



**Universidad Nacional del Litoral**  
*Facultad de Ciencias Veterinarias*

*Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada. ICIVET-Litoral.  
Facultad de Ciencias Veterinarias.*

*Tesis presentada para optar por el grado académico de  
Doctor en Ciencias Veterinarias*

**Programación fetal en vacas lecheras: influencia del  
estrés calórico durante la gestación sobre la  
fertilidad de las hijas**

**Autor: Mgter. Vet. Sebastián Recce**

**Directora: Dra. Natalia Raquel Salvetti**

**Codirector: Dr. Marcelo Lisandro Signorini Porchietto**

**AÑO 2022**

*“Cada día sabemos más y entendemos menos”.*  
*Albert Einstein*

*“La ciencia nunca resuelve un problema sin crear otros 10 más».*  
*George Bernard Shaw*

### *Dedicatorias*

A mis Padres, *Teresa y Alejandro*, por el incansable, silencioso sacrificio e inmensurable dedicación en nuestra educación, que forjaron en mis hermanos y en mí, para que seamos, ante todo, personas de bien y que siempre hay que luchar hasta el final.

A mi Esposa *Natalia* e hijos *Bautista e Isabella*, por entenderme, ayudarme (y padecerme) en mi profesión que siempre anhelé y sobre todo en los momentos tiranos que nos enfrentamos con frecuencia en este maravilloso mundo universitario.

A mis *Hermanos María, Alejandro y Hugo* y *TODA* mi *FAMILIA*, que, junto con mis padres, vivieron, me ayudaron y hasta sobrellevaron mis momentos difíciles durante todo el proceso de formación.

A todos mis *Amigos*, que Gracias a Dios son muchos y están siempre presentes.

A los que se fueron físicamente durante este último tiempo.

### *Agradecimientos*

A mi Directora, Dra. *Natalia Salvetti* y Co-director Dr. *Marcelo, Signorini*; por aceptarme como tesista y dedicar su valioso y cuantioso tiempo durante TODO el proceso del doctorado.

A los *Miembros del Jurado*, por su tiempo y considerables aportes para enriquecer la tesis.

Al Dr. *Hugo Ortega*, por brindarme la posibilidad de formarme dentro de su excelente, prestigioso y humano *EQUIPO de INVESTIGACIÓN* dentro del Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada ICIVET-Litoral.

A la Dra. *Fernanda Rodríguez*, Dra. *Florencia Rey*, Dra. *Emilia Huber*, Dr. *Pablo Díaz* y Dr. *Eduardo Matías Belotti* por su generosidad, predisposición y compromiso que los caracteriza, durante todo el camino de formación desde que comencé el doctorado.

Al querido Dr. *Ulises Notaro* que con su tranquilidad, voluntad y esfuerzo fuimos recorriendo juntos a la par este fabuloso trayecto de formación.

A la Dra. *Viviana Orcellet* por ofrecerme la oportunidad de ser su Ayudante de Cátedra (hace unos años ya), que fue el prelude de mi dedicación a la docencia y a la Méd.Vet. *Nadia Faba* por conformar un excelente Equipo de Cátedra en Genética Veterinaria y Mejoramiento Animal.

Al Méd. Vet. *Rafael Marengo* por colaborar y acompañarme con su tiempo a lo largo de todo mi doctorado.

A TODA la Comunidad de la *Facultad de Ciencias Veterinarias* de la Universidad Nacional del Litoral, por permitirme ser parte de esta gran familia, en la que el trabajo diario de TODOS SUS MIEMBROS, manifiesta a la sociedad que la educación es la mejor herramienta para el desarrollo de una Nación.

## INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS .....	i
INDICE DE FIGURAS .....	ii
ABREVIATURAS .....	iii
RESUMEN .....	v
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUCCIÓN .....	2
1.1. Programación Fetal. Epigenética. Reproducción Bovina. ....	2
1.2. Efectos de los Factores Ambientales sobre la Performance Reproductiva y Productiva Bovina. ....	9
1.3. Hipótesis .....	15
2. OBJETIVOS .....	17
2.1. Objetivo General .....	17
2.2. Objetivos Específicos.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. Análisis Retrospectivo .....	19
3.1.1. Base de Datos.....	19
3.1.2. Índice de Temperatura y Humedad (ITH) y Grupos de Animales .....	20
3.1.3. Análisis Estadístico .....	24
3.2. Evaluación de Parámetros Hormonales y Reproductivos en Vacas Holando Argentino expuestas a Diferentes ITH Durante su Desarrollo. ....	25
3.2.1. Animales .....	25
3.2.2. ITH y Grupos de Animales .....	25
3.2.3. Parámetros Evaluados.....	26
3.2.3.1. Sincronización del estro, seguimiento de los animales y obtención de muestras .....	26
3.2.3.2. Recuento de folículos antrales $\geq 3$ mm.....	28
3.2.3.3. Mediciones hormonales.....	28
3.2.4. Análisis Estadístico .....	30
4. RESULTADOS .....	32
4.1. Evaluación de índices reproductivos. Análisis Retrospectivo. ....	32
4.1.1. Intervalo Parto Concepción (IPC).....	32
4.1.1.1. Análisis Univariado .....	32
4.1.1.2. Análisis Multivariado.....	35
4.1.1.3. Resultados Complementarios al Modelo Final.....	36
4.1.2. Intervalo Parto Primer Servicio (IPPS).....	37

<b>4.1.2.1. Análisis Univariado.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.2.2. Análisis Multivariado.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.2.3. Resultados Complementarios al Modelo Final.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2. Evaluación de parámetros de fertilidad. Niveles hormonales y RFA.....</b>	<b>43</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1. Influencia del estrés calórico sobre los índices reproductivos. Análisis retrospectivo.....</b>	<b>48</b>
<b>5.2. Influencia del Estrés Calórico sobre Niveles Hormonales y RFA.....</b>	<b>53</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>61</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> ITH donde se indica los diferentes umbrales de intensidad. ....	<b>14</b>
<b>Tabla 2.</b> Variables utilizadas y su significado en el análisis estadístico a partir de la base de datos de 10.790 animales.....	<b>22</b>
<b>Tabla 3.</b> Variables utilizadas en el Estudio observacional sobre los animales.....	<b>29</b>
<b>Tabla 4.</b> Factores asociados a la modificación del Intervalo Parto Concepción (IPC).....	<b>32</b>
<b>Tabla 5.</b> Modelo Multivariante (AIC: 17291; $P < 0,001$ ; $n = 10.555$ ). Ajustado a partir de las variables que obtuvieron un $P < 0,150$ en el análisis univariado. Variable aleatoria: Tambo $P = 0,081$ . Variable de Respuesta: Intervalo Parto Concepción.....	<b>35</b>
<b>Tabla 6.</b> Factores potenciales asociados a la modificación del IPPS (Primer Parto) .....	<b>38</b>
<b>Tabla 7.</b> Modelo Multivariante (AIC: 14.037; $P < 0,001$ ; $n = 10.555$ ) ajustado a partir de las variables que obtuvieron un $P < 0,150$ en el análisis univariado. Variable aleatoria: Tambo: $P = 0,012$ . Variable de Respuesta: Intervalo Parto Primer Servicio (primer parto). ....	<b>41</b>
<b>Tabla 8.</b> Asociación entre la exposición a estrés por calor en los períodos P1 y P2 y gestación completa y las concentraciones hormonales sistémicas e intrafoliculares y RFA en las hijas durante la vida adulta. Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ ). Los valores de $p$ para asociaciones significativas fueron de $p \leq 0,05$ ; y para tendencias de $0,05 < p \leq 0,10$ . ..	<b>44</b>
<b>Tabla 9.</b> Asociación entre la exposición a estrés por calor en los tres Trimestres de la gestación y las concentraciones hormonales sistémicas e intrafoliculares y RFA en las hijas durante la vida adulta. Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ ). Los valores de $p$ para asociaciones significativas fueron de $p \leq 0,05$ ; y para tendencias de $0,05 < p \leq 0,10$ . ....	<b>45</b>

