tratamiento de superovulación e inseminación y posterior colección de embriones entre el día 6 a 8 después de la inseminación artificial.

Los resultados mostraron que el número promedio de embriones obtenidos de cada vaca se redujo significativamente en la época cálida y que el porcentaje de óvulos no fertilizados aumentó considerablemente para este mismo tiempo. Adicionalmente se encontró un efecto marcado de la época del año sobre la capacidad de desarrollo in vitro de embriones mantenidos en medios de cultivo.

La Tabla 1. muestra que en la época de verano se degeneraron mayor número de mórulas después del tiempo de cultivo. Además, la proporción de morulas que llegaron al estado de blástula y eclosionaron disminuyó significativamente en la época cálida. Una tendencia similar se observó para embriones que se cultivaron en el estado de blastocisto (Tabla 2). Allí

TABLA 1. Capacidad de desarrollo de morulas en medios de cultivo, procedentes de vacas entre los 6 a 8 días postservicio según la época del año. (Monty y Racowsky, 1987)(a).

Estado después del cultivo	Epoca (b) de invierno (Media % + D.E.)	Epoca (b) de verano (Media % + D.E)	P
Degenerada	30.7 ± 7.7	87.7 ± 5.6	P < 0,001
Blastocisto	28.3 ± 8.0	1.5 ± 1.2	P < 0,0025
Blastocisto expandido	4.9 ± 2.3	2.3 ± 2.3	N.S (c)
Blastocisto eclosionado	36.1 ± 8.7	8.2 ± 5.1	P < 0,005

- (a) Cada valor representa la media ± D.E. del porcentaje de morulas de cada vaca.
 (b) El número total de morulas cultivadas en la estación fría fue 63, mientras que se cultivaron 47 en la estación cálida.
 (c) No significativo.

se muestra que una mayor cantidad de blastocitos se degeneraron antes de la expansión y consecuentemente menor cantidad sufrieron este proceso en la época de verano. Sin embargo, no hubo efecto de la época del año sobre la proporción de blastocistos que eclosionaron.

El retardo en el desarrollo de embriones que se observó en la época de verano, sugiere que un signo temprano de perturbación metabólica precede a la muerte del embrión. También se encontró que el estrés calórico reduce apreciablemente la capacidad del embrión bovino para llegar a estado de blástula y eclosionar de la zona pelúcida. Los autores mencionan que los mecanismos responsables de los efectos adversos del estrés por calor, sobre la sobrevivencia de embriones bovinos entre el día 6 y 8, pueden relacionarse con acción directa del calor sobre el embrión o por un efecto indirecto sobre el microambiente uterino, ya que el embrión es más susceptible al estrés térmico durante las primeras divisiones celulares.

Como complemento del trabajo anterior, Ryan y col., (1993), en Arabia Saudita llevaron a cabo un experimento en el verano e invierno con el fin de identificar el momento en el cual es más susceptible el embrión a los efectos ambientales. Los investigadores utilizaron vacas lecheras de varias edades que fueron sometidas a inseminación artificial. Los animales se agruparon en tres grupos experimentales. En el grupo 1 se recolectaron los embriones entre los días 6 ó 7 postinseminación, en el grupo 2 se recolectaron embriones entre los días 13-14 postinseminación y el grupo 3 se utilizó como control para las dos épocas. En este último grupo entre los días 25 y 35 postinseminación se evaluó la frecuencia cardíaca por ultrasonido.

Durante la época de verano se registraron temperaturas entre 44° y 53°C y en el invierno entre 15° y 20°C. La humedad relativa fue baja en ambas épocas, pero los animales se mantuvieron en condiciones de estabulación. El estudio encontró que en el verano la tasa de preñez de vacas del grupo 3 fue menor que la de vacas del grupo 1 (Tabla 3). En el invierno la tasa de preñez para los tres grupos experimentales no mostró diferencias significativas, pero para ambas épocas se encontraron diferencias significativas en la tasa de preñez de embriones colectados los días 13 a 14 de gestación, siendo menor el porcentaje en el verano (Tabla 3). Esta relación descrita anteriormente también se observó en las vacas del grupo control.

En la Figura 5 se observa que el porcentaje de embriones viables fue similar en el invierno en los grupos 1 y 2 de tratamiento. También se encuentra que

TABLA 2. Capacidad de desarrollo de blastocistos en medios de cultivo, procedentes en vacas entre los 6 a 8 días postservicio según la época del año. (Monty y Racowsky, 1987)(a).

Estado después del cultivo	Epoca (b) de invierno (Media, % + D.E)	Epoca (b) de verano (Media, % + D.E.)	P
Degenerado	34.8 ± 10.7	83.3 ± 6.8	P < 0,0025
Blastocisto expandido	36.5 ± 9.7	9.0 ± 5.2	P < 0,05
Blastocisto eclosionado	28.7 ± 10.2	7.7 ± 5.5	NS (c)

- (a) Cada valor representa la media ± D.E. del porcentaje de blastocistos de cada vaca.
- (b) El número total de blastocistos cultivados en la estación fría fue de 45, mientras que se cultivaron 29 en la estación cálida.
- (c) No significativo.

TABLA 3. Tasas de concepción para hembras lactantes en diferentes estados de gestación en la época de verano e invierno. (Ryan y col., 1993).

