

INFLUENCIA DEL ITH Y LA TEMPERATURA VAGINAL SOBRE EL ÍNDICE GESTACIONAL EN LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES FRESCOS O CONGELADOS PRODUCIDOS IN VITRO EN EL TRÓPICO

INFLUENCE OF THI AND VAGINAL TEMPERATURE OVER THE PREGNANCY INDEX IN FRESH AND FROZEN TRANSFERRED EMBRYOS PRODUCED IN VITRO IN THE TROPICS

*De Armas, Reinaldo. Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Zootecnia, Panamá. reinaldo.dearmas@up.ac.pa <https://orcid.org/0000-0003-2488-01>

Araúz, Edil E. Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Zootecnia, Panamá. edil.arauz@up.ac.pa <https://orcid.org/0000-0003-1204-0272>

*Autor de Correspondencia: reinaldo.dearmas@up.ac.pa
DOI <https://doi.org/10.48204/j.ia.v6n1.a4518>

Recibido: 08/05/2023

Aceptado: 18/10/2023

RESUMEN. La influencia del ITH, temperatura vestibular vaginal y el estrés calórico diario fueron evaluados sobre los resultados de la transferencia de embriones producidos in vitro frescos o congelados en 160 hembras cruzadas tipo leche. Las receptoras fueron sincronizadas con el esquema convencional para IATF y la transferencia se realizó a tiempo fijo [46 receptoras recibieron embriones frescos producidos in vitro (EPIVF) y 114 receptoras recibieron embriones producidos in vitro congelados (EPIVC)]. El ambiente al momento de la transferencia de los embriones y en lo sucesivo fue tipificado por psicrometría (temperatura, humedad relativa e índice temperatura humedad para bovinos). El estrés calórico al momento de la transferencia de los embriones fue severo (ITH de $82.92 \pm 2.84^\circ\text{C}\%$). La transferencia de embriones EPIVC resultó en 25.2% de preñeces y la transferencia con embriones EPIVF, la preñez fue 39.1%. Las temperaturas tegumentarias (TT) y vaginal vestibular (TVV) no fueron diferentes según los tipos de embrión y las categorías de receptoras ($p > .05$). La TV influyó sobre el índice de preñez con embriones EPIVF y EPIVC ($P < .01$). La falla gestacional aumentó a partir de la TV de 39.5°C con los embriones frescos y congelados ($p < .01$). Los embriones EPIVF presentaron un menor índice de gestación negativa a partir de la TV de 39.5°C ; superando a los EPIVC en -15.6%. Según la relación la TVV con las preñeces; debe utilizarse EPIVF si la TVV \geq a 39.5°C y utilizar EPIVC si la TVV es \leq a 39.0°C para mejorar el índice de preñez en el trópico.

PALABRAS CLAVE: Embriones frescos, congelados, estrés calórico.

ABSTRACT. The influence of THI, vagina temperature and daily heat stress were evaluated over the results of embryo transfers and gestation in 160 cows from dairy crosses aged from 3 to 6 years and classified as heifers, cows without calves and cows with calves. All animals were synchronized with the conventional scheme for FTAI and transfers were made at fixed time. 46 recipients received fresh embryos produced in vitro (FreEIVP) and 114 frozen embryos produced in vitro (FroEIVP). The environment at time of embryo transfers was typified by daily direct psychrometric procedures (ambient temperature, relative humidity and THIbovine) and also by indirect psychrometric evaluation. Heat Stress at the moment of embryo transfers was severe as THI was $82.92 \pm 2.84^\circ\text{C}\%$, which indicated all cow recipients were under daily heat stress. A 25.2% pregnancy rate was achieved with FroEIVP and 39.1% with FreEIVP. Tegumentary (TT) and vaginal temperatures (VVT) were not different in the recipients according to type of embryos, neither between cow categories ($p > .05$). The gestational failures increased from 39.5°C ($P < .01$) in fresh and frozen embryos. The VVT influence in the pregnancy index in both types of embryos ($p < .01$). The negative pregnancy index increased when VVT was 39.5°C in fresh and frozen embryos ($p < .01$). The FreEIVP showed a smaller negative pregnancy index when VVT was 39.5°C ; which -15.6% smaller than FroEIVP. FreEIVP should be used when VVT \geq to 39.5°C and FroEIVP when VVT \leq a 39.0°C in order to improve pregnancy index after embryos transfers in the tropic.



KEYWORDS: Fresh embryos, frozen, heat stress.

INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones a partir de ovocitos colectados por aspiración folicular *in vivo* de hembras bovinas en Panamá ha alcanzado una gran popularidad en los últimos años y ha logrado un gran impacto en la producción de sementales. Panamá es el tercer país que más ha producido y transferido embriones por fertilización *in vitro* en Centroamérica; a pesar de que comenzó a implementarse hace apenas 15 años (De Armas et al., 2019). No obstante, la disponibilidad de receptoras resulta una de las principales limitantes en la extensión de esta biotecnología reproductiva. En tal sentido la congelación de embriones puede mitigar esta dificultad, pero aún los resultados de gestación que se han logrado con embriones congelados producidos *in vitro* se consideran bajos (De Armas, 2020).

La viabilidad post transferencia de los embriones producidos *in vitro* y/o micromanipulados es marcadamente inferior a la de los embriones producidos *in vivo*; cuyas diferencias se aumentan cuando los embriones son criopreservados (Cutini et al., 2000; Guerra et al., 2012).

En la actualidad, el calentamiento global ha tenido un impacto en todo el mundo. La elevación de la temperatura ambiental, especialmente en verano, es un tema crítico en la ganadería e industria pecuaria. La productividad del ganado también se ve afectada por el estrés por calor, especialmente en la época seca. Entre los efectos se destacan: repercusiones en la fisiología sistémica, la termorregulación y reducción en la producción de leche (Arauz et al., 2010), disminución en la ingesta de materia seca, baja ganancia diaria y deterioro de la fertilidad debido a las alteraciones endocrinas y reproductivas (Wolfenson et al., 2000; Amundson et al., 2006; Liu et al., 2019).

Uno de los efectos más importantes del estrés por calor en la ganadería es la disminución de la reproducción del ganado. Se ha publicado desde la década de 1990 que la tasa de preñez por inseminación artificial (IA) en el ganado lechero disminuye drásticamente en los veranos (García-Ispuerto et al., 2006; Huang et al., 2009; De Rensis et al., 2017). Se considera que una de las principales razones de este efecto adverso es la elevación de la temperatura corporal, que altera las funciones ováricas y uterinas; las cuales están acompañadas de una elevada mortalidad embrionaria (Biggers et al., 1987; Dobson et al., 2001; Drost et al., 1999; De Armas y Pérez, 2002).

La elevación de la temperatura corporal materna afecta el establecimiento y desarrollo de la gestación debido a la disminución del flujo sanguíneo al tracto genital (Limesand et al., 2018), alteración del perfil secretor y circulante de las hormonas GnRH, FSH, LH, estrógenos y progesterona que controlan los procesos reproductivos, la calidad de los ovocitos, el éxito de la fertilización y el desarrollo del embrión (Sakatani, 2017; Kasimanickam y Kasimanickam, 2021). Otros efectos adversos más específicos relacionados con el estrés calórico son el deterioro de la maduración de los ovocitos y la alteración del desarrollo embrionario temprano (Wolfenson et al., 2000; Hansen, 2007).

La técnica de producción de embriones *in vitro* permite cultivar artificialmente ovocitos y embriones y evaluar en detalle el mecanismo de la muerte embrionaria temprana inducida por el estrés calórico. Por lo tanto, se han realizado muchos estudios *in vitro*, a lo largo del período desde



la maduración del ovocito hasta el desarrollo previo a la implantación, imitando la temperatura corporal materna en verano (Gendelman y Roth, 2012). Edwards et al., (2003) publicaron que se presentan pérdidas embrionarias en las especies que estudiaron con una elevación del umbral biotérmico de 2.0 a 2.5 °C por encima del límite superior de la temperatura corporal normal.

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado, el conocer el efecto de las temperaturas ambiente, cutánea e interna pudieran servir para tomar decisiones al momento de la transferencia de embriones producidos in vitro y más aún si estos han sido congelados. En Panamá no se han desarrollado investigaciones sobre el efecto que tiene la temperatura sobre la viabilidad post transferencia de embriones producidos in vitro. Sin embargo, De Armas y Pérez (2002), encontraron que, en la transferencia de embriones producidos in vivo por superovulación, había un efecto negativo de las altas temperaturas y la humedad, sobre los resultados de la gestación en las transferencias con embriones frescos y congelados.