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** *Metilación de citosinas seguidas por guaninas (dinucleótidos CG). SAM: S-adenosil-metionina. La metilación del ADN ocurre sobre el carbono 5 de la citosina. Esto explica que aquellos genes que se encuentran altamente metilados, puedan presentar inhibición de su expresión. SAM: S-adenosil-metionina (dador del grupo metilo CH<sub>3</sub>). SAH: S-adenosil-homocisteína. DNMT: ADN metiltransferasa. Adapada de Holliday 2012. ....4*
- Figura 2.** *Esquema que representa la influencia de la metilación de islas CpG presentes en regiones regulatorias de los genes, en la expresión génica. La hipometilación (arriba) de CpGs presentes en la región 5'-UTR de un gen permite la transcripción y consecuente expresión génica del mismo. Por el contrario, la hipermetilación (abajo) de CpGs en dicha región reguladora perjudica la accesibilidad de la maquinaria transcripcional, reprimiendo de esta manera la expresión génica.....5*
- Figura 3.** *Secuencia temporal de eventos reproductivos en la vida de diferentes mamíferos. Se muestran las distintas etapas del desarrollo reproductivo para cada uno: inicio de meiosis y formación de la reserva de folículos primordiales (celeste), foliculogénesis previa a la pubertad (verde) y foliculogénesis seguida de ovulación posterior a la pubertad (naranja). Adaptada de Monniaux et al.(2014). ....7*
- Figura 4.** *Efectos epigenéticos sobre el comportamiento productivo de la vaca lechera. Adaptado de Rich (2016).....12*
- Figura 5.** *Fórmula de ITH. T° es la temperatura del aire expresada en °C. HR es la humedad relativa expresada en porcentaje. Adaptada de Thom (1959). ....13*
- Figura 6.** *Promedio mensual de ITH obtenido de los registros agrometeorológicos de INTA, EEA Rafaela durante el período 2000-2013. ....21*
- Figura 7.** *Línea de tiempo del periodo de evaluación de las vacas en estudio desde la concepción hasta el momento del primer servicio luego del primer parto .....24*

## ABREVIATURAS

**ACTH:** Hormona adrenocorticotrófica

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**AMH:** Hormona anti-Mülleriana

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**5'-UTR:** Región 5' no traducida (no codificante)

**CpG:** Dinucleótido Citocina-Guanina

**E2:** 17 $\beta$ -estradiol

**ECLIA:** Inmunoensayo de electroquimioluminiscencia

**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**FSH:** Hormona folículo estimulante

**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotrofinas

**HPA:** Hipotálamo-pituitario-adrenal

**HR:** Humedad relativa

**In:** Insulina

**IPC:** Intervalo de parto a concepción

**IPPS:** Intervalo de parto a primer servicio

**ITH:** Índice Temperatura-Humedad

**LF:** Líquido folicular

**LH:** Hormona Luteinizante

**MMLG:** Modelos lineales generalizados mixtos

**P1 Período 1:** 0-150 días de gestación

**P2 Período 2:** 151 días de gestación-nacimiento

**P4:** Progesterona

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PGF2 $\alpha$ :** Prostaglandina F-2 $\alpha$

**RFA:** Recuento de folículos antrales

**SAM:** S-adenosil Metionina

**T°:** Temperatura ambiental

**T1:** Trimestre 1 de la gestación

**T2:** Trimestre 2 de la gestación

**T3:** Trimestre 3 de la gestación

## RESUMEN

Existen factores estresantes durante el desarrollo fetal de un individuo que podrían afectar su salud en su vida adulta, impactando en su performance productiva y reproductiva, con efectos a largo plazo que atentarían contra la eficiencia del sistema de producción de leche. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar los parámetros reproductivos y de fertilidad en hembras bovinas que fueron gestadas bajo distintas situaciones ambientales y de manejo.

Para esto se realizó, en primera instancia, un estudio de cohortes retrospectivo analizando información obtenida a partir de una base de datos de 10.000 vacas Holando Argentino pertenecientes a la cuenca lechera santafesina. Se evaluaron datos de performance reproductiva durante la adultez, de acuerdo con el Índice Temperatura-Humedad (ITH) al que estuvieron expuestas sus madres durante la gestación. En una segunda instancia, se realizó la evaluación de parámetros relacionados con la fertilidad en 102 vacas Holando Argentino, incluyendo parámetros hormonales y recuento folicular, con base a la exposición a condiciones ambientales durante diferentes momentos de su gestación.

El impacto del ITH cuantificado a través de las variables ciclos con ITH alto en primer trimestre y la mediana de ciclos con ITH alto en primer trimestre de la gestación, mostraron asociaciones estadísticas con las variables respuestas *Intervalo Parto Concepción* ( $P=0,023$ ) e *Intervalo Parto Primer Servicio al Primer Parto* ( $P=0,015$ ) de la progenie. Pudo determinarse un incremento de las variables relacionadas a la performance reproductiva a medida que el ITH era mayor. Por otra parte, las vacas gestadas bajo condiciones de  $ITH \geq 72$  durante todo su desarrollo mostraron una disminución en la concentración de *17- $\beta$ -estradiol en líquido folicular* ( $P= 0,05$ ) en su vida adulta. Asimismo, las vacas expuestas a mayor cantidad de ciclos con  $ITH \geq 72$  en el primer trimestre de su gestación ( $P= 0,045$ ) y mayor porcentaje de días con ITH alto en igual período gestacional ( $P= 0,052$ ), manifestaron una asociación positiva con los niveles de *17- $\beta$ -estradiol en plasma*. Por su parte, la concentración de *progesterona en líquido folicular* mostró una asociación positiva ( $P= 0,025$ ) con el ITH durante el segundo trimestre de gestación, es decir, que las vacas con mayor exposición a ITH elevado en dicho período, presentaron un aumento en la concentración de progesterona intrafolicular. Por otra parte, la variable *recuento de folículos antrales* registró una tendencia negativa con el ITH durante los primeros 150 días de gestación ( $P= 0,100$ ) y la cuantificación de *insulina en plasma* presentó una tendencia positiva con la variable ciclos con ITH alto en tercer trimestre de gestación ( $P= 0,089$ ) y ciclos con ITH alto durante el día 151 de gestación al parto ( $P= 0,080$ ).

Es probable que las altas temperaturas que se presentan en la zona de estudio, cuantificadas a través del ITH, generen cambios en el ambiente uterino y en el feto, lo que conduciría a

alteraciones permanentes en la vida adulta y posiblemente en las generaciones futuras. Estos resultados contribuyen al conocimiento general de la programación fetal y permitirán mejorar las herramientas de manejo y las condiciones en las que se mantienen las vacas durante las estaciones cálidas.

## ABSTRACT

There are stressors during the fetal development of an individual that could affect their health in their adult life, impacting their productive and reproductive performance, with long-term effects that would threaten the efficiency of the milk production system. The present work aims to evaluate the reproductive and fertility parameters in bovine females that were gestated under different environmental and management situations.

For this, a retrospective cohort study was carried out, in the first instance, analyzing information obtained from a database of 10,000 Holando Argentino cows belonging to the Santa Fe dairy basin. Reproductive performance data were evaluated during adulthood, according to the Temperature-Humidity Index (THI) to which their mothers were exposed during pregnancy. In a second instance, the evaluation of parameters related to fertility was carried out in 102 Holando Argentino cows, including hormonal parameters and follicular count, based on exposure to environmental conditions during different moments of their gestation.