<u>Estación del año</u>	<u>Estado de Gestación</u>		
	<u>Día 6 - 7</u>	<u>Día 13 - 14</u>	<u>Día 25 - 35</u>
<u>Meses de verano</u>			
Número de hembras/grupo	62	59	106
Número de preñeces	22	12	22
%	35.5(a)	20.3(a)	20.7(a)
<u>Meses de invierno</u>			
Número de hembras/grupo	48	54	106
Número de preñeces	14	20	38
%	29.2(a)	37.0(b)	35.8(b)

(a, b) Medias en columnas con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

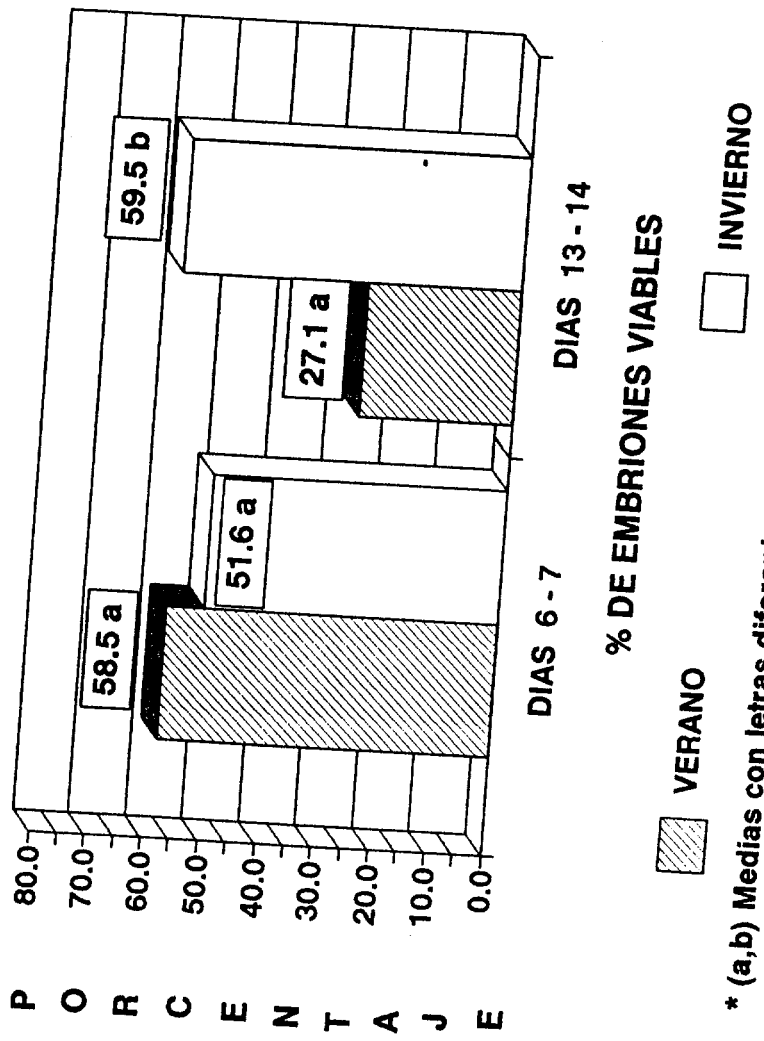
la viabilidad de embriones recuperados de vacas del grupo 1 en el verano fue igual a los del grupo 1 en el invierno, pero la viabilidad de embriones recuperados en los días 13 a 14 de gestación en verano fue significativamente menor que los de vacas en el invierno. En el verano el estado de desarrollo del embrión fue el principal factor que afectó la viabilidad del embrión. El análisis de regresión para esta época mostró que un 28% más de vacas tienen embriones viables en los días 6 a 7, en comparación con estados posteriores de desarrollo (Ryan y col., 1993). Esta relación no se observó en el invierno.

Este trabajo mostró que en el verano las vacas tienen mayor mortalidad embrionaria en los días 6 a 14 de gestación. Los resultados de este estudio son contrarios a los de Monty y Racowsky (1987), quienes mencionan que en el verano, la mortalidad del embrión es mayor en los primeros 7 días de gestación. Sin embargo los autores explican parcialmente estas diferencias, con relación a los diseños experimentales, ya que en el trabajo de Monty y Racowsky se utilizaron procedimientos de superovulación, los cuales pueden someter al animal a un estrés adicional, afectando el tiempo en el cual ocurre la muerte del embrión. Se ha encontrado que la superovulación puede alterar los perfiles endocrinos, lo cual puede producir ovulaciones prematuras (Callesen y col., 1985; citado por Ryan y col., 1992). Además se han asociado los tratamientos de superovulación con una mayor frecuencia de anomalías citogenéticas en el embrión (King, 1985).

El incremento significativo de la mortalidad del embrión que se observó los días 6 a 14 de gestación durante el verano, es similar al que reporta la literatura. En un trabajo realizado anteriormente, Ryan y col., (1992) estudió el efecto del estrés calórico sobre el desarrollo *In vitro* de embriones bovinos colectados el día 6 de gestación. Un grupo de embriones se cultivó con células de oviducto a 40°C por 60 horas (Estrés calórico crónico) y otro grupo a 43°C por 20 minutos (Estrés calórico agudo) también se tuvo un grupo control (38.6°C por 60 horas). En el estudio se encontró que la elevación crónica de la temperatura del cultivo aumenta la incidencia de muertes embrionarias, lo cual fue evidente poco después de la eclosión del embrión. Esto coincide con lo reportado anteriormente para estudios *In vivo* en los que se menciona que la mortalidad embrionaria en el verano aumenta de 41% el día 6 a 7, a 73% los días 13 a 14 de gestación (Ryan y col., 1993).

Para el grupo de embriones sometidos a estrés calórico agudo, se encontró un mayor desarrollo y viabilidad en el estado de blastocisto eclosionado.

FIGURAS PORCENTAJE DE EMBRIONES VIABLES EN LOS MESES DE VERANO (JUNIO - JULIO), e INVIERNO (DICIEMBRE - ENERO) EN ARABIA SAUDITA (RYAN Y COL, 1993)



* (a,b) Medias con letras diferentes difieren significativamente, ($p < 0.05$)

Cuando se someten embriones bovinos a estrés calórico por cortos períodos de tiempo se puede inducir la producción de proteínas del estrés calórico, alterando la expresión genética de las células embrionarias. Putney y col., (1988), mencionan que el conceptus bovino el día 17 de gestación produce proteínas de estrés calórico en respuesta a elevadas temperaturas ambientales. Se ha propuesto que estas proteínas actúan como moléculas que liberan a la célula de proteínas desnaturalizadas a través de su acción de proteasas y previenen la producción de agregados de proteínas o su desagregación cuando estos se forman (Lindquist, 1986; citado por Ryan, 1992). Por tanto, la producción de las proteínas del estrés calórico ayudan a mantener la integridad celular liberando al embrión de productos metabólicos tóxicos.