Cupp, et al., (2012); Inskeep y Dailey (2005) y (Krishnan et al., 2017) han reportado la influencia negativa del estrés calórico sobre los resultados de la IA y TE en condiciones climáticas diferentes al clima tropical; incluyendo entornos ambientales subtropicales, templados y continentales. El clima es un factor que no se puede cambiar (Ambrose et al., 1999; Lozano et al., 2010; Gokhale y Sharma, 2021), pero existen alternativas estratégicas que permitirían atenuar el estrés calórico, las cuales pueden ser investigadas y evaluadas para mitigar el estrés calórico y sus efectos sobre la reproducción bovina. En tal sentido, esta investigación relacionará el entorno microclimático tropical y la biotermia de las receptoras a través de la temperatura tegumentaria y vaginal vestibular con los resultados de la transferencia de embriones producidos in vitro congelados y frescos sobre el éxito y fracaso de la gestación como producto de la aplicación de esta biotecnología reproductiva.

El objetivo del estudio fue relacionar la influencia de la temperatura vaginal vestibular y epidérmica sobre los resultados de la gestación a partir de la transferencia de embriones producidos in vitro congelados o frescos en el marco de la tipificación microambiental según la temperatura ambiental y el ITH al momento de las transferencias de los embriones aplicando la estratificación térmica corporal según el estrés calórico en la zona baja tropical.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se desarrolló en una finca ganadera del área de Cantagallo, Distrito de Alanje, Provincia de Chiriquí, República de Panamá, con la ubicación georreferenciada de latitud 8.36667 y longitud -82.6167; y coordenadas 8°24'15"N y 82°44'42"O. El clima de esta región se define como tropical de sabana según la clasificación de Köppen (Aguilar et al., 2016).

Las receptoras de embriones fueron hembras del cruce lechero (Holstein x Cebú y Pardo Suizo x Cebú) con edades de 3 a 6 años y categorizadas en novillas, vacas sin terneros y vacas con terneros al pie. Todas fueron sincronizadas con dispositivos intravaginales liberadores de progesterona (DIV de 1g P₄) + Benzoato de estradiol IM (2mg BE₂) en el día cero y retiro de los dispositivos en el día 8 con el acompañamiento de las aplicaciones IM de 0.5 mg de Cipionato de estradiol (CE₂) + 500µg de Cloprostenol (PGF_{2α} sintética) y 333 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG). La

transferencia de embriones se realizó a tiempo fijo nueve días después de retirar el dispositivo intravaginal por medio no quirúrgico. El resultado de la transferencia de embriones fue diagnosticado por ecografía con un escáner Mi-A015D y un transductor lineal transrectal con una frecuencia de 2.5 a 12 MHz. De las 160 hembras receptoras, 46 recibieron embriones frescos producidos in vitro (PIVF) y 114 recibieron embriones producidos in vitro congelados (PIVC). El proceso de la congelación fue el mismo para todos los embriones y la descongelación se realizó 10 segundos en aire y 30 segundos en agua a 35°C.

En información de las transferencias se registró la fecha, hora y mediciones de la temperatura ambiental, tegumentaria (en el ijar izquierdo) e intravaginal (vestíbulo vaginal) con un termómetro infrarrojo (Berrcom, Modelo: JXB-178). El período de transferencias se desarrolló durante 12 meses. El diagnóstico de la gestación se practicó a los 38 días posteriores a la transferencia de embriones (45 días post fertilización) por ecografía transrectal.

El entorno microambiental calórico contempló la valoración psicrométrica de la fase diurna antes, durante y después de la transferencia de los embriones; la cual incluyó la psicrometría directa en el área experimental (Curtis, 1983, Dikmen y Hansen, 2009) y la psicrometría indirecta diurna por asistencia satelital para Alanje, Distrito de Alanje, República de Panamá, Centro América; en los siguientes 45 días después de la transferencia de los embriones (World Weather online, 2023). La valoración del complejo calórico ambiental destacó la condición térmica e hídrica antes de la transferencia de los embriones dado que la termorregulación y la sobrecarga calórica de los homeotermos se encuentran modulada por la mayor presión calórica diurna y a su vez, ésta representa la zona de mayor estrés sistémico urogenital a lo largo de la subfase circadiana diurna para definir el biorritmo biotérmico prevalente en los bovinos (Araúz et al., 2010). En la subfase diurna ocurre el mayor grado de estrés calórico; donde se comprometen los procesos inherentes para el implante de los embriones (Putney et al., 1989; Sakatani, 2017), reconocimiento de la preñez (López et al., 2008; Maltes, 2011), mantenimiento del cuerpo lúteo funcional (Rosenberg et al., 1977; Thatcher et al., 1995), producción de prostaglandinas PGs (Iwazawa y Acosta, 2013) mantenimiento y nutrición del embrión (Taverné et al., 2002), supervivencia embrionaria (Edwards et al., 2003; Tovia et al., 2020) y desarrollo de la gestación exitosa (Wolfenson et al., 2000; West, 2003; Lozano et al., 2010).

Indicadores psicrométricos y biotérmicos

La tipificación térmica ambiental se realizó por psicrometría directa (Curtis, 1983; Dickmen y Hansen, 2009) e indirecta por asistencia satelital por geoposicionamiento para el corregimiento de Canta Gallo, Distrito de Alanje. La temperatura ambiental de bulbo seco, humedad relativa, radiación solar, entalpia y presión de vapor de agua se utilizaron como descriptores del microambiente para la subfase diurna circadiana por su relación con la definición del estrés calórico. El ITH para bovinos se determinó según la regresión múltiple $ITH_{\text{bovinos}} = (0.8 \times Tdb) + [(RH/100) \times (Tdb - 14.4)] + 46.4$ según Dickmen y Hansen (2009) y se generó el $ITH_{\text{Dajustado}}$ por radiación solar y velocidad del viento (Mader et al., 2006).

Análisis estadístico



El entorno ambiental de la finca según temperatura ambiental de bulbo seco, la humedad relativa y el ITH_{bovinos} e ITH que tipificaron el entorno calórico de los animales momentos antes de la transferencia de los embriones fueron estructurados según los tipos de embriones (congelados y frescos), la categoría de las receptoras (novillas, vacas sin terneros y vacas con terneros) y según el resultado de la gestación (positiva y negativa) fueron sometidos a un análisis de variación auxiliar para identificar las diferencias estadísticas en el acondicionamiento térmico y calórico ambiental y para generar la media térmica ambiental pre transferencia embrionaria en cada una de las 12 clases por tipo de embrión, categoría de la receptora y resultado de la gestación.

Los indicadores térmicos del animal (temperatura tegumentaria y vaginal vestibular) fueron registrados por receptora, fecha de la transferencia, tipo de embrión (fresco o congelado), categoría de la receptora y resultados de la transferencia. La matriz de datos fue comprimida y levantada en una hoja de Excel que fue configurada en la matriz por secuencia lógica integral para los análisis estadísticos en el programa SAS (2004). Los resultados de las transferencias de embriones por ecografía positivos o negativos fueron analizados según la prueba de Fisher Modificada mediante el arreglo factorial no paramétrico a través de la tabla de contingencia $A_2 \times B_2$ siendo A los tipos de embriones (A_1 embriones PIVF y A_2 embriones PIVC) y B los resultados del diagnóstico de la gestación (B_1 : positivo y B_2 : negativo) y la significancia fue entre 1% ($P < .01$) y 5% ($P < .05$).

El índice de éxito o fracaso de la gestación fue proyectada a través de las clases por temperatura vaginal vestibular estandarizada con intervalos térmicos cada 0.5°C a partir de la zona térmica típica generada según el procedimiento estadístico estandarizado (Gill 1978) a través de la rutina univariada de SAS (2004) descrita por Herrera y Barreras (2001). Este procedimiento permitió generar la tendencia polinómica para describir la trayectoria en el eje biotérmico por regresión polinómica (Herrera y Barreras, 2001). Se aplicó el análisis de correlación entre los indicadores psicrométricos y biotérmicos de las receptoras, en paralelo con los resultados de las transferencias según el análisis no paramétrico de Fisher modificado. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el Programa SAS (2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entorno térmico ambiental, ITH y estrés calórico potencial para las receptoras

El entorno térmico ambiental según el ITH fue homogéneo para las tres categorías de receptoras por estado reproductivo (novillas, vacas sin ternero y vacas con ternero) y tipos de embriones (congelados y frescos). El entorno térmico ambiental fue tipificado con énfasis en el índice de temperatura ambiental y humedad relativa para bovinos (ITH_{bovinos}); ya que la sensibilidad calórica en los rumiantes es más efectiva (Dikmen y Hansen, 2009).

El ITH del entorno animal antes de la transferencia de los embriones sostuvo su magnitud e intensidad del estrés calórico potencial para todas receptoras de los embriones como marco referencial. El estrés calórico potencial para los animales transferidos fue garantizado de acuerdo con la temperatura ambiental y el índice ITH detectado antes de la transferencia de los embriones (Tabla 1). El grado de tensión calórica ambiental fue muy severo y estuvo girando alrededor de un

ITH de 82.92 ± 2.84 ; lo cual contrasta con el valor máximo termoneutral de $72 \text{ }^\circ\text{C}\%$ (Mader et al., 2006; Dikmen y Hansen, 2009), lo cual indicó que todas las receptoras de embriones estuvieron bajo la misma intensidad del estrés calórico tropical a través del periodo del estudio.