The impact of the THI quantified through the variables cycles with high THI in the first trimester and the median of cycles with high THI in the first trimester of gestation, showed statistical associations in the response variables *Interval from Calving to Conception* ( $P = 0.023$ ) and from *Calving to First Service* ( $P = 0.015$ ) of the progeny. It was possible to determine an increase in the variables related to reproductive performance as the THI was higher. On the other hand, cows gestated under conditions of  $\text{THI} \geq 72$  throughout their development showed a decrease in the concentration of *17- $\beta$ -estradiol in follicular fluid* ( $P = 0.05$ ) in their adult life. Likewise, the cows that had a greater number of cycles with  $\text{THI} \geq 72$  in the first trimester of gestation ( $P = 0.045$ ) and higher percentage of days with high THI in the same gestational period ( $P = 0.052$ ), showed a positive association with the levels of 17- $\beta$ -estradiol in plasma. On the other hand, the *concentration of progesterone in follicular fluid* showed a positive association ( $P = 0.025$ ) with the THI during the second trimester of gestation, that is to say, that the cows with greater exposure to elevated THI in said period, showed an increase in the intrafollicular progesterone concentration.

On the other hand, the *antral follicle count* variable registered a negative trend with the THI during the first 150 days of gestation ( $P = 0.100$ ) and the quantification of *insulin in plasma* showed a positive trend with the variable cycles with high THI in the third trimester of gestation ( $P = 0.089$ ) and cycles with high THI during day 151 of gestation to delivery ( $P = 0.080$ ).

It is likely that the high temperatures that occur in the study area, quantified through the THI generate changes in the uterine environment and in the fetus, which would lead to permanent alterations in adult life and possibly in future generations. These results contribute to the general

understanding of fetal programming and will improve management tools and the conditions in which cows are kept during hot seasons.

# **1. INTRODUCCIÓN**

---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Programación Fetal. Epigenética. Reproducción Bovina.

En Argentina se ha evidenciado en las últimas dos décadas un proceso de avance de la superficie agrícola y que, sumado a otros factores del país y del mundo, actuaron en detrimento de la producción ganadera en general y de la producción láctea en particular. Esto provocó el cierre de establecimientos productores de leche de pequeña escala y el aumento de otros de mayor tamaño, los que incrementaron el volumen de leche producido. En este sentido, en agosto del 2018 las cifras alcanzaron a 10.731 unidades productivas con 1.584.962 vacas. En rigor estadístico, las tasas de reducción de tambos y vacas arrojarían -3,7% y -5,0%, respectivamente en comparación del año anterior (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina, 2018. OCLA, 2018).

Asimismo, se observó una reducción en la proporción de sistemas de producción de leche bajo condiciones estrictamente pastoriles con escasa suplementación y simultáneamente, se registró un aumento de explotaciones con mayor intensificación (incremento en la carga animal por hectárea y mayor suplementación estratégica). Al respecto, se observa que el incremento de la carga animal se produjo por una disminución de la superficie ganadera y no por un aumento en el número de cabezas. La menor oferta forrajera hizo necesaria la suplementación nutricional para lograr buenos parámetros productivos por animal. Dicha suplementación se basó en productos de la agricultura, principalmente grano y silaje de maíz (Melo, 2004). Todo lo mencionado, les demanda a los actuales sistemas productivos incrementar su eficiencia para competir con el avance de la frontera agrícola (Schneider y Comerón, 2002).

Bajo el actual contexto, que no es solo inherente a la Argentina sino a los principales países con un importante aporte de *commodities* en sus economías, los sistemas de producción lechera disponen de una serie de factores que deben estar concatenados para el éxito del mismo. Uno de estos factores es la reproducción del ganado lechero. Las vacas deben parir a intervalos que permitan maximizar la producción lechera del rodeo y la producción individual en toda la vida de la vaca (Forero, 2004).

Existe evidencia en bovinos (Ouellet *et al.*, 2020) que parte de la infertilidad que se manifiesta en los registros reproductivos de los sistemas de producción lechera desde hace unas décadas, podría tener su génesis en cambios epigenéticos. Aunque el término epigenética ha tomado relevancia en la década del 80, ya durante el año 1940, el biólogo y genetista Conrad Waddington lo utilizó en sus investigaciones. La epigenética hoy puede ser definida como los

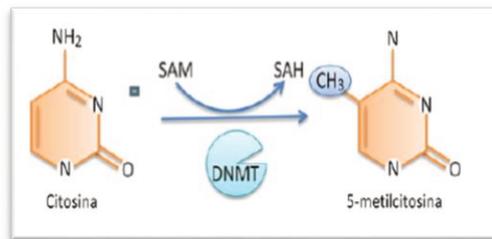
cambios en la función de los genes que son heredables por mitosis y por meiosis, que no entrañan una modificación en la secuencia del ADN y que pueden ser reversibles (Holliday, 2002). El término indica cambios heredables en la estructura y organización del ADN que no involucran modificaciones en la secuencia y que modulan la expresión génica. Estos cambios en la expresión génica implican, entonces, cambios heredables en el fenotipo (Morgan y Whitelaw, 2008; Bártová *et al.*, 2008). En la actualidad reconocemos que este proceso se logra mediante marcas moleculares detectables. Dichas marcas generan modificaciones que afectan la actividad transcripcional de los genes y, una vez establecidas, son relativamente estables en las siguientes generaciones (Morgan y Whitelaw, 2008). De acuerdo con ello, las funciones de los genes pueden ser de dos niveles:

- transmisión del material genético de generación en generación, lo que sería el campo de la *genética*; y
- cómo funcionan los genes durante el desarrollo de un organismo desde la fertilización del ovocito hasta el adulto, lo que sería el campo de la *epigenética*.

Thomas Jenuwein (2015), intentando explicar ambos niveles (genética-epigenética) describió que *“la diferencia entre genética y epigenética probablemente puede compararse con la divergencia que existe entre escribir y leer un libro. Una vez que el libro ha sido escrito, el texto (los genes o la información almacenada en el ADN) será el mismo en todas las copias que se distribuyan entre los lectores. Sin embargo, cada lector podría interpretar la historia del libro de una forma ligeramente diferente, con sus diferentes emociones y proyecciones que pueden ir cambiando a medida que se desarrollan los capítulos. De una forma muy similar, la epigenética permitiría diferentes interpretaciones de un molde fijo (el libro o código genético) y resultaría en diferentes lecturas, dependiendo de las condiciones variables en las que se interprete el molde”*.

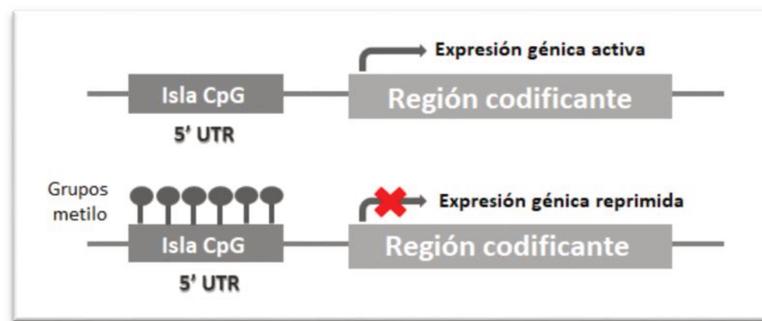
En definitiva, la epigenética surge para dar respuesta a observaciones que no pueden ser explicadas por los principios genéticos tradicionales, es decir, constituye un puente entre las influencias genéticas y las ambientales (Holliday, 2002). En la actualidad, un gran número de investigadores se encuentran trabajando en epigenética aplicada a la performance reproductiva de animales de interés veterinario, entre ellas las vacas lecheras. Parte del funcionamiento de la epigenética se basa en que existen muchos factores que intervienen en la expresión de los genes. Mediante la regulación epigenética, los genes son parcial o completamente apagados, lo que se conocen como “silenciamiento genético”, esto significa que esos genes no se expresan (Rich,

2013). El silenciamiento genético ocurre por medio de tres procesos principales: la metilación del ADN, la modificación de la cromatina y mediante los ARN no codificantes. Uno de los procesos más estudiados es la metilación del ADN (Figura 1) en donde la citosina adyacente a una guanina en el ácido nucleico, en los sitios conocidos como islas CpG, puede ser metilada, generándose una forma llamada 5-metilcitosina.