Con respecto a la viabilidad del conceptus en la segunda semana de gestación, Biggers y col., (1987), utilizaron 31 vacas para carne para determinar los efectos del estrés calórico sobre el desarrollo y la sobrevivencia del embrión. Los animales se mantuvieron en cámaras climáticas a una temperatura de 37°C por 12 horas, con una humedad relativa de 27% en el tratamiento 1 y de 38% en el tratamiento 2. Las vacas control se mantuvieron a temperatura de 21°C y humedad relativa de 35%. El día 17 de gestación se recolectó el tejido del conceptus y se evaluó el peso del cuerpo lúteo. En los resultados se encontró que la tasa de preñez no fue diferente entre grupos de tratamiento, pero el estrés calórico redujo significativamente el peso del conceptus y del cuerpo lúteo en las vacas sometidas a temperaturas de 37°C (Tabla 4).

Este efecto sobre el peso del conceptus se debe posiblemente a las altas temperaturas que en el útero aumentan las tasas metabólicas del conceptus, alterando su crecimiento y la captación de nutrientes. En igual forma el aumento de la temperatura corporal y la elevada concentración de progesterona que se encontró en vacas del grupo de tratamiento 2, puede alterar la secreción endometrial, desarrollando un ambiente poco favorable para el crecimiento del conceptus. Parece ser, que el conceptus de bajo peso no desarrolla al máximo la capacidad biosintética, requerida para producir la señal al sistema materno y mantener el cuerpo lúteo. Esto se demuestra cuando se encuentran bajos pesos del cuerpo lúteo en los animales sometidos a estrés calórico. Esta situación puede disminuir en mayor proporción las tasas de preñez después del día 17 en vacas sometidas a estrés calórico (Biggers y col., 1987).

TABLA 4. Valores medios de tasas de preñez, peso del conceptus y peso del cuerpo lúteo de vacas sometidas a estres calórico (Biggers y col., 1987).

<u>Concepto</u>	<u>TRATAMIENTO</u>			<u>E.E.</u>
	<u>Control</u>	<u>Tratamiento 1</u>	<u>Tratamiento 2</u>	
Tasa de preñez, %	82(9/11)(b)	67(6/9)	55(6/11)	14.5
Peso neto conceptus(a), mg.	157.9(cd)	110.6(c)	72.8(d)	21.3
Peso cuerpo lúteo, g.	3.39(e,f)	2.77(e)	2.80(d)	0.21

- (a) Promedio basado únicamente en vacas a las que se les recuperó tejido.
 (b) El número entre paréntesis es el número de vacas a las que se les recuperó conceptus del total de animales por tratamiento.
 (c,d) Medias con letra diferente son significativamente diferentes ($P < 0,01$).
 (e, f) Medias con letra diferente son significativamente diferentes ($P < 0,10$).
 E.E. Error Estandar.

En un estudio posterior, Geisert y col., (1988), examinaron efectos del estrés calórico sobre la secreción de la proteína trofoblástica bovina tipo 1 (PTB-1), necesaria para el mantenimiento del cuerpo lúteo y el reconocimiento materno de la preñez. Los autores encontraron que el estrés térmico los días 8 a 16 de gestación altera el microambiente uterino y reduce el peso del conceptus. Aunque el peso del conceptus fue menor, la síntesis y liberación de polipéptidos necesarios para el reconocimiento materno de la gestación no se alteró.

Retornando nuevamente a las experiencias sobre el conocimiento del estrés calórico en los primeros días de la gestación, hay que mencionar el trabajo realizado en la Universidad de la Florida por Putney y col., (1988). Estos investigadores diseñaron un experimento en 29 novillas Holstein para determinar si el estrés térmico durante los primeros 7 días de gestación, puede incrementar la incidencia de anomalías del embrión. Las novillas se sometieron a superovulación y se inseminaron el día del estro. Treinta horas después del estro, un grupo de novillas se mantuvo por 7 días en un ambiente termoneutral (20°C) y otro en condiciones de estrés calórico (30°C por 16 horas y 42°C por 8 horas). El día 7 después del estro los embriones se recuperaron y se evaluaron morfológicamente en cuanto a estado de desarrollo y calidad del embrión.

Los resultados muestran que la calidad y el porcentaje de embriones clasificados como excelentes a buenos, se redujo en las novillas sometidas a estrés calórico (Figura 6). Los embriones de novillas estresadas tuvieron un retardo en el desarrollo y el número de células por embrión fue menor. La distribución de embriones clasificados como normales, anormales, retardados o de óvulos no fertilizados es diferente entre grupos de tratamiento (Tabla 5). Las novillas del grupo de estrés calórico en comparación con el grupo control mostraron 30.74% menos de embriones normales, 13.6% más de embriones anormales y 18.73% más de embriones retardados. Estas diferencias fueron altamente significativas ($P < 0,001$). Para el porcentaje de óvulos no fertilizados no hubo diferencia entre los dos grupos. De 17 novillas sometidas a estrés calórico el porcentaje de embriones anormales y retardados se correlacionó significativamente con la temperatura rectal máxima durante la exposición a 42°C ($P < 0,001$ $r = 0,83$) (Figura 7).