El entorno microambiental previo a la transferencia de los embriones marcó una temperatura ambiental de $30.48 \pm 0.75 \text{ }^\circ\text{C}$, lo que significó que la carga térmica ambiental sobre las receptoras fue consistente y tensiva. Cuando se combinó la temperatura ambiental con la humedad relativa se generó el ITH promedio de $83.5 \pm 1.4 \text{ }^\circ\text{C}\%$ con una variación de 1.68%. En consecuencia, el grado de estrés calórico fue el mismo para todas las categorías de animales (Tabla 1). En términos biológicos, reproductivos y microecosistémicos, ninguna categoría de las receptoras tuvo acceso a un entorno ambiental termoneutral según los registros individuales y el ITH para los bovinos (Mader et al., 2006; Dikmen y Hansen 2009), ya que el rango de estrés calórico potencial estuvo entre 81 y 87 (Tabla 1).

Tabla 1

Medias de la Temperatura ambiental y del ITH_{bovinos} del entorno para las receptoras antes de la transferencia de los embriones en el medio microclimático de bajura tropical en Canta Gallo, Distrito de Alanje, Provincia de Chiriquí.

TIPO DE EMBRION	CATEGORIA REPRODUCTIVA	RESULTADO DE LA GESTACION	Temperatura Ambiente ($^\circ\text{C}$)	ITH _{BOVINOS} $^\circ\text{C}\%$
Embriones	novillas	negativas	29.9 ± 1.7	82.4 ± 2.8
Congelados	novillas	positivas	30.4 ± 1.9	83.5 ± 3.3
Transferidos (ECT)	vacas sin terneros	negativas	30.1 ± 1.4	81.4 ± 3.6
	vacas sin terneros	positivas	30.6 ± 1.6	83.7 ± 2.5
	vaca con ternero	negativas	30.8 ± 1.6	83.3 ± 1.9
	vaca con ternero	positivas	31.6 ± 1.2	85.1 ± 1.2
Embriones	novillas	negativas	30.6 ± 0.8	84.1 ± 0.3
Transferidos	novillas	positivas	30.8 ± 0.7	84.3 ± 1.3
Frescos (ETF)	vacas sin terneros	negativas	30.6 ± 1.0	84.2 ± 1.7
	vacas sin terneros	positivas	31.7 ± 0.2	86.1 ± 1.9
	vaca con ternero	negativas	29.1 ± 1.9	81.6 ± 3.0
	vaca con ternero	positivas	29.6 ± 2.7	82.3 ± 4.4

Condición térmica de las hembras receptoras de embriones

La temperatura epidérmica o exotegumentaria está influenciada por los elementos atmosféricos como la temperatura ambiental por encima de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y por humedad relativa al superar el 40% (West, 2003); mientras que la temperatura vaginal es más sostenida y correlacionada con la temperatura del término en los homeotermos (Fraser et al., 1993). Los valores críticos para el ITH en bovinos presentan un mínimo de 64, medio 72 y máximo $76 \text{ }^\circ\text{C}\%$ según Igono et al., (1992). En nuestro estudio, el ITH fue 82.92 ± 2.84 ; evidenciando la presencia potencial del estrés calórico efectivo para los bovinos, ya que el límite inferior alcanzó un ITH de $80.1 \text{ }^\circ\text{C}\%$ que representa un reto termoregulatorio en el ganado bovino.

Para reconocer la influencia del entorno ambiental sobre el ganado bovino deben medirse los valores térmicos y respiratorios en termoneutralidad y bajo aquellas condiciones que promuevan las alteraciones termorregulatorias. Fraser et al., (1993) indicaron que el ganado bovino debe tener una temperatura rectal entre 37.5 y 38.6 °C en condiciones de termoneutralidad, aunque en propedéutica veterinaria se utiliza el rango de 38.5 a 39.0 °C (Elizondo, 1998); mientras que Robles et al., (2014) señala que 37.7 a 39.0 °C es lo normal.

El estado calórico corporal de las receptoras según las temperaturas tegumentaria y la temperatura vaginal vestibular no mostraron diferencias estadísticas ($p > .05$) en ninguna de las doce categorías estructuradas para detectar la tipificación biotérmica sectorial según la técnica de Gill (1978). Se ratifica que el entorno ambiental y el grado de estrés calórico no fueron diferentes entre los 12 grupos de las receptoras y por ende su carga calórica corporal en base a la temperatura vaginal vestibular evidenció que todos los animales estuvieron sometidos a los mismos factores promotores del estrés calórico, pero también tuvieron las mismas oportunidades termolíticas para alcanzar el balance calórico positivo hasta el desarrollo de la hipertermia diurna sostenida al momento de la transferencia de los embriones.

Se ratificó que el entorno microclimático, térmico e higrométrico fue igual para todas las receptoras antes de la transferencia y por ende las temperaturas tegumentaria y vaginal fueron homogéneas entre las categorías por tipo de embrión transferido, categorías reproductivas y resultados de la transferencia embrionaria al variar entre 1.59% en la temperatura tegumentaria en el hígado izquierdo y 1.85% en la temperatura vaginal vestibular (Tabla 2).

Tabla 2

Análisis de varianza auxiliar para la temperatura epidérmica y temperatura vaginal vestibular en las hembras bovinas receptoras antes de la transferencia de embriones.

Fuentes de variación	GL	Cuadrado medio y significancia Temperatura Tegumentaria	Cuadrado medio y significancia Temperatura Vaginal
Tipo de Embrión (A)	1	0.00173809 NS	1.83785525 NS
Categoría Animal (B)	2	0.85640979 NS	0.42841318 NS
A*B	2	0.94106867 NS	0.58567374 NS
Resultado de la Preñez (C)	1	0.02037915 NS	0.33546657 NS
A*C	1	0.02896805 NS	0.98169215 NS
B*C	2	0.83861433 NS	0.14345964 NS
A*B*C	2	0.85364503 NS	0.52667255 NS
Residuo	148	0.34214325 NS	0.52618466 NS
R ²		0.1539	0.1218
CV %		1.589	1.849
Media Estándar		36.80	39.21
Error Estándar de la Media		0.58	0.73

A (transferencia de embriones congelados (ECT) y embriones frescos (EFT))

B (categorías de las receptoras: novillas, vacas secas y vacas con ternero)

C (resultado de la transferencia del embrión: negativo o positivo)

NS No existe diferencias estadísticas significativas ($P > .05$)



La temperatura tegumentaria estuvo 2.5 a 3 °C por arriba de la TT normal ya que osciló entre 36.4 y 37.1 °C; mientras que la TVV presentó en promedio entre +0.2 a + 1.0 °C sobre los valores fisiológicos descritos por Fraser et al., (1993); evidenciando la sobrecarga calórica e hipertermia diurna sostenida (Tabla 3). Esto confirma que todas las receptoras pasaron por el estrés calórico entre ligero a severo; ubicándose en la zona de riesgos para el logro de la gestación y el índice de preñez. Todos los procesos endocrinos y citológicos que acompañan el desarrollo embrionario, reconocimiento embrionario, desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo y la implantación son eventos críticos para alcanzar la meta reproductiva integral y el éxito de la gestación (Hansen, 2007; Diskin y Morris, 2008; Iwazawa y Acosta, 2013); en especial, cuando utilizamos técnicas biotecnológicas como la transferencia de embriones (Putney et al., 1989; De Armas et al., 2019). Las condiciones microambientales y microecosistémicas para la producción bovina tropical incluyen la presencia del estrés calórico diurno efectivo en diversas altitudes (Araúz et al., 2010); en cuyo caso, los índices de producción y la coloración del pelaje contribuyen para generar la sobrecarga calórica corporal diurna y la definición de la hipertermia diurna sostenida (Araúz, 2017).

Tabla 3

Medias de la Temperatura Tegumentaria y temperatura vaginal vestibular de las receptoras clasificadas según el tipo de embrión transferido, la categoría reproductiva y el resultado de la gestación.