**Figura 1.** Metilación de citosinas seguidas por guaninas (dinucleótidos CG). SAM: S-adenosil-metionina. La metilación del ADN ocurre sobre el carbono 5 de la citosina. Esto explica que aquellos genes que se encuentran altamente metilados, puedan presentar inhibición de su expresión. SAM: S-adenosil-metionina (dador del grupo metilo CH<sub>3</sub>). SAH: S-adenosil-homocisteína. DNMT: ADN metiltransferasa. Adaptada de Holliday 2002.

El incremento en la metilación de un gen hace que sea menos probable que se exprese, silenciándolo. Mientras que la metilación silencia un gen, la secuencia de ese gen es la misma que fue heredada de los progenitores del individuo. Adicionalmente, la metilación es reversible, es decir, un gen apagado puede encenderse nuevamente. Sin embargo, el ADN metilado puede ser transmitido durante la fertilización. Cuando esto ocurre, el gen apagado puede transferirse de una generación a la siguiente, proceso denominado epigenética transgeneracional (Rich, 2013). Como ejemplo, en las vacas lecheras, los genes que controlan la producción de leche en la glándula mamaria están fuertemente metilados durante el periodo seco (Singh *et al.*, 2012). Obviamente esos genes se encienden nuevamente, metilación mediante, al iniciar la siguiente lactancia (Singh *et al.*, 2012) (Figura 2).



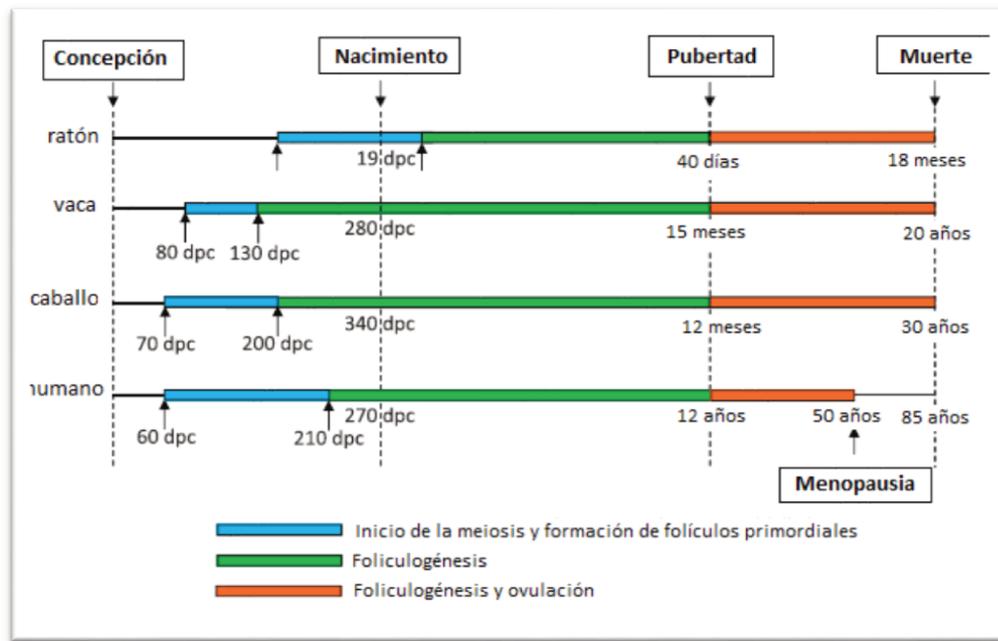
**Figura 2.** Esquema que representa la influencia de la metilación de islas CpG presentes en regiones regulatorias de los genes, en la expresión génica. La hipometilación (arriba) de CpGs presentes en la región 5'-UTR de un gen permite la transcripción y consecuente expresión génica del mismo. Por el contrario, la hipermetilación (abajo) de CpGs en dicha región reguladora perjudica la accesibilidad de la maquinaria transcripcional, reprimiendo de esta manera la expresión génica.

Otro proceso importante de silenciamiento genético es la *modificación de la cromatina*. En este sentido es sabido que el cromosoma está compuesto por un par de hebras de ADN condensado alrededor de un complejo de ocho proteínas denominadas histonas que conforman el nucleosoma. Esta estructura condensa y empaqueta el ADN en lo que se conoce como cromatina, la estructura más familiar de un cromosoma y la forma en que el ADN se encuentra en el núcleo de las células. Así, una molécula de ADN que mide 3 metros es condensada en un cromosoma de solo 0,0000001 metros de longitud. De esta manera, los genes que se encuentran en una cromatina poco condensada (abierta) presentan un mayor acceso físico a la maquinaria celular de expresión genética y es más probable que estén “encendidos”. Esta característica es también reversible y, al igual que la metilación del ADN, se cree que se puede transmitir de una generación a la siguiente (Rich, 2013). Las diferentes modificaciones en el ADN (metilación) y en la cromatina, dirigen a cambios en la condensación de la misma que regulan el ingreso de la maquinaria transcripcional y por lo tanto la expresión génica (García Robles *et al.*, 2012). Es sabido que todas las células somáticas de un individuo tienen genomas idénticos. Sin embargo, cada célula tiene uno de los muchos epigenomas, es decir, un conjunto único de instrucciones epigenéticas para establecer y mantener los perfiles de expresión específicos de linaje (Jenuwein, 2006). El genoma está programado para expresar conjuntos apropiados de genes en tejidos particulares en momentos específicos durante la vida de un individuo. Los eventos epigenéticos crean una memoria de identidad de la célula que sirve para conservar las

funciones genómicas tales como el mantenimiento de la identidad de células después de la diferenciación y la propagación de las características esenciales de la arquitectura cromosómica (Probst *et al.*, 2009). A diferencia de la información genética, que es extremadamente estable, los eventos epigenéticos son reversibles y responden a señales exógenas (ambientales) y endógenas. Existe evidencia experimental que sugiere que las marcas epigenéticas sirven como un recuerdo de la exposición en la vida temprana a ambientes inadecuados y que estas marcas inducen cambios a largo plazo en la expresión génica, que puede conducir a la enfermedad en la edad adulta (Gabory *et al.*, 2011). A esto se lo conoce como la hipótesis del origen del desarrollo de la salud y la enfermedad (Gluckman *et al.*, 2009; McAllister *et al.*, 2009).

Para lograr intervalos reproductivos óptimos, los bovinos deben tener un normal desarrollo intrauterino, ya que en rumiantes (al igual que en seres humanos y otras especies) la reserva folicular ovárica se establece durante la vida fetal cuando los folículos primordiales se forman y desarrollan la capacidad para iniciar el crecimiento (Fortune *et al.*, 2013; Monniaux *et al.*, 2014) (Figura 3).

En el ganado vacuno, la diferenciación de los folículos primordiales ocurre entre 90 y 140 días de vida fetal (Russe, 1983; Yang y Fortune, 2008; Burkhart *et al.*, 2010). Se ha establecido que la población de ovogonias en el ovario bovino en desarrollo alcanza un número máximo estimado de 2,1 millones (Smitz y Cortvrindt, 2002), que disminuye rápidamente en la última mitad de la vida fetal mediante apoptosis, hasta que, en el nacimiento, la población de folículos se reduce a aproximadamente 130.000 con una gran variación entre individuos (Erickson, 1966b; Aerts y Bols, 2010; Evans *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Secuencia temporal de eventos reproductivos en la vida de diferentes mamíferos. Se muestran las distintas etapas del desarrollo reproductivo para cada uno: inicio de meiosis y formación de la reserva de folículos primordiales (celestes), foliculogénesis previa a la pubertad (verde) y foliculogénesis seguida de ovulación posterior a la pubertad (naranja). Adaptada de Monniaux et al.(2014).