Adicionalmente se realizó una evaluación posterior para embriones de vacas control y sometidas a estrés calórico, mediante la utilización del colorante fluorescente 4-6 diamidino 2 fenil, Indol (DAPI); el cual es altamente

FIGURA 6 DISTRIBUCION DE LA CALIDAD DEL EMBRION EN NOVILLAS MANTENIDAS EN AMBIENTE TERMONEUTRAL Y BAJO ESTRES CALORICO (PUTNEY Y COL, 1988)

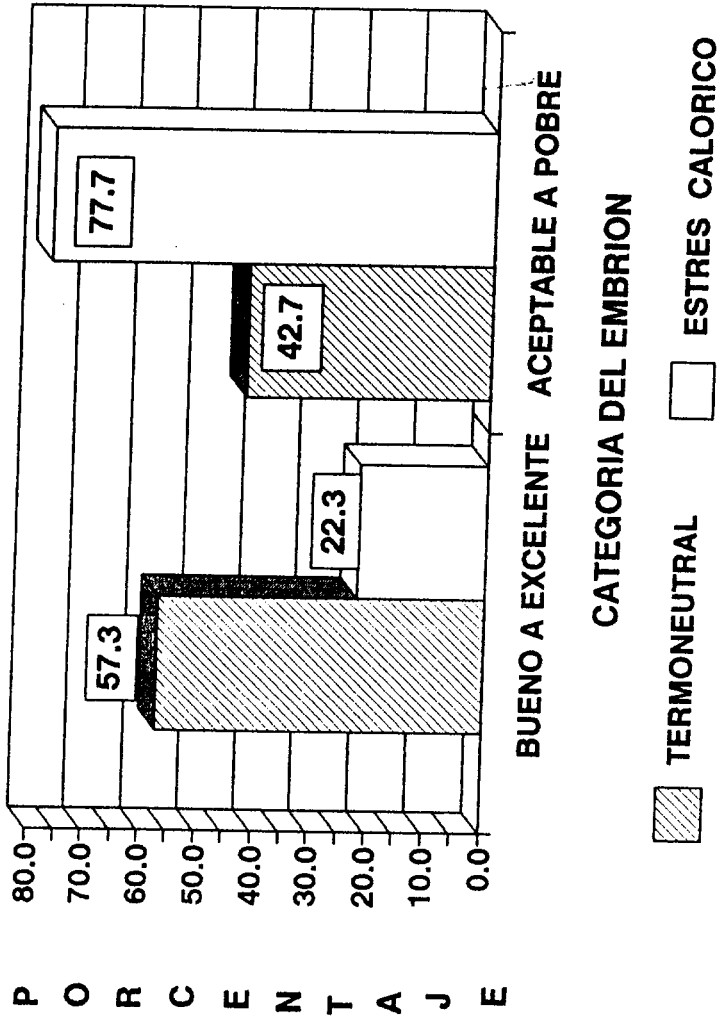


TABLA 5. Distribución de embriones normales, anormales o retardados y óvulos no fertilizados colectados de novillas control (20°C) y bajo estrés calórico (42°C). (Putney y col., 1988).

<u>Tratamiento</u>	<u>Categoría Embrión(a)</u>			
	<u>Normal</u>	<u>Anormal</u>	<u>Retardado</u>	<u>No fertilizado</u>
Control				
n = 68	35	9	11	13
%	51.47	13.24	16.18	19.12
Estrés calórico				
n = 82	17	22	28	15
%	20.73	26.83	34.15	18.29
Diferencias, %	30.74	13.60	18.75	0.83

$\chi^2 = 18.09$

(a) (P < 0,01) Distribución de embriones diferente entre tratamientos.

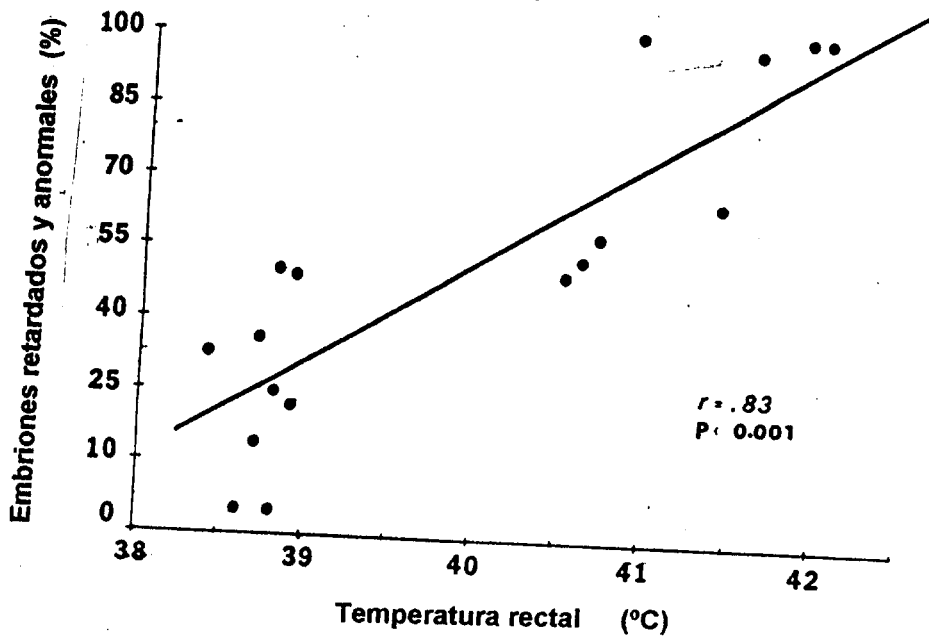


FIGURA 7. Efecto de la temperatura rectal de novillas sobre el porcentaje de embriones anormales y retardados, recuperados el día 7 de gestación (Putney y col., 1988).

sensible y afin al ADN y es capaz de penetrar la membrana nuclear y colorear el núcleo de las células (blastómeras), degeneradas o muertas. Esta evaluación se presenta en la Tabla 6. Los embriones normales, anormales y retardados muestran 31.6%, 83.3% y 100% de fluorescencia parcial respectivamente. Todos los óvulos no fertilizados muestran fluorescencia. La distribución de fluorescencia fue significativamente diferente ($P < 0,005$) entre los embriones de novillas control y sometidas a estrés calórico.

Este experimento mostró que en novillas mantenidas en condiciones de hipertemia tienen temperaturas rectales altas y frecuencias respiratorias elevadas. También se encontró que la distribución de embriones clasificados como normales, anormales y retardados, es diferente entre grupos de tratamiento. Las novillas con temperaturas rectales altas, tienen alto porcentaje de embriones anormales y retardados. Los embriones anormales y retardados contienen un alto porcentaje de blastómeras no viables. Estas respuestas indican que el estrés térmico (30 horas después del estro), aumenta la incidencia de embriones anormales y retardados.