TIPO DE EMBRION	CATEGORIA REPRODUCTIVA	RESULTADO DE LA GESTACION	Temperatura Tegumentaria (°C)	Temperatura Vaginal (°C)
Embriones	novillas	negativas	36.6 ± 0.8	39.3 ± 0.8
Congelados	novillas	positivas	36.7 ± 0.4	39.3 ± 0.4
	vacas secas	negativas	36.8 ± 0.8	39.2 ± 0.7
	vacas secas	positivas	36.8 ± 0.8	39.1 ± 0.9
	vaca con ternero	negativas	37.1 ± 0.5	39.4 ± 0.8
	vaca con ternero	positivas	37.1 ± 0.7	39.8 ± 0.4
Embriones	novillas	negativas	36.9 ± 0.3	38.8 ± 0.8
Frescos	novillas	positivas	36.4 ± 1.2	38.8 ± 0.6
	vacas secas	negativas	36.9 ± 0.9	39.6 ± 0.4
	vacas secas	positivas	36.4 ± 0.1	38.9 ± 0.1
	vaca con ternero	negativas	36.7 ± 1.0	39.2 ± 0.6
	vaca con ternero	positivas	37.8 ± 0.3	38.7 ± 0.6

Para interpretar nuestros resultados debemos reconocer que uno de los eventos más importantes en el logro de una gestación, es el reconocimiento materno de la preñez entre los 15 y 17 días que se da gracias a la intervención del interferón tau (INTF-t) como indican Thatcher et al., (1995). Esta proteína mantiene la morfología y funcionamiento del CL; determinando la liberación de la progesterona (P4), lo suficiente para que se pueda mantener la preñez (Thatcher et al., 1995 y Lenis et al., 2010). Para evitar la pérdida embrionaria, se debe establecer una conexión entre el embrión y el ambiente materno; ya que el embrión generará el INTF-t que bloqueará la prostaglandina F2α (PGF2α), evitando así la regresión del CL (Thatcher et al., 1995, Hansen et al., 1999). Una inadecuada comunicación entre el endometrio y el INTF-t, causaría importantes pérdidas embrionarias ya que los picos de PGF2α inducen la luteólisis (Olivera et al., 2007). La liberación



de receptores de oxitocina y estrógenos hacen que el INTF-t sea secretado en mayor proporción justo antes del contacto embrión-madre cuando empieza la preimplantación (Tithof et al., 2007; López et al., 2008).

Según Tovió et al (2020), las pérdidas embrionarias (25 al 40 %) son difíciles de diagnosticar ya que en la mayoría de los casos el retorno al celo es entre 20 a 22 días, manifestando un comportamiento estral regular, lo que se supone que las pérdidas se originaron entre los días 7 y 17; correspondiente entre el trasplante embrionario y el reconocimiento materno de la preñez. El establecimiento de la preñez presenta un “periodo crítico” definido entre los días 15 y 17; ya que la biología reproductiva durante este periodo es multifactorial y compleja. Una de las posibilidades, es que el endometrio podría recibir una señal antiluteolítica deficiente para ejercer el bloqueo del mecanismo de síntesis y liberación de PGF 2α endometrial.

Las alteraciones en el cuerpo lúteo son las causas más discutidas sobre pérdidas o mortalidad embrionaria en bovinos, encontrándose un acortamiento de la vida media del CL o una producción subnormal de progesterona (P4); comprometiendo el reconocimiento de la preñez (Thatcher et al., 2001; Maltes, 2011). Sin embargo, esta no es la única causa determinante de la mortalidad embrionaria, ya que hay otros factores involucrados; como el estrés calórico en particular (Wolfenson et al., 2000; Sakatani, 2017).

Resultados de la Gestación según la Transferencia de embriones frescos o congelados

Del total de embriones transferidos (160), se lograron 47 preñeces que correspondieron a un índice de preñez de 29.4%. Un total de 114 trasferencias de embriones producidos in vitro eran congelados (PIVC) y 46 de embriones fueron frescos (PIVF); alcanzándose un 25.2 y 39.1% en gestación respectivamente. Los resultados de la gestación logrados en las transferencias de embriones PIVF fueron ligeramente inferiores a los publicados previamente por nuestro grupo (De Armas et al., 2019), 39.1 vs 45.4% e inferiores a los alcanzados por otros investigadores (Taverné et al., 2002, Demetrio et al., 2020, Ferré et al., 2020), quienes obtuvieron resultados alrededor del 50% o superiores. Motivados por esta disminución en nuestros índices de gestación, se realizó la presente investigación, dada la gran importancia que posee el estrés calórico sobre la reproducción y más aún en las áreas tropicales como se ha señalado anteriormente en nuestro trabajo.

Influencia de la temperatura Vaginal Vestibular sobre el resultado de la gestación al transferir embriones congelados y frescos

La carga calórica sectorial del tracto genital en las receptoras según la Temperatura Vaginal vestibular (TVV) influyó de manera curvo lineal sobre el resultado negativo de gestación, verificada a los 38 días después de la transferencia (45 días de la fertilización); tanto en los embriones congelados como en los frescos. El rango biotérmico vaginal vestibular crítico para el resultado gestacional negativo fue entre 39.0 y 39.5 °C; indicando que entre 37.5 y 39.5 °C, la tendencia de las fallas gestacionales aumentaron exponencialmente al utilizar ambos tipos de embriones. Sin embargo, después del límite superior de la TVV crítica de 39.5 °C; los EPIVF presentaron un menor índice de gestación negativa; superando los embriones PIVF a los EPIVC en -15.55% para un diferencial en la TVV entre 39.5 y 41.0 °C. El aumento de 1.5 °C en la TVV

incrementó la falla gestacional en la transferencia de EPIVC a razón de 10.37% por cada 1 °C estandarizado de aumento en la TVV a partir de 39.5 °C (Tabla 4; Figura 1).

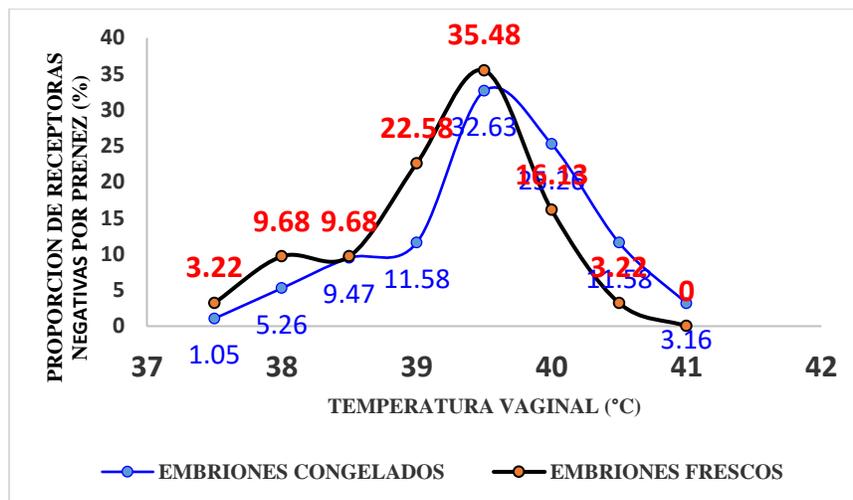
Tabla 4

Distribución de las receptoras cruzadas Bos taurus x Bos indicus con diagnóstico gestacional negativo a los 35 días después de la transferencia de embriones congelados o frescos bajo estrés calórico tropical.

TV (°C)	Proporción de receptoras con diagnóstico de preñez negativo (%)		Diferencial entre embriones partiendo de los frescos
	Congelados	Frescos	Diferencial (%)
37.5	1.05	3.22	+ 2.17
38.0	5.26	9.68	+4.42
38.5	9.47	9.68	+0.21
39.0	11.58	22.58	+11.00
39.5	32.63	35.48	+2.85
40.0	25.26	16.13	-9.13
40.5	11.58	3.22	-8.36
41.0	3.16	0	-3.16

Figura 1

Tendencia de la ocurrencia en la falla gestacional al utilizar embriones congelados y frescos según la temperatura vaginal vestibular en receptoras cruzadas Holstein x Cebú y Pardo Suizo x Cebú bajo estrés calórico en el trópico húmedo de bajura.



Estos resultados sugieren que si las hembras receptoras presentan una TVV superior a 39.5 °C, deberán ser transferidas con embriones frescos ya que ocurre una menor falla en los procesos que determinan el establecimiento de la gestación detectable a los 45 d del desarrollo embrionario bajo estrés calórico diurno. Es de considerar, que estos resultados se generan cuando ya el bovino ha recibido un reto termoregulatorio de +0.9 a +1.0 °C partiendo de la temperatura máxima normotérmica de 38.6 °C (Fraser et al., 1993); donde el estado de hipertermia fue sostenido con el acompañamiento de un ITH diurno entre moderado a severo.

En estudios realizados por Rosenberg et al., (1977), se evidencia que, en condiciones de estrés calórico, la función del cuerpo lúteo sufre alteraciones y se reduce la producción de P₄, lo que conllevaría a la muerte embrionaria. La mortalidad embrionaria se ha visto aumentada en zonas tropicales después de la exposición de la madre a temperaturas ambientales elevadas, lo que ocasiona un incremento de la temperatura uterina, un aumento de la producción de prostaglandinas en el útero y la interacción de la PGF₂α con la oxitocina en el entorno endometrial uterino. Los efectos causados por el estrés térmico sobre el embrión joven no son aparentes sino hasta las fases finales de su desarrollo, evidenciándose esto en embriones sometidos a temperaturas altas *in vitro*, los cuales se afectan, pero continúan su desarrollo para posteriormente morir durante la etapa de la implantación.