El *pool* de folículos primordiales se denomina "reserva folicular ovárica", aunque el término también se utiliza para referirse a todos los folículos ováricos sanos. Se ha sugerido que el tamaño de la reserva folicular ovárica puede determinar la duración de la vida reproductiva de la hembra. En este sentido, es sabido que la reserva folicular es considerada de suma importancia en la mujer ya que puede determinar el inicio de la menopausia (Hansen *et al.*, 2011). Sin embargo, la senescencia reproductiva carece de relevancia en un sentido práctico para el ganado ya que los animales suelen ser enviados a faena por indicación de rechazo antes de que esto ocurra. No obstante, existen evidencias que demuestran que el número de folículos en la reserva ovárica se correlaciona con la fertilidad individual de las hembras bovinas. Las principales funciones de los folículos ováricos incluyen: proteger y nutrir un ovocito en desarrollo que es capaz de ser fertilizado después de la ovulación, secretar hormonas esteroides que regulan la morfología y función de los órganos reproductivos, así como la conducta reproductiva durante el estro y, por último, proporcionar las células precursoras que luteinizarán y formarán el cuerpo lúteo después de la ovulación. Diversos estudios han arribado a conclusiones interesantes acerca de la variabilidad en la reserva folicular entre animales y la

correlación entre el número de folículos y la fertilidad en bovinos (Evans *et al.*, 2010; 2012; Ireland *et al.*, 2008, 2011; Fortune *et al.*, 2013). Dichos trabajos revelaron diferencias consistentes entre hembras bovinas jóvenes de la misma edad en el número de folículos antrales  $\geq 3$  mm de diámetro (Recuento de Folículos Antrales: RFA) en las ondas foliculares y correlacionaron dichas diferencias con otras variables relacionadas con la fertilidad, tales como presencia de folículos en otras fases de desarrollo folicular, bajos niveles circulantes de hormona anti-Mülleriana (AMH), menores concentraciones de progesterona circulantes durante la fase lútea y una pared endometrial más delgada en los animales con menor cantidad de folículos antrales. Otros estudios indicaron que las hembras con bajos RFA responden menos a los protocolos de superovulación y tienen mayores concentraciones en sangre de FSH y LH y ovocitos con los niveles de estado estacionario de ARNm mayores (marcadores de la baja calidad de los ovocitos), en comparación con el ganado con alto recuento (Ireland *et al.*, 2007, 2008). Recientemente, se han aportado pruebas que indican que los bajos RFA se asocian con alteraciones en la fertilidad, especialmente con bajas tasas de concepción al primer servicio y con un mayor intervalo parto-concepción (Mossa *et al.*, 2012). Ha sido probado que la restricción de la nutrición o presencia de enfermedades en la madre durante la gestación, en el momento de desarrollo de los ovarios en sus fetos, repercute negativamente en la proliferación de las células germinales primordiales y, por lo tanto, en el número de folículos después del nacimiento (Evans *et al.*, 2012). Estudios en los cuales se realizó la restricción nutricional de las madres por debajo de sus requerimientos de energía de mantenimiento desde poco antes de la concepción hasta el final del primer trimestre de preñez concluyó que, si bien no hubo cambios en el peso al nacer de las crías, la cantidad de folículos antrales y la concentración de AMH fueron proporcionalmente menores que en los animales nacidos de madres sin estas restricciones (Mossa *et al.*, 2013). El primer trimestre de la gestación coincide con el pico en el número de folículos y ovocitos en los ovarios fetales (Erickson, 1966ab). Dado que la cantidad de folículos antrales y la concentración AMH se correlacionan positivamente con el tamaño de la reserva ovárica, estos resultados indican que la nutrición materna durante la preñez puede tener un papel previamente no reconocido, pero importante en la regulación del tamaño de la reserva ovárica y tal vez la fertilidad del ganado (La Marca y Volpe, 2006; Ireland *et al.*, 2008, 2009).

Así como el RFA y la hormona anti Mulleriana se asocian positivamente con la fertilidad, es sabido que la progesterona y el estradiol son indispensable dentro del ciclo estral normal de la vaca. Ambas regulan la síntesis y liberación de gonadotrofinas a través de los efectos de retroalimentación negativa y positiva sobre el sistema nervioso central y la glándula pituitaria

anterior (Looper *et al.*, 2003). Durante la mayor parte del ciclo estral, el estradiol y la P4 restringen la secreción de GnRH a través de una retroalimentación negativa. Sin embargo, durante el proestro, estas dos hormonas esteroideas ejercen una retroalimentación positiva sobre las neuronas de GnRH y los gonadotropos de la pituitaria. La teca interna, luego de su estimulación por la LH, sintetiza andrógenos, los cuales subsecuentemente se difunden a través de la membrana y por acción de la aromatasa, una enzima regulada por la FSH, son convertidos a 17 $\beta$ -estradiol en las células de la granulosa (Smith, 1986). En este sentido, cualquier tipo de alteración en los niveles de dichas hormonas esteroideas repercutirá en el normal desarrollo del ciclo estral y por ende en la eficiencia reproductiva del rodeo lechero.

## **1.2. Efectos de los Factores Ambientales sobre la Performance Reproductiva y Productiva Bovina.**

El ganado bovino experimenta, a lo largo de su ciclo productivo, numerosas situaciones de estrés, cuyo origen puede ser ambiental o de manejo. Dichas situaciones podrían afectar la productividad general y el bienestar, debido a la alteración neuroendocrina y a la inmunosupresión. El estrés fisiológico puede ser resultado de las desviaciones en la función endocrina o neuroendocrina normal, causada por diversas condiciones, tales como la restricción o deficiencias de nutrientes, trastornos glandulares y otros perturbadores endocrinos. El estrés físico representa aquel asociado con lesiones, temperaturas extremas (altas o bajas), hambre y sed, fatiga y enfermedad (Grandin, 1997; Carroll y Forsberg, 2007). Ha sido previamente establecido que existen importantes consecuencias fisiológicas asociadas con el estrés agudo por calor que incluyen aumento de la frecuencia respiratoria, disminución de la ingesta de alimentos, aumento del consumo de agua y desequilibrios en los gases sanguíneos y electrolitos plasmáticos (Carroll y Forsberg, 2007).