Una de las estrategias que se pueden utilizar para evitar el periodo de mayor sensibilidad del embrión al estrés calórico (0-7 días postinseminación) es el de la transferencia de embriones. Putney y col., (1988), mencionan que las tasas de concepción de vacas receptoras en programas de transferencia de embriones, no disminuyen en el verano. Para comprobar esta observación, Putney y col., (1989), diseñaron un experimento con el fin de evaluar la ventaja potencial de la transferencia de embriones sobre la inseminación artificial, con respecto a las tasas de concepción en los meses de verano. Esto en un ambiente subtropical como el de la Florida. Para ello utilizaron como receptoras a vacas Holstein en producción y como donadoras a novillas Holstein que se sometieron a superovulación y se inseminaron durante el estro. Posteriormente estas novillas se manejaron en condiciones de sombra. El día 7 después del estro, se recuperaron los embriones y se transfirieron a las vacas lactantes embriones de calidad excelente y buena. Las vacas lactantes se manejaron bajo condiciones de exposición al calor (sin sombra). Un grupo de 524 vacas se utilizó como grupo control (inseminación artificial). La preñez en los animales experimentales se estableció por determinación de progesterona en leche el día 21 y por tacto rectal el día 45 a 60 después del estro.

En la Tabla 7 se observan las respuestas a la superovulación y las características de embriones recuperados, con relación a la temperatura

TABLA 6. Distribución de la reacción de fluorescencia DAFI de embriones clasificados por microscopio de luz en los 4 grupos (Putney y col., 1988).

Reacción DAFI (%) ^a				
<u>Grupo</u>	<u>N</u>	<u>Negativa</u>	<u>Parcialmente positiva</u>	<u>Positiva</u>
Normal	19	68.4 (13)	31.6 (6)	-
Anormal	12	16.7 (2)	83.3 (10)	-
Retardado	8	-	100.0 (8)	-
No fertilizado	12	-	-	100.0 (12)

a $\chi^2 = 70.1$, $P < 0,001$ Distribución de la reacción fluorescencia diferente entre grupos de embriones.

ambiental; allí se puede ver que la temperatura máxima no afectó el número de cuerpos lúteos inducidos, la recuperación y fertilización de óvulos, ni la calidad de embriones para transferencia. En contraste la distribución de embriones agrupados de acuerdo con el estado de desarrollo y la morfología fue influenciada por la temperatura.

La temperatura máxima se correlacionó significativamente ($R^2 = 0,66$ $P < 0,01$), con el aumento del porcentaje de embriones con 16 o menos células y con la disminución en el porcentaje de morulas (Figura 8). En forma similar la máxima temperatura ambiental se correlacionó significativamente ($R^2 = 0,45$ $P < 0,05$), con un aumento en el porcentaje de embriones clasificados como de calidad aceptable a pobre (Figura 9). Un alto porcentaje de embriones clasificados como aceptable a pobres y con menos de 16 células, se recuperaron de novillas expuestas a temperaturas ambientales superiores a 32.2°C. (Tabla 7).

El efecto del estrés calórico sobre las tasas de preñez, medido, como la temperatura ambiental máxima durante los primeros 7 días de gestación se muestra en la Tabla 8. Las tasas de preñez determinadas por la concentración de progesterona en leche el día 21 después del estro, fue mayor para las vacas receptoras que para las vacas inseminadas (Grupo control). En igual forma las tasas de preñez determinadas por tacto rectal entre los 40 a 60 días después de la transferencia del embrión o de la inseminación, fueron mayores en las vacas receptoras.

En resumen se puede mencionar que el estrés calórico de la época de verano en un ambiente subtropical como el de la Florida, aumenta la incidencia de embriones retardados (≤ 16 células), así como la de embriones clasificados como aceptables a pobres. Las tasas de preñez de vacas receptoras que recibieron embriones de buena calidad son significativamente mayores que las vacas expuestas a la inseminación artificial. En esta forma, la transferencia de embriones puede ser una alternativa para superar la infertilidad producida por el estrés calórico en condiciones de subtrópico.

Los estudios anteriores han mostrado que la disminución de la sobrevivencia del embrión en ambientes cálidos, puede relacionarse con los efectos adversos de elevadas temperaturas ambientales sobre el cigoto y el embrión en desarrollo.

TABLA 7. Respuestas a la superovulación y características de los embriones recuperados de novillas afectadas por la temperatura media máxima durante el desarrollo embrionario. (Días 0-7 post inseminación). (Putney y Col., 1989).

Distribución por temperatura ambiental			
Respuestas	N	< 32.2°C	≥ 32.2°C
Cuerpo lúteo	529	8.5 ± 1.6	10.4 ± 1.5
Ovulos recuperados	330	5.8 ± 1.3	6.1 ± 1.1
Ovulos fertilizados	234	4.3 ± 1.2	4.1 ± 0.8
Embriones para Transferencia (a)	162	3.5 ± 1.1	2.3 ± 0.7
Estado del Embrión (%)**			
≤ 16 Células	62	19.2	31.9
Morula (b)	103	53.4	37.0
Blastocisto(c)	69	27.3	31.1
Calidad del Embrión (%)*			
Excelente a bueno	133	59.6	54.8
Aceptable a pobre	101	40.4	45.2

(a) Embriones de calidad para transferencia (principalmente excelentes a buenos) Combinación de morula y

(b) Estado avanzado de morula.

(c) Combinación de blastocisto temprano y avanzado.

** $X^2 = 12.7$, $P < 0.01$, Distribución del estado del embrión diferente entre categorías de temperatura ambiental.

* $X^2 = 2.1$, $P < 0.10$, Distribución de la calidad del embrión diferente entre categorías de temperatura ambiental.