Se ha indicado que el estrés calórico causado entre los días 8 y 17 de la preñez alteran el ambiente uterino y reduce en un 72% la secreción de INTF-t, lo cual repercute negativamente sobre el mantenimiento del cuerpo lúteo y consecuentemente afecta la viabilidad del embrión. El entorno ambiental según el ITH diurno con la tipificación del estrés calórico de moderado a severo representa un reto calórico y termoregulatorio que modifica la temperatura corporal y determina la hipertermia sostenida durante la fase circadiana diurna. Por ende, se desarrolla el efecto térmico vectorial tipo domino a partir del entorno ambiental calórico y éste a su vez determina la hipertermia diurna sostenida; ya que el balance calórico positivo distorsiona la temperatura corporal y el perfil homeotermico durante el día.

El análisis psicrométrico diurno evidenció que durante todo el periodo en que se realizaron las transferencias de embriones se mantuvo la posibilidad de un ITH entre 79 y 84 °C% hasta las 6 p.m.; el cual presentó un estrés calórico potencial de moderado a severo antes de las transferencias de los embriones, pero también en resto de las horas diurnas.

La mortalidad embrionaria temprana sucede desde el 8^{vo} hasta el 24^{vo} día de la gestación y la mortalidad tardía se produce a partir del día 25 hasta el día 45 de la gestación. Con el interés de dar un porcentaje de pérdidas durante estos periodos; Dunne et al., (2000), indicaron que las pérdidas en los primeros 14 días de gestación alcanzan el 30%. Entre los días 14 y 19 ocurre el reconocimiento de la preñez y se pierden del 5 al 10% de las gestaciones, del día 18 al 28 otros 5 al 10% y del 30 al 45 nuevamente entre 5 al 10%, periodo en el cual empieza la formación de la placenta, de acuerdo con Bon Durant (2007) y Diskin y Morris (2008).

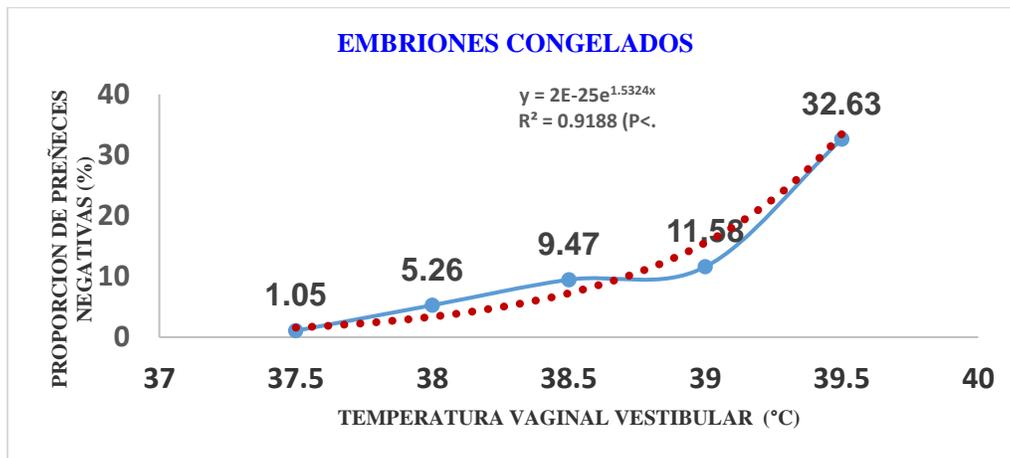
Se ha comprobado que los animales cebuinos (*Bos indicus*), son más resistentes y regulan mejor la temperatura, ya que poseen más glándulas sudoríparas, son menos productivos y su piel es más extensa en comparación con el ganado europeo (Berbigier, 1988). Por ejemplo, el estudio que realizó Hernández et al., (2004), donde compararon las razas *Bos indicus* o sus cruces planteó que

la ventaja integral es la adaptación a las altas temperaturas; habiendo desarrollado la tolerancia al estrés calórico; minimizando el impacto del golpe calórico y reduciendo la incidencia de la muerte embrionaria. Basados en estas afirmaciones, es que seleccionamos las receptoras en nuestro experimento (*Bos taurus* X *Bos indicus*); aunque también reflejaron la susceptibilidad a la mortalidad embrionaria frente al estrés calórico a pesar de la influencia cebuína (Figuras 2 y 3).

Como respuesta a este problema, Putney et al., (1989) y Rutledge (2001) recomendaron realizar transferencias de embriones (TE) y no aplicar montas naturales (MN) o inseminaciones artificiales (IA) en la estación de verano debido a la mayor incidencia del estrés calórico; donde la TE tiene ventajas. Esta estrategia es ventajosa porque los embriones se transfieren al 7^{mo} día y para este momento ya ha transcurrido el periodo de mayor susceptibilidad al estrés calórico y en consecuencia, se reduce la muerte embrionaria porcentual. Sin embargo, en el presente estudio se observó que la proporción de preñeces negativas aumentó en los embriones congelados y frescos a medida que aumentó la temperatura vaginal vestibular entre los 37.5 y 39.5 °C (Figuras 2 y 3); destacando una tendencia exponencial en ambos tipos de embriones transferidos.

Figura 2

Trayectoria del diagnóstico de la gestación negativa posterior a la transferencia de embriones congelados por debajo del punto crítico biotérmico vaginal en hembras bovinas cruzadas Holstein x Cebú y Pardo Suizo x Cebú bajo estrés calórico tropical.



El incremento de la TV entre 37.5 y 39.5°C estuvo asociado con el aumento en el número de receptoras con un diagnóstico negativo de la preñez de índole exponencial ($R^2 = 0.9188$, $P < .01$); cuyo aumento ascendió desde 1.05% a 37.5 °C hasta 32.63% a los 39.5 °C de TV, cuando se utilizaron EPIVC (2). El uso de los EPIVC en receptoras con una TV entre 37.5 y 39.5°C mostró una tendencia exponencial y aumento desde 3.22% hasta 35.48% (Figura 3). Esta ventaja relativa a favor de los embriones congelados, cambio después de alcanzarse una temperatura vaginal de 39.5 hasta los 41.0 °C. De acuerdo con los estudios de Enright et al., (2000) y Fair et al., (2001),

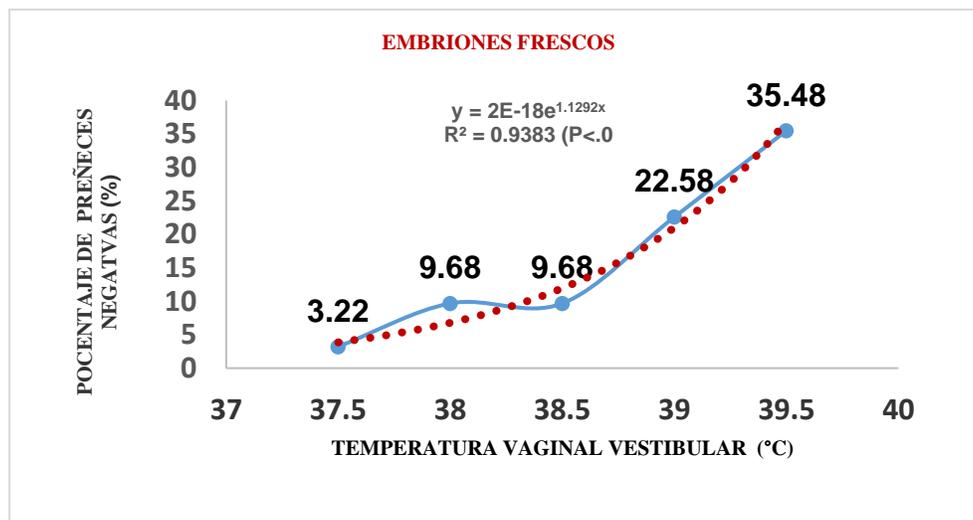
los EPIV son inferiores en términos de capacidad para resistir la crioconservación en comparación con los cigotos producidos in vivo.

El daño por estrés térmico después de la transferencia, podría ser la causa de una baja tasa de concepción en blastocistos sometidos a la crioconservación tal y como se encontró en nuestro trabajo. Ello también concuerda con Vasques et al. (1995), quienes sugirieron que el estrés por calor después de la transferencia de embriones crioconservados retrasó la función trofoblástica, lo que condujo a la muerte del embrión. Este informe estuvo de acuerdo con el resultado de que los blastocistos congelados y descongelados transferidos a receptoras expuestas al calor mostraron una expresión más baja de INTF-t (Sakatani 2017).

Krishnan et al., (2017) indicó que las pérdidas máximas de preñeces debido al estrés por calor ocurren durante el período embrionario temprano de 8 a 17 días de gestación. Adicionalmente, de acuerdo con Lopez-Gatius, (2003) y Inskip y Dailey (2005), el estrés por calor compromete el crecimiento embrionario hasta el día 17; período que se considera crítico para la producción de INTF-t por parte del embrión. La cantidad de INTF-t es crucial para reducir la secreción pulsátil de PGF2 α ; facilitando la persistencia del cuerpo lúteo para el mantenimiento de la preñez. Por lo tanto, el embrión de baja calidad (EPIV), injuriado por la congelación y un CL disfuncional son causas interaccionales que pueden incrementar drásticamente la muerte embrionaria durante el estrés por calor y disminuir el índice de preñez.