Los bovinos, como todo mamífero, tienen la capacidad de termoregularse, lo cual les permite mantener una temperatura corporal constante. En el caso específico de la vaca lechera, dicha temperatura es alrededor de 38,8 °C (West, 2003). Este autor reporta que la zona de confort para la vaca lechera está entre 5 y 20 °C, el animal en esta zona puede regular su temperatura sin necesidad de invertir energía adicional. En este sentido, es frecuente que el ganado de la cuenca lechera central Argentina, se exponga a Índices de Temperatura-Humedad (ITH) por fuera de los niveles de *confort* del ganado bovino durante un número considerable de días entre los meses de noviembre a marzo (Gallardo y Valtorta, 2011). Estos altos índices afectarían en mayor medida a aquellos establecimientos de producción lechera con inconvenientes en brindar condiciones de bienestar animal y utilización de animales no aptos o adaptados para dichos

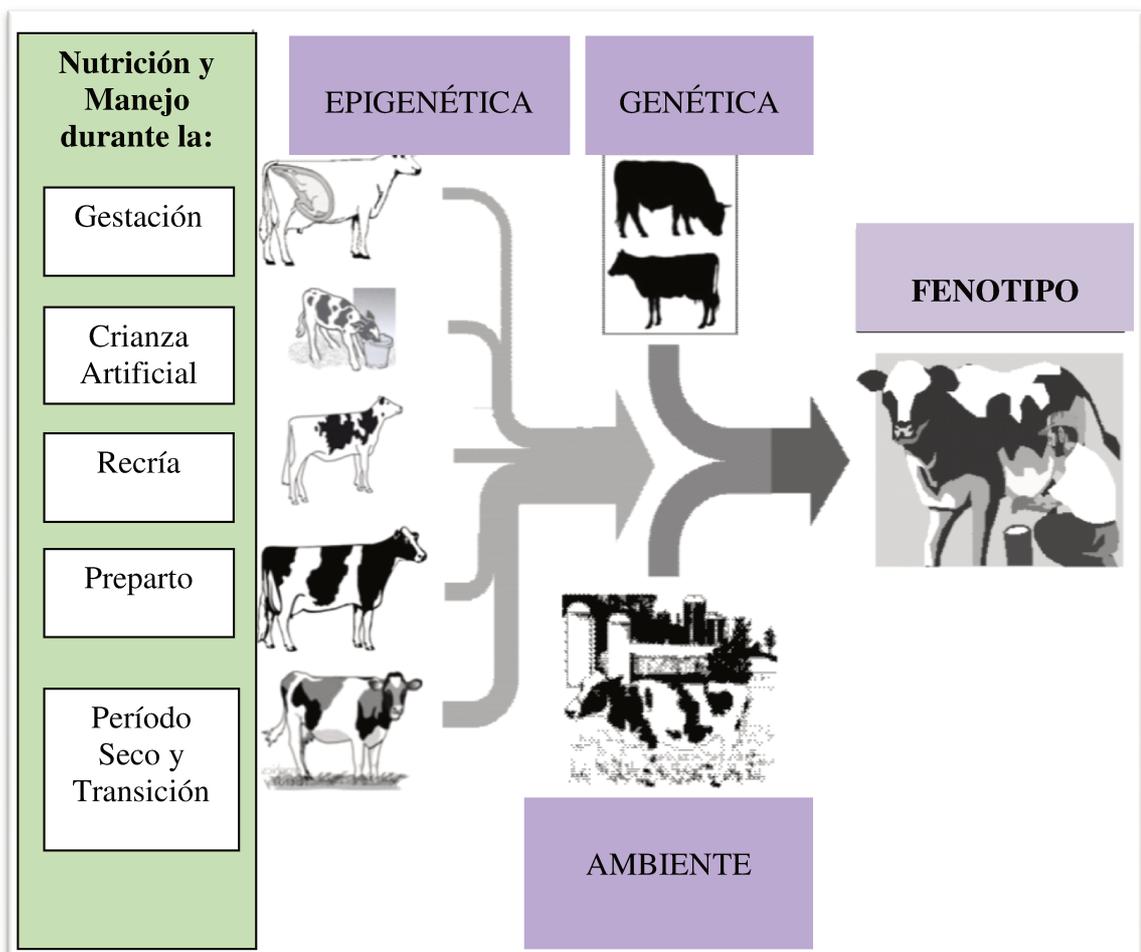
sistemas. Asimismo, es importante remarcar el dramático cambio climático que viene manifestándose en los últimos 66 años a nivel global, manifestándose en una tendencia por días y noches más cálidas, así como aumento de las precipitaciones en algunas regiones o, por el contrario, menores precipitaciones. Esto genera riesgo para la producción eficiente tanto agrícola como animal (Heim, 2015).

Las circunstancias estresantes detalladas con anterioridad tienen un efecto directo en los animales. Sin embargo, existen evidencias que indican que los estresores, durante la programación fetal, podrían tener un impacto negativo en la performance productiva y reproductiva que atentaría contra la eficiencia del sistema de producción de leche (Barker *et al.*, 2002). En este sentido, las condiciones ambientales sufridas por las madres durante la gestación, modifican la programación fetal por medio de cambios fisiológicos y epigenéticos (Viltart y Vanbesien-Mailliot, 2007). Coloma *et al.*, (2017) concluyeron que el estrés por calor durante el periodo de servicio hasta los primeros 45 días de gestación, reduce la duración de la gestación con efectos probables en el peso de los cabritos. Asimismo, estos autores detectaron en los test de comportamiento, que la reactividad emocional de la descendencia se observó alterada por el estrés por calor sufrido en el útero. Por otro lado, comprobaron que la exposición del feto a dicho estrés puede modificar su capacidad de repuesta a otros tipos de estrés en la vida postnatal afectando su adaptación.

La capacidad del medio ambiente para modificar la función hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) en estadios de desarrollo temprano y que perdure en la edad adulta fue descrita hace más de 50 años (Levine, 1957). Tales estudios observacionales han revelado que los niveles de cortisol en plasma en la edad adulta se correlacionan con el peso al nacer y con el riesgo de padecer intolerancia a la glucosa, hipertensión y dislipidemia (síndrome metabólico) en seres humanos (Levitt *et al.*, 2000; Barker, 2002; Ward *et al.*, 2004b). Como resultado de estas asociaciones, se ha propuesto que la programación en el útero del eje HPA está relacionado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina y diabetes en la vida adulta (Ward *et al.*, 2004a; Phillips *et al.*, 2005). Una cantidad considerable de manipulaciones en el desarrollo temprano han demostrado la modificación permanente en la diferenciación y funcionamiento posterior de la función HPA en los hijos recién nacidos, jóvenes y adultos de diversas especies, incluyendo primates, cobayos, ovejas, vacas, cabras, cerdos, ratas y ratones (revisado por Kapoor *et al.*, 2006). En este sentido, la evidencia epidemiológica más reciente indica que el ambiente fetal y posnatal temprano pueden influir en la susceptibilidad a diferentes alteraciones orgánicas en su vida adulta, lo que ha dado un nuevo impulso a este campo (Barker, 2002).

La capacidad de programar la función HPA y el comportamiento en los hijos se conceptualiza mejor en las poblaciones animales. Un animal gestante expuesto a un ambiente hostil requiere una mayor vigilancia para la supervivencia. Por tanto, es lógico que una señal de "estrés" transmitida al feto, por programación del eje HPA fetal y el comportamiento relacionado, conduzca a una mayor capacidad para sobrevivir luego del nacimiento. Este mecanismo ha permitido a diferentes especies, incluyendo el ser humano, adaptar la progenie al ambiente en que se desarrollará luego del nacimiento. Sin embargo, si este proceso se desencadena debido a una preñez comprometida o modificada, por ejemplo, insuficiencia placentaria, el estrés de la madre, restricción de nutrientes o el tratamiento con glucocorticoides, esté o no relacionado con el entorno en el que va a nacer el animal, el resultado será la modificación del sistema endocrino, alteraciones conductuales, cardiovasculares y en la regulación metabólica de la cría (Kapoor *et al.*, 2006). En este sentido, en los vacunos, el ambiente intrauterino durante la gestación tiene influencia sobre el potencial de engorde, la calidad de la carne, la eficiencia reproductiva de las terneras hijas y sobre la sanidad de la progenie (incremento en la mortalidad neonatal y disfunciones respiratorias e intestinales). La placenta materna reviste un rol importante en la regulación del crecimiento fetal. El desarrollo de la vascularización de dicho órgano es crucial para el pasaje de nutrientes hacia el feto (Prieto, 2015). En este sentido, el desarrollo de los ovarios ocurre aproximadamente a los 80 días de gestación, cuando los ovocitos empiezan a formar los folículos primarios (Nilsson y Skinner, 2009). Estos folículos representarán la reserva folicular ovárica disponible, pudiendo influir en la duración de la vida reproductiva después de la pubertad.