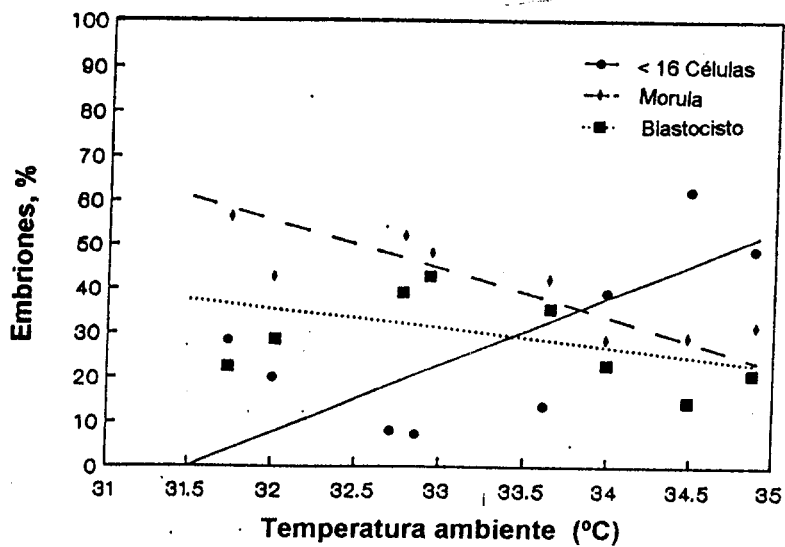


FIGURA 8. Efecto de la temperatura ambiental máxima a la que fueron sometidas novillas por un período de 7 días (Inseminación-Recuperación embriones) sobre el porcentaje de embriones clasificados por estado de desarrollo (Putney y col., 1989).

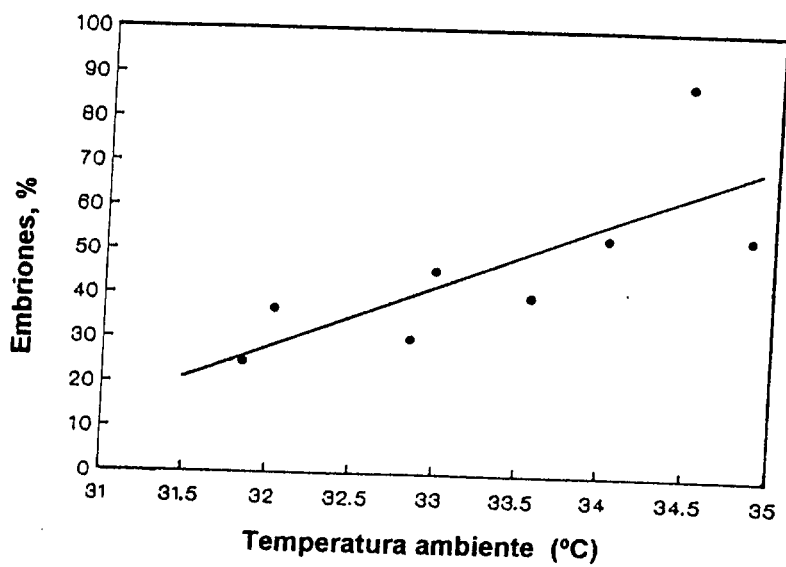


FIGURA 9 Efecto de la temperatura ambiental máxima a la que fueron sometidas novillas por un período de 7 días (Inseminación - Recuperación embriones) sobre el porcentaje de embriones clasificados por calidad aceptable a pobre (Putney y col., 1989).

TABLA 8. Tasas de preñez de vacas receptoras y de vacas lactantes inseminadas, determinadas por concentraciones de progesterona en leche (día 21 postestro) y tacto rectal (día 40-60 postestrus), afectadas por la temperatura media máxima ambiental durante el desarrollo embrionario entre los días 0-7 después de la transferencia o inseminación. (Putney y col., 1989).

Temperatura ambiente (°C)	TASAS DE PREÑEZ						
	N	Transferencia embriones			Inseminación		
		Día 21	Día 40	(n)	Día 21	Día 40	(n)
TOTAL***	637	47.6	29.2	(113)	18.0	13.5	(524)
< 32°C	350	35.5	22.9	(48)	15.6	13.9	(302)
≥ 32°C	287	54.7	33.8	(65)	20.7	13.1	(222)

** $X^2 = 13.562$, $P < 0,001$, tasas de preñez día 21 diferentes entre transferencia de embriones e inseminación artificial.

** $X^2 = 16.674$, $P < 0,001$, tasas de preñez día 40 a 60 diferentes entre transferencia de embriones e inseminación artificial.

La exposición de la vaca a elevadas temperaturas ambientales durante la maduración del oocito y la ovulación (Putney y col., 1989) o durante los primeros 3 a 7 días de gestación (Putney y col., 1988) disminuye la viabilidad del embrión y su desarrollo. En otras especies domésticas se ha observado que a medida que la gestación progresa los embriones adquieren resistencia a elevadas temperaturas. En la oveja y la cerda, los embriones son más sensibles a los efectos nocivos del estrés térmico durante los primeros dos días de gestación, pero son más resistentes al calor en el tercero y quinto día de gestación (Dutt, 1961; Omtvedt y col., 1967; citados por Ealy y col., (1993). Este incremento en la resistencia al calor puede relacionarse con respuestas bioquímicas que defienden al embrión de los efectos letales del calor. Un ejemplo de ellas son las proteínas del estrés calórico (Ryan y col., 1992).

Ealy y col., (1993), realizaron un experimento para observar si los embriones bovinos son más resistentes al estrés calórico a medida que la gestación avanza. Los investigadores utilizaron vacas Holstein lactantes que fueron superovuladas y servidas por inseminación artificial. Posteriormente se sometieron a estrés calórico el día 1, 3, 5 y 7 de gestación (día 0, día del estro). Un grupo de animales que no se sometió al calor se utilizó como grupo control. Los embriones se colectaron el día 8 de gestación y se evaluó su viabilidad y estado de desarrollo.