Figura 3

Trayectoria del diagnóstico de la gestación negativa posterior a la transferencia de EPIV por debajo del punto crítico biotérmico vaginal en hembras bovinas cruzadas Holstein x Cebú y Pardo Suizo x Cebú bajo estrés calórico tropical.



Entre los 37.5 y 39.5 °C de TVV, los EPIVC tuvieron una ventaja sobre los embriones frescos ya que presentaron un menor índice de gestación negativa en el diagnóstico efectuado al día 38 después de la transferencia. Sin embargo, a partir de la TVV de 39.5 °C, el índice de gestación negativo fue inferior cuando se utilizaron los EPIVF; acumulando entre los 39.5 y 41 °C un total

de -17.8% de receptoras con preñez negativa en comparación con las receptoras que recibieron EPIVC.

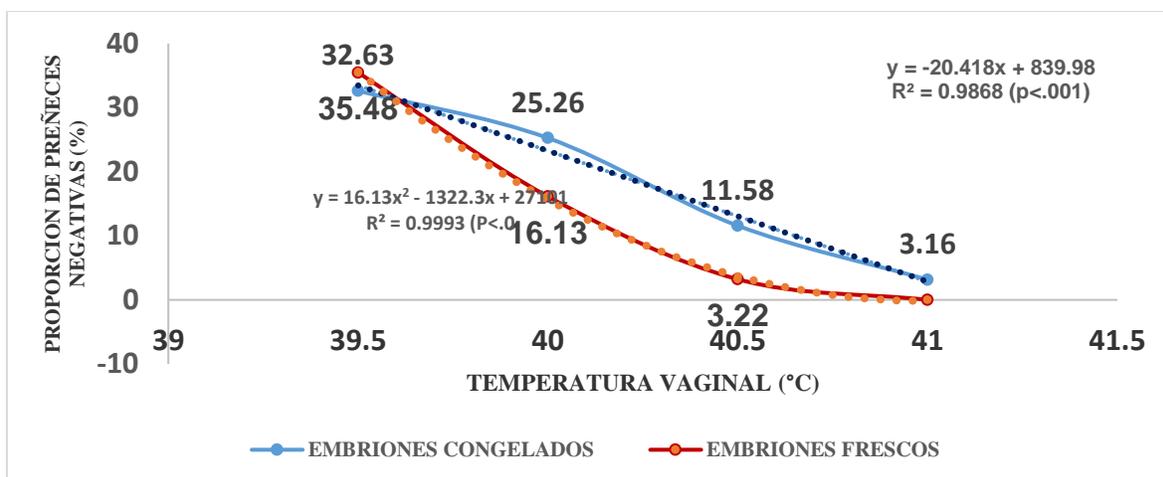
Lo publicado por Maltes (2011) puede en parte, explicar los resultados obtenidos en nuestro estudio donde se planteó que el origen de los embriones (EPIV), puede tener un impacto significativo en la dinámica de la mortalidad embrionaria cuando se evalúan los cambios temporales en el perfil transcripcional del embrión que se desarrolla a partir de un blastocisto esférico en el día 7 a un embrión ovoide en el inicio de la elongación en el día 13. Las diferencias en esta dinámica de expresión temporal de genes, se compararon los embriones derivados de los distintos sistemas de producción in vivo o in vitro, que pueden estar asociados con la supervivencia o mortalidad embrionaria. El análisis reveló que la principal influencia en la expresión de genes de embriones fue en la etapa del desarrollo embrionario; apareciendo las mayores diferencias en la expresión génica entre los días 7 y 13, independientemente del origen embrionario, en la cual se encontró una marcada divergencia en el perfil del transcriptoma de los embriones del día 13. Este hallazgo es crucial para el desarrollo normal durante este período crítico, siendo asociado únicamente con los embriones generados in vivo y por lo tanto potencia una mayor supervivencia que en los embriones derivados in vitro.

Por otro lado, los embriones producidos in vitro (PIV) muestran características morfológicas y funcionales distintas de los embriones que se obtienen in vivo (Rodríguez, 2008). Los blastocistos bovinos PIV contienen menos células totales y en la masa celular interna (MCI) que los producidos in vivo. El número de células es un indicador de la viabilidad del embrión. Adicionalmente, el grado de expresión de un número elevado de genes, la actividad metabólica y los índices de desarrollo registran análogas variaciones; lo cual pudiera explicar en parte, la mayor cantidad de pérdidas embrionarias que se experimentan con este tipo de embriones.

En concordancia con nuestros resultados, la baja tolerancia a las altas temperaturas en el tracto reproductivo bajo un estrés calórico de los EPIV puede ser explicada también por los trabajos de Holm y Callesen (1998). Ellos indicaron que las diferencias estructurales y funcionales entre los embriones producidos in vivo e in vitro; se destacan: un menor número de células, inicio de una blastulación más temprana y grandes diferencias entre la expresión de genes importantes para el metabolismo. Estas cualidades pueden ser causa de los bajos porcentajes de gestación al compararse con los obtenidos por embriones producidos in vivo. Adicionalmente, la alta cantidad de lípidos y su baja densidad de flotación que justificarían la baja tolerancia de los mismos ante la congelación, que de hecho causa daños irreversibles en las células embrionarias. Todo esto, lógicamente disminuye o limita aún más la producción del INTF-t necesario para la señal del reconocimiento de la gestación y para la síntesis y liberación de la PGF2 α .

Figura 4

Trayectoria del diagnóstico de gestación negativa posterior a la transferencia de EPIVF o EPIVC por encima del punto crítico biotérmico vaginal en hembras bovinas bajo estrés calórico.



Edwards et al., (2003), planteó que generalmente, los embriones expuestos al calor antes de la implantación en la pared uterina se recuperan completamente o se pierden, ya sea por falla en la implantación o muerte embrionaria. Esto puede resultar en mayores pérdidas previas a la implantación que pueden pasar desapercibidas. Claramente, los aumentos excesivos de temperatura pueden provocar la muerte en cualquier etapa, pero los variados procesos involucrados en la organogénesis (proliferación, diferenciación, migración y muerte celular) son particularmente susceptibles a la inducción de defectos de desarrollo en órganos o estructuras específicas.

Al parecer el efecto negativo del estrés calórico se manifiesta en el caso de los embriones congelados de una forma más drástica al sobrepasar los 39.5°C de temperatura vaginal; efectos que se manifestaron en nuestro trabajo en coincidencia con lo descrito por Morí et al., (2015), quienes indicaron que la aplicación de un choque térmico a los blastocistos (congelados-descongelados) fue muy dañina. El aumento de los daños por la interacción de la congelación-descongelación y el choque térmico podría ser una de las razones de la baja tasa de concepción en la transferencia de embriones congelados-descongelados en animales sometidos al estrés calórico en la zona de bajura tropical.

En concordancia con todo lo relacionado anteriormente, los resultados del presente estudio sugieren que, en presencia de estrés calórico tropical, la transferencia de embriones frescos (PIVF) nos ofrece una ventaja apreciable para lograr mejores resultados positivos de la gestación después que las receptoras presenten una temperatura vaginal vestibular igual o mayor a 39.5°C. De lo contrario, deberíamos utilizar embriones congelados (PIVC), si la temperatura vaginal es inferior a 39.0°C, como límite biotérmico crítico vaginal vestibular inferior. En otras palabras, no hay diferencias entre los embriones congelados y frescos si la temperatura vaginal de las receptoras es de 39.5°C, lo cual constituye el punto de inflexión biotérmica para la transferencia de embriones producidos in vitro congelados y frescos en hembras bovinas cruzadas; independientemente de las categorías empleadas (novillas, vacas secas y vacas con terneros) en el medio tropical húmedo.

CONCLUSIONES



- El entorno microclimático en la zona baja tropical donde se realizaron las transferencias de los embriones presentó las condiciones psicrométricas suficientes para desarrollar el estrés calórico potencial para los bovinos según el ITH en la fase diurna; y por ende, todas las receptoras sufrieron la alteración biotérmica; evidenciando la sobrecarga calórica corporal con la derivación de la hipertermia diurna sostenida en el día de las transferencias de los embriones.
- El complejo térmico e higrométrico ambiental diurno en los siguientes 45 días posteriores a la transferencia de los embriones fue categorizado por el ITH básico e ITH ajustado por radiación solar directa y velocidad del viento validaron el perfil del estrés calórico diurno potencial de moderado a severo para todas las receptoras.
- La temperatura vaginal vestibular al momento de la transferencia de los embriones fue el indicador biotérmico de mayor correlación con el entorno calórico e higrométrico ambiental y en consecuencia fue utilizado para la estratificación térmica sectorial para distribuir los resultados de la transferencia de los embriones según la gestación.
- El aumento de la temperatura vaginal vestibular y la hipertermia derivada por la influencia del estrés calórico diurno severo en las receptoras que recibieron embriones evidenció sostenidamente un aumento en la proporción del índice gestacional negativo, cuya magnitud y tendencia fue heterogénea entre los embriones congelados y frescos.
- La estratificación térmica de la temperatura vaginal vestibular y la distribución del índice de la gestación negativa en las receptoras indicó que el mayor índice de gestación positiva se logró con los embriones frescos cuando la temperatura vaginal vestibular fue superior a los 39.5°C; mientras que los embriones congelados brindaron el mayor índice gestacional por debajo de los 39.5°C.
- Los embriones frescos fueron más eficientes al permitir un mayor índice de éxito en la gestación debido que no han sido estresados por el congelamiento y el descongelamiento que son dos procesos de manejo biotecnológico que ocasionan estrés citológico biofísico y bioquímico a pesar de las mejores estrategias y los medios ideales para la criopreservación embrionaria.