Es sabido que el fenotipo de un animal está determinado por el genotipo, el ambiente y sus interrelaciones. En el caso de bovinos de producción de leche, la epigenética implica que el ambiente no se refiere sólo a las condiciones actuales de manejo, sino que incluye aquellas en las que se desarrolló el individuo, lo que en la vaca lechera abarca no solo lactancias anteriores sino mientras fue gestada (Rich, 2016) (Figura 4).



**Figura 4.** Efectos epigenéticos sobre el comportamiento productivo de la vaca lechera.

*Adaptado de Rich (2016).*

El estrés prenatal, durante la gestación, modifica la función HPA en la descendencia de muchas especies, incluyendo primates, vacas, cabras y cerdos. Un estudio ha determinado que los monos jóvenes nacidos de madres expuestas a 6 semanas de estrés prenatal (sobresalto acústico al día) en los primeros días de gestación (50-92) o en la gestación avanzada (día gestacional 105-147) presentaron un aumento en las concentraciones de cortisol basal (Coe *et al.*, 2003). En terneros cuyas madres fueron sometidas a estrés por transporte durante la preñez, el *clearance* de cortisol fue más lento que en los controles y el peso de la pituitaria aumentó significativamente (Lay *et al.*, 1997a, b). En cabras, el transporte repetido durante el último tercio de la gestación no tuvo efectos sobre las concentraciones de cortisol basales en la descendencia, pero influyó significativamente en el sistema simpático-adreno-medular (Roussel *et al.*, 2005). En cerdos, la estimulación de la liberación de cortisol materno mediante inyecciones de ACTH de manera semanal en cerdas gestantes durante 6 semanas dio lugar a

crías (60 días de edad) con una relación corteza/médula en la glándula adrenal superior a lo normal. Bajo condiciones de estrés, los cerdos del grupo de madres tratadas con ACTH también mostraron mayores niveles de cortisol en plasma (Hausmann *et al.*, 2000). Es por ello que sería válido suponer que el estrés prenatal en las especies de interés zootécnico tiene fuertes consecuencias en la eficiencia de la producción animal.

De acuerdo a lo expresado hasta aquí, existen factores estresantes durante el crecimiento de un individuo que influirían en su vida adulta, impactando en su performance productiva y reproductiva que atentarían contra la eficiencia del sistema de producción de leche (Barker, 2002). Uno de estos factores estresantes es el calor que padecen las vacas durante su gestación y su impacto en la cría a través de lo que se denomina programación fetal. Ahora bien, al momento de establecer cuáles son los ambientes que generan estrés por calor en los bovinos, es importante tener en cuenta que la temperatura ambiental ( $T^{\circ}$ ) no es la única variable que influye, sino que también deben considerarse la humedad relativa (HR), la radiación solar y la velocidad del viento. Al ser varios los factores que influyen sobre el *confort* térmico del animal, se han desarrollado diferentes índices en los cuales se contempla en forma conjunta el efecto de al menos dos de las variables mencionadas anteriormente (Hahn *et al.*, 2009). Uno de los más conocidos y utilizados, es el índice de temperatura y humedad, que emplea la  $T^{\circ}$  y la HR como parámetros para estimar el nivel de estrés calórico (Figura 5). El valor de ITH obtenido en la fórmula se considera como la intensidad de las condiciones de estrés por calor a la que se encuentra expuesto el animal (LCI, 1970).

$$ITH = (1,8 * T^{\circ} + 32) - (0,55 - 0,55 * HR / 100) * (1,8 * T^{\circ} - 26)$$

**Figura 5.** Fórmula de ITH.  $T^{\circ}$  es la temperatura del aire expresada en  $^{\circ}C$ . HR es la humedad relativa expresada en porcentaje. Adaptada de Thom (1959).

Con el propósito de realizar una correcta interpretación de la severidad de las condiciones de estrés por calor a las que se encuentra expuesto un animal, es importante contemplar no sólo la *intensidad* del mismo en un momento puntual, es decir, el valor de ITH, sino que también la *duración* (cantidad de horas/días/trimestres de gestación) y la *frecuencia* de exposición (Brown *et al.*, 2005; Hahn *et al.*, 1999). Dicho concepto de frecuencia de exposición es de gran importancia ya que, a mayor valor, existe un menor tiempo de recuperación a las condiciones de estrés sufridas por el animal. Estos eventos climáticos extremos magnifican los efectos

adversos del calor ya que incluyen elevada intensidad del ITH sumado a elevada cantidad de horas de exposición, lo cual reduce la cantidad de horas con la que los animales cuentan para disipar la carga calórica (St-Pierre *et al.*, 2003).

El índice de seguridad climática para el ganado categoriza la intensidad del ITH (Tabla 1), estableciendo que en bovinos para carne un ITH  $\geq 75$  se considera nivel de alerta,  $\geq 79$  de peligro y  $\geq 84$  de emergencia. Para los bovinos lecheros un ITH  $>72$  ya se considera nivel de alerta (aunque algunos autores lo consideran a partir de 68) (St-Pierre *et al.*, 2003; SENASA, 2019; Valtorta y Leva, 1998) (Tabla 1). En este sentido, como se ha comentado con anterioridad, el ganado de la cuenca lechera central Argentina durante el periodo estival, se encuentra sometido a condiciones ambientales con índices de temperatura y humedad por fuera de los niveles de *confort* (Gallardo y Valtorta, 2011).

**Tabla 1.** ITH donde se indica los diferentes umbrales de intensidad.

		Humedad Relativa (%)										
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Temperatura (°C)	38	77	79	82	84	86	89	91	93	96	98	100
	37	76	79	81	83	85	87	90	92	94	96	99
	36	75	78	80	82	84	86	88	90	93	95	97
	35	75	77	79	81	83	85	87	89	91	93	95
	34	74	76	78	80	82	84	85	87	89	91	93
	33	73	75	77	79	80	82	84	86	88	90	91
	32	72	74	76	77	79	81	83	84	86	88	90
	31	71	73	75	76	78	80	81	83	85	86	88
	30	71	72	74	75	77	78	80	81	83	84	86
	29	70	71	73	74	76	77	78	80	81	83	84
	28	69	70	72	73	74	76	77	78	80	81	82
	27	68	69	71	72	73	74	76	77	78	79	81
	26	67	69	70	71	72	73	74	75	77	78	79
25	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	
24	66	67	68	69	70	70	71	72	73	74	75	
23	65	66	67	67	68	69	70	71	72	73	73	

Con base en lo detallado hasta el momento, en la presente investigación se ha definido la siguiente hipótesis para ser abordada.

### **1.3. Hipótesis**

Se plantea como **hipótesis general** que las condiciones ambientales y de manejo desfavorables que sufren las vacas lecheras durante la gestación afectan la dinámica folicular ovárica de las hijas modificando los parámetros reproductivos generales e influyendo en la fertilidad de las hembras.

## **2. OBJETIVOS**

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

Evaluar los parámetros reproductivos y de fertilidad en hembras bovinas que fueron gestadas bajo distintas situaciones ambientales y de manejo.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Determinar variaciones en los indicadores de eficiencia reproductiva en hembras bovinas adultas nacidas de madres que cursaron la gestación bajo diferentes condiciones ambientales.
- Evaluar la dinámica folicular luego de la sincronización de celos en hembras gestadas bajo diferentes condiciones ambientales.
- Evaluar los niveles de Hormonas Esteroides (Progesterona y Estradiol), Insulina y Hormona Anti-Mülleriana (AMH) en plasma y líquido folicular (LF) en hembras gestadas bajo diferentes condiciones ambientales.
- Determinar potenciales variaciones en la fertilidad de la progenie hembra con un posible origen en la programación fetal alterada debido a condiciones ambientales adversas durante el desarrollo.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos efectuados en la presente investigación, se llevaron a cabo de acuerdo a la normativa vigente en el tema (*Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*. Tercera Edición. Federation of Animal Science Societies. 2010) y han sido evaluados y aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral bajo el número 157/13.