En los resultados se observó que las temperaturas rectales de vacas sometidas a estrés calórico fueron mayores que la de animales control (Tabla 9). El análisis de la información también reveló un efecto del tratamiento sobre la puntuación de embriones basada en las reacciones frente al colorante DAFI (sobrevivencia del embrión). El estrés calórico en la madre el día 1 de la gestación disminuye el número de embriones con calificación DAFI de 1 y 2 y aumenta la calificación DAFI a 4 (Tabla 9). Los tratamientos también afectan la proporción embriones clasificados como vivos o muertos. El porcentaje de embriones vivos fue significativamente menor el día 1, en comparación con el día 3 de gestación.

Con relación al estado de desarrollo del embrión se encontró que el estrés calórico el día 1 de la gestación, disminuyó el porcentaje de embriones en el estado de blastocisto y aumentó el porcentaje de embriones con 9 a 16 células (Tabla 10). Además, el porcentaje de óvulos no fertilizados o embriones con una célula fue menor en las vacas sometidas a estrés calórico el día 3. (Tabla 10).

TABLA 9. Efecto del estrés calórico durante los primeros días de la gestación sobre la temperatura rectal y la viabilidad del embrión de vacas lecheras. (Ealy y col., 1993).

Día del estrés calórico	Embriones ≥ 1 célula		Embriones ≥ 2 células		Temperatura rectal máxima (c) °C	Puntuación DAFI media (d)	Embriones vivos (e) %
	Vacas(a)	Embriones	Vacas (b) n	Embriones			
Control	20	118	18	94	39.1	2.2	70.2
1	11	50	9	40	41.3	2.5	55.0
3	8	50	8	50	40.9	2.0	68.0
5	10	23	9	20	41.7	2.2	65.0
7	5	31	5	27	41.0	1.7	88.9

- (a) Datos de vacas de las cuales al menos 1 embrión de 1 célula (Oocito no fertilizado) o estados subsecuentes fueron recuperados.
- (b) Datos de vacas de las cuales al menos 1 embrión de 2 células o estados subsecuentes fueron recuperados.
- (c) El control difiere de los otros tratamientos ($P < 0,05$).
- (d) El análisis estadístico por procedimientos categorizados (CATMOD) demostró un efecto de tratamiento sobre la puntuación DAFI ($P = 0,07$). El análisis de varianza encontró diferencia en la puntuación DAFI para embriones de vacas estresadas con calor el día 1, comparadas con embriones de vacas control y vacas estresadas el día 3 ($P = 0,07$); otros contrastes entre grupos de tratamientos no fueron significativos.
- (e) Representa el porcentaje calculado del número de embriones vivos dividido por el número total de embriones (> 2 células). El análisis por procedimientos categorizados (CATMOD) demostró un efecto de tratamiento sobre el porcentaje de embriones vivos ($P = 0,03$). El análisis de varianza, mostró que el porcentaje de embriones vivos difiere significativamente el día 1 comparado con el control y el día 3 ($P = 0,10$), otros contrastes entre grupos de tratamiento no fueron significativos.

Estos resultados demuestran que el embrión bovino adquiere resistencia a los efectos nocivos del calor a medida que la gestación avanza. En esta forma la vaca se comporta igual a la oveja y la cerda. Sin embargo, esto no implica que los embriones bovinos sean completamente resistentes al calor el día 3 de gestación, ya que un estrés de mayor duración e intensidad puede disminuir la sobrevivencia del embrión antes o después del primer día de gestación. Ya se mencionó que el estrés en la vaca durante el final de la maduración del oocito o en la ovulación afecta el desarrollo del embrión.

Además, se sabe que el desarrollo del conceptus disminuye cuando se someten vacas a estrés calórico los días 8 a 16 de gestación (Geisert y col., 1988). Se asume que en el bovino dependiendo del estado de desarrollo los embriones responden diferencialmente al estrés por calor. Es posible que el día 3 de gestación, los embriones adquieran cierta resistencia a estos efectos adversos (Ealy y col., 1993). El desarrollo de la termotolerancia del embrión bovino puede relacionarse con la habilidad del embrión a producir proteínas del estrés calórico en respuesta a altas temperaturas. Consistente con esta teoría se sabe que el genoma del embrión en el bovino se activa en el estado de desarrollo de 8 a 16 células (3 días de gestación) (Betteridge, 1988).

Este estudio plantea implicaciones prácticas para el mejoramiento de la fertilidad en climas cálidos. Una alternativa es manejar los animales en ambientes más benignos, especialmente, durante los períodos críticos de mortalidad embrionaria en condiciones de estrés por calor (final maduración oocito, ovulación, primeros días de la gestación). Otra alternativa es la administración de sustancias que protejan al embrión de los efectos dañinos de calor. Una de tales sustancias es el glutatión, un antioxidante el cual mejora la viabilidad y desarrollo del embrión bovino *In vitro*, cuando se somete a elevadas temperaturas. Este podría utilizarse en los primeros 3 días de la gestación. Recientemente Aréchiga y col., (1994), muestran que la administración de glutatión y vitamina E a embriones murinos sometidos a estrés por calor, reduce los efectos nocivos que afectan la viabilidad del embrión, pero no la proporción de embriones que alcanzan el estado de blastocisto. Resultados similares encontraron Malayer y col., (1992), cuando administraron Alanina y Taurina a embriones murinos sometidos a estrés por calor.

TABLA 10. Efecto del estrés calórico en vacas durante los primeros días de la gestación sobre el desarrollo de embriones recuperados el día 8 de gestación (Ealy y col., 1993).

EMBRIONES						
<u>Día de estrés calórico</u>	<u>(n)</u>	<u>1 célula (a)</u>	<u>2-8 células</u>	<u>9-16 células(b)</u>	<u>Morula</u>	<u>Blastocisto (c)</u>
				%		
Control	118	20	11	5	15	49
1	50	20	12	18	16	34
3	50	0	10	6	24	60
5	23	13	4	4	22	57
7	31	13	0	6	17	64

(a) Efecto tratamiento (P = 0,03)

(b) Efecto tratamiento (P = 0,04)

(c) Efecto tratamiento (P = 0,02); En el análisis de varianza, se observó que el porcentaje de blastocistos se redujo significativamente el día 1 comparado con el control y el día 3; otros contrastes entre grupos de tratamiento no fueron significativos.