RECOMENDACIONES

Los resultados del presente estudio sugieren que, para lograr mejores resultados de la preñez, se debe utilizar embriones congelados cuando la temperatura vaginal vestibular (TVV) es inferior a 39.5°C; mientras que si las receptoras presentan una TVV superior a 39.5°C se deberá utilizar embriones frescos en hembras receptoras bovinas cruzadas, independientemente de las categorías empleadas (novillas, vacas sin ternero y vacas con terneros) en la zona de bajura en el clima tropical húmedo.

REFERENCIAS

Aguilar, G.G., Salazar, L. I., y Pérez, J. (2016). Una nueva Regionalización Climática de Panamá como aporte a la seguridad hídrica. Disponible en línea en:



https://www.cathalac.int/document/CATHALAC_regiones_%20climaticas_de_panama.pdf

- Ambrose, J.D., Drost, M., Monson, R.L., Rutledge, J. J., Leibfried-Rutledge, M.L., Thatcher, M. J., Binelli, M., Hansen, P. J., Chenoweth, P. J. & Thatcher, W. W. (1999). Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cows. *J. Dairy Science*. 82: 2369-2376
- Amundson J. L, Mader T. L, Rasby R.J. & Hu Q. S. (2006). Environmental effects on pregnancy rate in beef cattle. *J. Anim. Sci.*: 84:3415–3420.
- Araúz, E. E. (2017, Septiembre). Influencia del color del pelaje sobre el comportamiento térmico corporal, cinética de la sobrecarga calórica y alteración cardiorrespiratoria circadiana em vacas lecheras cruzadas (6/8 *Bos taurus* x 2/8 *Bos indicus*) bajo estrés calórico em el trópico húmedo. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 18, (7), 1-45. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63652580007>
- Araúz, E. E., Fuentes, A. y Méndez, N. (2010, Noviembre). Alteración diurna de la carga calórica corporal e interrelación de las temperaturas rectal y láctea en vacas cruzadas (6/8 *Bos taurus* x 2/8 *Bos indicus*), Pardo Suizo y Holstein bajo estrés calórico diurno durante la época seca en el clima tropical húmedo. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 11, (16). 1-37. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63616933002>
- Berbigier, P. (1988). *Bioclimatologie des ruminants domestiques en zone tropicale*. 1ra Ed. INRA, Paris.
- 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: 1512–151.8
- Bon Durant, R.H. (2007). Selected Diseases and Conditions Associated with Bovine Conceptus Loss in the First Trimester. *Theriogenology*, 68, 461-473. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X07001690>
- Cupp, M. S., Dunn, J. L., Baumgard, L. H., Hamid, H. Y., Abu Bakar, Z., Md Z., Yong M., Goh, H., Abd, W. & Mohamed Mustapha, N. (2012). Effects of Elevated Ambient Temperature on Reproductive Outcomes and Offspring Growth Depend on Exposure Time. *The Scientific World Journal*. 10.1100/2012/359134
- Curtis S. E. (1983). *Psychometrics. Enviromental management in animal agriculture*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- Cutini, A., Teruel, M. y Cabodevila, J. (2000). Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. *Revista Taurus* 7:28-39.

- De Armas, R. (2020). Transferencia de embriones y su aceptación en la ganadería panameña. Disponible en línea en: https://www.academia.edu/17438729/Posibilidades_de_la_Biotec_Animal_como_herramienta_para_el_mej_ganadero_y_su_estado_actual_en_Panama
- De Armas, R., De Gracia, J. M. y Solís., A. (2019). Incidencia de cuerpos lúteos compactos (clcom) o cavitarios (clc), in vivo y su efecto sobre los resultados de preñez después de la transferencia de embriones bovinos producidos in vitro. *Revista Investigaciones Agropecuarias*. 1: (2). 1-14. Disponible en línea en: https://revistas.up.ac.pa/index.php/investigaciones_agropecuarias/article/view/491/422
- De Armas, R. y Pérez, L.L. (2002). Resultado de la transferencia de embriones congelados y frescos en novillas Holstein-Cebú, Región de Azuero (Bosque Tropical Seco). *Ciencia Agropecuaria*. 11: 75-86.
- Demetrio, D. G. B., Benedetti, E., Demetrio, C. G. B., Fonseca, J., Oliveira, M., Magalhaes, A. & Dos Santos, R. M. (2020). How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced in vitro? (12 years of practical results at a California dairy farm). *Animal reproduction*, 17(3), e20200053. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0053>
- De Rensis, F., Lopez-Gatius, F., García-Ispuerto, I., Morini, G. & Scaramuzzi, R.J. (2017). Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season. *Theriogenology*. 91: 145–153.
- Dikmen, S. & Hansen, P. J. (2009). Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? *J. Dairy Sci*. 92:109–116. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1370>
- Diskin, M. G. & Morris, D. G. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim*. 43(2):260-7.
- Dobson, H., Tebble, J.E., Smith, R.F. & Ward, W.R. (2001). Is stress really all that important? *Theriogenology*. 55: 65–73.
- 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 or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology*. 52: 1161–1167.
- 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. *Anim Reprod Sci*. 28;58(1-2):39-44. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(99\)00088-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(99)00088-3)

Edwards, M. J., Saunders, D. R. & Shiota, K. (2003). Effects of heat on embryos and fetuses, *International Journal of Hyperthermia*, 19:3, 295-324, <https://doi.org/10.1080/0265673021000039628>

Elizondo, V. C. (1998): *Propedéutica Clínica Veterinaria*. Ed. UAAAN, Depto. Ciencias Médico Veterinarias. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.

Enright, B. P., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward, F.A., Yang, X. & Boland, M.P. (2000). Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*. 54:659–673. Disponible en línea en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X00003812?via%3Dihub>

Fair, T., Lonergan, P., Dinnyes, A., Cottell, D.C., Hyttel, P., Ward, F.A. & Boland, M.P. (2001). Ultrastructure of bovine blastocyst following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev*. 58: 186-195. Disponible en línea en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11139231/>

Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L., Hyttel, P., Mermillod, P. & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. [Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods - ScienceDirect](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31760966/). Disponible en línea en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31760966/>

Fraser, C. M., J. A. Bergeron y S. E. Aiello. (1993). Constantes fisiológicas en circulación, respiración y termología animal. En: *El Manual Merck de Veterinaria*. Merck Sharp and Dome Company, NJ, USA.

García-Ispuerto, I., López-Gatius, F., Santolaria, P., Yániz, J.L., Nogareda, C., López-Béjar, M. & De Rensis, F. (2006). Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology*. 65: 799–807.

Gendelman, M. & Roth, Z. (2012). In vivo vs. in vitro models for studying the effects of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. *Animal Reproduction Science*. 134: (3–4) 125-134

Gill, J. (1978). *Nonparametric analysis in animal and medical sciences. Design and Analysis of Experiments in the Animal and Medical Sciences. Volume I, II and III*. Ed: Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

Gokhale, G., & Sharma, G. D. (2021). Adverse Impact of Heat Stress on Bovine Development: Causes and Strategies for Mitigation. In (Ed.), *bovine Science - Challenges and Advances*. IntechOpen. Disponible en línea en: <https://doi.org/10.5772/intechopen.99307>



- Guerra, R., Solis, A., Sandoya, G., y De Armas, R. (2012). Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos in vivo e in vitro. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 13(10).
- Hansen, P. J. (2007). Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology*. 2007;68(1):S242–S249. Disponible en línea en: [doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.008](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.008)
- Hansen, T., Austin, K., Perry, D., Pru, J., Teixeira, M. & Johnson, G. (1999). Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *Journal of reproduction and fertility*. 54, 329-339. [Disponible en línea en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10692865/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10692865/)
- Herrera, H. J. y Barreras S. A. (2001). Análisis de varianza y covarianza. Manual de análisis estadístico en experimentos pecuarios. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. Escuela superior de Graduados.
- Hernández, J., Chase, C. C. Jr. & Hansen, P. J. (2004). Differences in Heat Tolerance Between Preimplantation Embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. *J. Dairy Sci.* 87:53–58. Disponible en línea en: https://animal.ifas.ufl.edu/hansen/publications_pdf/docs/2004_hernandez.pdf
- Holm, P. H. & Callesen, H. (1998). In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr Dev*;38(6):579-94. Disponible en línea en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9932292/>
- Huang, C., Tsuruta, S., Bertrand, J.K., Misztal, I., Lawlor, T.J. & Clay, J.S. (2009). Trends for conception rate of Holsteins over time in the southeastern United States. *J. Dairy Sci.* 92: 4641–4647.
- Igono, M. O., Bjotvedt, G. & Sanford-Crane, H. T. (1992). Environmental profile and critical temperature effects on milk production of Holstein cows in desert climate. *Int. J. Biometeorol.* 36:77–87. Disponible en línea en: <https://www.windoo.it/wp-content/uploads/2018/11/Igono-1992.pdf>
- Inskeep, E. K. & Dailey, R.A. (2005). Embryonic death in cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*. 21: 437-461
- Irouléguy, J. M. (2011). Transferencia de embriones frescos a tiempo fijo: Algunas variables prevenir la tasa de preñez. Engormix. Disponible en línea en: https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/32-a_tiempo_fijo.pdf
- Iwazawa, M. & Acosta, T. (2013). Effect of elevated temperatures on bovine corpus luteum function: expression of heat-shock protein 70, cell viability and production of

progesterone and prostaglandins by cultured luteal cells. *Animal Production Science* 54(3) 285-291 <https://doi.org/10.1071/AN13027>

Kasimanickam, K. & Kasimanickam, V. (2021). Impact of heat stress on embryonic development during first 16 days of gestation in dairy cows. *Scientific Reports* | (2021) 11:14839 Disponible en línea en: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-94278-2.pdf?origin=ppub>

Krishnan, G., Bagath, M., Pragna, P., Vidya, M. K., Aleena, J., Ravindranathan Archana, P., Sejian, V., & Bhatta, R. (2017). Mitigation of the Heat Stress Impact in Livestock Reproduction. *Theriogenology*. IntechOpen. Disponible en línea en: <https://doi.org/10.5772/intechopen.69091>

Lenis, Y., Ramón, N., Restrepo, J., Olivera, M. y Tarazona, A. (2010). Interferón TAU en la ventana de reconocimiento materno embrionario bovino. *Revista UDCA*. 13, 17-28. Disponible en línea en: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/705>

Limesand, S. W., Leticia E. Camacho, Amy C. Kelly, Antolic, A. T. (2018). Impact of thermal stress on placental function and fetal physiology., nSupplement 1, p.886-898.

Limesand, S. W., Leticia, E. Camacho, A, Kelly, C. and Andrew, T. (2018). Impact of thermal stress on placental function and fetal physiology. *Animal Reproduction*. Vol.15, Suppl.1, 886-898. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0056>

Liu, Jiangjing, Lanqi Li, Xiaoli Chen, Yongqiang Lu, and Dong Wang. (2019). Effects of heat stress on body temperature, milk production, and reproduction in dairy cows: a novel idea for monitoring and evaluation of heat stress — A review. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2019 Sep; 32(9): 1332–1339. Disponible en línea en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6722315/>

López, A; Gómez, L; Ruiz, Z; Olivera, M y Giraldo, C. (2008). Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión: modelo bovino. *Analecta Veterinaria*, 28. Disponible en línea en: https://repositoriosdigitales.mincyt.gob.ar/vufind/Record/SEDICI_436ea95d6910fed94f5c787b31003f13

López-Gatius, F. (2003). Is fertility declining in dairy cattle?: A retrospective study in northeastern Spain. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01359-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01359-6)

Lozano, R. R., Asprón, M. A., Vásquez, C. G, González, E. and Aréchiga, C. F. (2010). Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 1(3), 189-203. Disponible en línea en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242010000300001&lng=es&tlng=es



- Mader, T. L. Mader, M. S. Davis, and T. Brown-Brandl. (2006). Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. Animal Science Department, University of Nebraska, Nebraska, USA. *J. Anim. Sci.* 2006. 84:712–719. Disponible en línea en: <https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1622&context=animalscifacpub>
- Maltes, M. C. (2011). Comunicación materno-embrionaria en la especie bovina, papel de la progesterona y calidad embrionaria en el estadio de elongación durante el reconocimiento materno de la gestación. Disponible en línea en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=165587>
- Mori M, Hayashi T, Isozaki Y, Takenouchi N, Sakatani M. Heat shock decreases the embryonic quality of frozen-thawed bovine blastocysts produced in vitro. *J Reprod Dev* 2015; 61: 423–429. <https://doi.org/10.1262/jrd.2015-003>
- Olivera, A., Tarazona, M., Ruíz, C., Giraldo, E. (2007). Modelo de luteólisis bovina. *Rev. Col. Ciencias Pecuarias.* 20, 387-393.
- Putney, D., Mullins, S., Thatcher, W.W., Drost, M. and Gross, T.S. (1989). Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Animal Reproduction Science.* 19, (1–2) 37-51. [http://doi.org/10.1016/0378-4320\(89\)90045-6](http://doi.org/10.1016/0378-4320(89)90045-6).
- Robles, J., Alcocer S., Pérez J., Ruiz R., Sandoval R. y Gonzáles L. (2014) Manual de prácticas de clínica de los bovinos 1. Universidad nacional autónoma de México, pp.14-20. Disponible en línea en: https://fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/Manuales/22_CLINICA_BOVINOS.pdf
- Rodríguez, A. (2008). Retinoides en el desarrollo embrionario bovino in vitro. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. España <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=180897>. Disponible en línea en: <https://www.educacion.gob.es/teseo/imprimirFicheroTesis.do?idFichero=I2W1Lm67LEM%3D>
- Rosenberg, M., Herz, Z., Davidson, M. and Folman, Y. (1977). Seasonal variations in post-partum plasma progesterone levels and conception in primiparous and multiparous dairy cows. Disponible en línea en: https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/51/2/jrf_51_2_009.xml
- Rutledge, J. J. (2001). Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. *Theriogenology.* 55: 1,105-111. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00449-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00449-0)
- SAS. (2004). Nonparametric Analysis, Correlation and Polinomic regressions. Statistical Analysis System, North Caroline State University, Relight, NC, USA.

- Sakatani, M. (2017). Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*. 63 (4): 347-352. Disponible en línea en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28496018/>
- Taverné, M., Breukelman, S., Perényi, Z., Dieleman, S., Vos, P. Jonker, H., de Ruigh, L., van Wagtenonk-de Leeuw, J.M., Beckers, J.F. (2002). The monitoring of bovine pregnancies derived from transfer of in vitro produced embryos. *Reproduction Nutrition Development*, 2002, 42 (6), pp.613-624. ff10.1051/rnd:2002047ff. fhal-00900426f Disponible en línea en: <https://hal.science/hal-00900426/document>
- Thatcher, W., Meyer, M. y Danet-Desnoyers, G. (1995). Maternal recognition of pregnancy. *Journal of reproduction and fertility*. 49, 15-28
- Thatcher, W. W., Guzeloglu A., Mattos R., Binelli M., Hansen T. R., and Pru J. K. (2001). Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 56: 1435-1450.
- Tithof, P; Roberts, M; Guan, W; Elgayyar, M y Godkin, J. (2007). Distinct phospholipase A2 enzymes regulate prostaglandin E2 and F2alpha production by bovine endometrial epithelial cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 5, 16. [Disponible en línea n: regulate prostaglandin E2 and F2a production by bovine endometrial epithelial cells/link/0e5fdc4af0c404bcbfb1cd1b/download](https://doi.org/10.1186/1297-9716-5-16)
- Tovió, N.L., Duica, A. A., y Grajales, H. L. (2020) Mortalidad embrionaria en bovinos. *Genética Bovina*. Nov. 2020. Disponible en línea en: <https://revistageneticabovina.com/biotecnologia/mortalidad-embrionaria/>
- Vasques, M. I., Horta, A. E. M., Marques, C.C., Sasser, R.G., Humblot, P. (1995). Levels of bPSPB throughout single and twin pregnancies after AI or transfer of IVM/IVF cattle embryos. *Animal Reproduction Science*, 38: 4, 279-289. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01373-T](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01373-T).
- West, J.W. (2003, Junio). Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 86, (Issue 6), 2131-2144, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73803-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X)
- Wolfenson, D., Roth, Z. and Meidan, R. (2000). Impaired reproduction in heat-stressed cattle: Basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.* 2000;60-61:535–547. Disponible en línea en: https://www.researchgate.net/profile/Rina-Meidan/publication/272090478_Impaired_reproduction_in_heat-stressed_cattle_basic_and_applied_aspects/links/54da583c0cf233119bc32acb/Impaired-reproduction-in-heat-stressed-cattle-basic-and-applied-aspects.pdf
- World Weather. (2023). Alanje Annual Weather Averages – Chiriquí, Panamá. <https://www.worldweatheronline.com/alanje-weather-averages/chiriqui/pa.aspx>