BIBLIOGRAFIA

- Aréchiga, C.F; Ealy, A.D. and Hansen, P.J. 1994. Efficacy of vitamin E and glutathione for thermoprotection of murine morulae. *Theriogenology*. 41:1545-1553.
- Badinga, L.; Collier, R.J.; Thatcher, W.W. 1985. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. *J. Dairy Sci.* 68:78.
- Biggers, B.G.; Geisert, R.D.; Wetteman, R.P. and Buchanan, D.S. 1987. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. *J. Anim. Sci.* 64:1512-1518.
- Callesen, H., Greve, T. and Hyttel, P. 1987. Premature ovulations in superovulated cattle. *Theriogenology*. 28:155-166.
- Drost, M. and Thatcher, W.W. 1987. Heat stress in dairy cows. *Veterinary Clinical of North America: Food Animal Practice*. Vol. 3 N° 3.
- Dunlap, S.E.; Vincent, C.K. 1971. Influence of post-breeding thermal stress on conception rate In beef cattle. *J. Anim. Sci.* 32:1216.
- Du Press, J.H.; Terblanche, S.J.; Siesecke, W.H.; Maree, C. and Welding, M.C. 1991. Effect of heat stress on conception in a dairy herd model under south african conditions. *Theriogenology*, Vol. 35 N° 5.
- 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.* 76:2899-2905.
- Fortune, J.E. and Hansel, W. 1985. Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biol. Reprod.* 32:1069-1079.
- 10 - Geisert, R.D.; Zavy, M.T. and Biggers, B.G. 1988. Effect of heat stress on conceptus and uterine secretion in the bovine. *Theriogenology*. Vol 29(5):1075-1083.

- Guerriero, V. and Deborah, A.R. 1990. Synthesis of heat stress proteins in lymphocytes from Livestock. *J. Anim.Sci.* 68:2779-2783.
- Gwazdauskas, F.C.; Thatcher, W.W. and Wilcox, C.J. 1973. Physiological environmental and hormonal factors at insemination which may affect conception. *J.Dairy Sci.* 56, 873.
- Gwazdauskas, F.C.; Wilcox, C.J.; Thatcher, W.W. 1975. Environmental and managemental factors affecting conception rate in a subtropical climate. *J. Dairy Sci.* 58:88.
- Ingraham, R.E.; Stanley R.W.; Wagner, W.C. 1970. Relationship of temperature and humidity to conception rates of Holstein cows In Hawaii. *J. Dairy Sci.* 59:2086.
- Ingram, D.L.; Mount, L.E. 1975. Man and animals in hot environments. Ed. springer verlag. New York inc. Chapter 9. pp.123-145.
- Johnson, H.D. 1985. Physiological responses and productivity of cattle. In M.K. Yousef (Ed.). *Stress physiology In Livestock. Vol. II Ungulates.* 3-23. CRC press Boca Ratón, Fl.
- King, W.A. 1985. Intrinsic embryonic factors that may affect survival after transfer. *Theriogenology.* 23:161-174.
- Lee, C.N. 1993. Environmental stress effects on bovine reproduction. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* Vol. 9(2):263-273.
- Madan, M.L. and Johnson, H.D. 1973. Environmental heat effects on bovine luteinizing hormone. *J. Dairy Sci.* 56, 1420.
- 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.
- 21 - 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.* 68:266-280.

- Malayer, J.R.; Pollard, J.W.; Hansen, P.J. 1992. Modulation of thermal killing of bovine lymphocytes and preimplantation mouse embryos by alanine and taurine. American Journal of Veterinary Research (USA). V.53(5):689-694. Abst.
- 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. Vol. 28 N° 4. 451-465.
- Monty, D.E.; Wolff, L.K. 1974. Summer heat stress and reduced fertility in Holstein Friesian cows in Arizona. Am.J.Vet.Res. 35:1495.
- Putney, D.J.; Drost, M. and Thatcher, W.W. 1988. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. Theriogenology. Vol 30 p. 195-207.
- Putney, D.J.; Gross, T.S. and Thatcher, W.W. 1988. Prostaglandin secretion by endometrium of pregnant and cyclic cattle at Day 17 after oestrus in response to in vitro heat stress. J.Reprod.Fert. 84,475-483.
- Putney, D.J.; Drost, M. and Thatcher, W.W. 1989. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. Theriogenology. Vol. 31 N° 4. 765-779.
- Roberts, G.P.; Parker, J.M. 1974. An investigation of the enzymes and hormone-binding proteins in luminal fluid of the bovine uterus. J.Reprod. Fert. 305-313p.
- Roman-Ponce, H. Thatcher, W.W.; Buffington, D.E.; Wilcox, C.J.; 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.
- 3D - Ryan, D.P.; Blakewood, E.G.; Lynn, J.W.; Munyakasi, L. and Godke, R.A. 1992. Effect of heat-stress on bovine embryo development In vitro. J. Anim. Sci. 70:3490-3497.

- 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.
- Thatcher, W.W. 1974. Effects of season climate and temperature on reproduction and lactation. *J. Dairy Sci.*, 57:360.
- Thatcher, W.W. and Collier, R.J. 1986. Effects of climate on bovine reproduction. In *Current Therapy in Theriogenology*. Ed. by Morrow, D.A.; W.B. Saunders Co. Philadelphia. pp.301.309.
- Tucker, A.H. 1981. Heat stress as it affect animal production. *J. Anim. Sci.* 52.164.
- Ulberg, L.C.; Burfening, P.J. 1967. Embryo death resulting from adverse environment on spermatozoa or ova. *J. Anim. Sci.* 26:571.
- 36 - Wiltmut. Y.; Sales, D.I. 1981. Effect of an asynchronous environment on embryonic development in sheep. *J.Reprod.Fert.* 61:179.184.