Con el fin de abordar los objetivos planteados, en una primera etapa se realizó un análisis epidemiológico de tipo observacional de cohortes retrospectivo y en una segunda instancia un estudio sobre muestras de hembras bovinas de raza Holando Argentino expuestas a diferentes condiciones del Índice de Temperatura y Humedad (ITH) con el fin de evaluar el estrés calórico.

#### 3.1. Análisis Retrospectivo

##### 3.1.1. Base de Datos

Para el estudio de cohortes retrospectivo se empleó una base de datos generada a partir de un *software* de gestión de información productiva y reproductiva de bovinos lechero (SW Agropecuaria® - San Carlos, Santa Fe, Argentina). Dicha base de datos contempló información de 43 tambos ubicados en la región central de las provincias de Santa Fe y Córdoba, asiento de la principal cuenca lechera de Argentina. En su mayoría, las vacas de los establecimientos analizados fueron manejadas en un sistema de parto continuo, con una dieta basada en pasturas de alfalfa, verdeos invernales de avena o centeno complementada en diferentes proporciones (45-60%) con ensilaje de maíz, ensilaje de alfalfa, grano de maíz, expeller de soja, balanceado comercial y heno, de acuerdo a la estación del año y el nivel de producción. Todas las vacas tuvieron un período seco de al menos 60 días antes del parto.

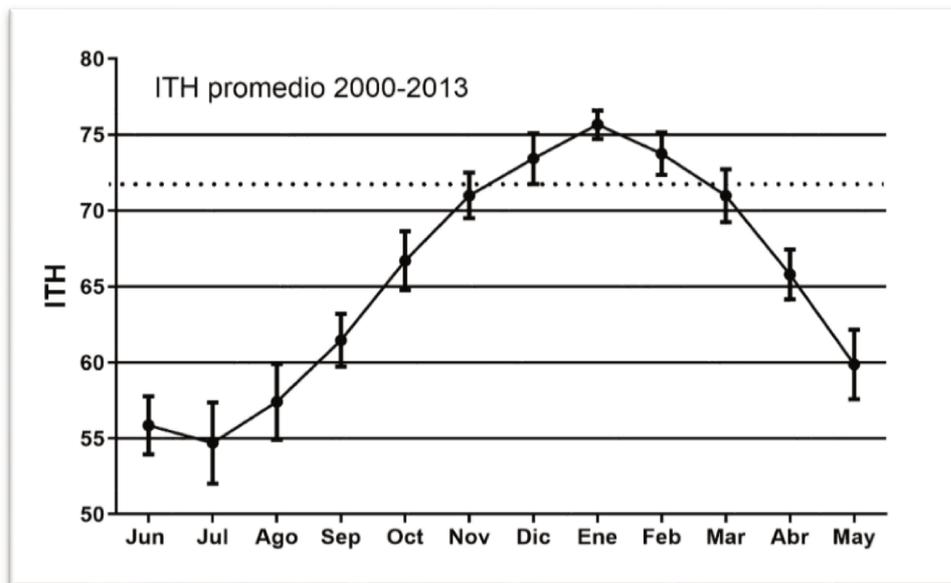
El período de evaluación se extendió por 13 años (2000-2013). El número de vacas en cada establecimiento de producción lechera fluctuó de 10 a 1.294. La base de datos contenía información de 23.751 vacas e incluía 30 variables que comprendían aspectos reproductivos y productivos de las hembras seleccionadas para la presente investigación.

Los criterios de inclusión de los animales fueron: **a)** tener la fecha de nacimiento efectiva de la vaca bajo estudio o en su defecto, la fecha de servicio real de la madre (de la vaca bajo estudio),

y **b)** tener datos de los principales eventos reproductivos durante la primera lactancia de la vaca a investigar (intervalo entre el parto y la concepción y el intervalo entre el parto y el primer servicio). Luego de aplicar dicho criterio de inclusión quedaron un total de 10.790 vacas para ser evaluadas. También se registraron datos productivos relacionados con la primera lactancia de los animales incluidos en el estudio. Además de las 30 variables, se incluyeron factores que podrían actuar como factores de confusión, como la producción de leche, el tipo de parto, el sexo de la descendencia y otros no asociados a dichos aspectos productivos y reproductivos, es decir, los relacionados con el valor de ITH, para controlar las variables que podrían tener efectos sobre las variables dependientes. Todas estas variables se incluyeron en los análisis como potenciales factores de confusión de gran impacto que podrían afectar las variables de salidas que fueron analizadas como será detallado a continuación en el análisis estadístico. Es oportuno remarcar que, a pesar que dicha base de datos es de manejo reproductivo en tambos comerciales y no una base creada para esta investigación, la misma contaba con gran cantidad de variables y de un número de animales que permitieron realizar los análisis estadísticos.

### **3.1.2. Índice de Temperatura y Humedad (ITH) y Grupos de Animales**

El promedio histórico diario de ITH se obtuvo de datos registrados en la Estación Agrometeorológica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) EEA Rafaela, Santa Fe, Argentina. Se estableció como línea de corte un ITH 72 debido a que es el valor definido como causante de *discomfort* térmico en bovinos (Gallardo y Valtorta, 2011). En la Figura 6 se muestra el promedio de ITH mensual durante los años incluidos en el estudio.



**Figura 6.** Promedio mensual de ITH obtenido de los registros agrometeorológicos de INTA, EEA Rafaela durante el período 2000-2013.

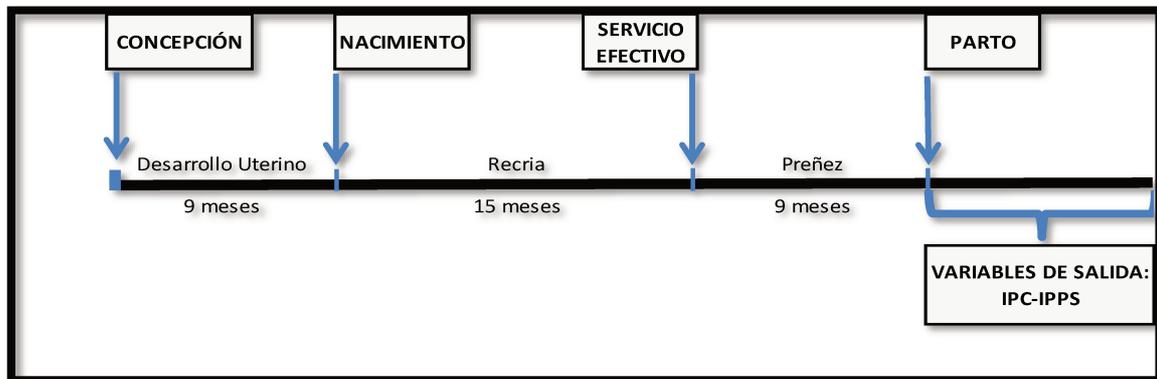
En una primera instancia se les asignó a las hembras que quedaron bajo análisis ( $n= 10.790$ ) el ITH de acuerdo a la fecha que fueron gestadas. Tal asignación consistió en dividir en trimestres su período gestacional contemplado a partir de la fecha de nacimiento o en su defecto, la fecha de servicio efectivo de la madre de la hembra bajo estudio. En cada trimestre se calcularon los ciclos y días con ITH mayor o igual a 72 ( $ITH \geq 72$ ) durante la gestación. Los ciclos con  $ITH \geq 72$  fueron definidos como la suma de tres o más días consecutivos de exposición a un  $ITH \geq 72$  durante cada trimestre. Adicionalmente se calculó, para cada individuo, los promedios de ITH, promedios de  $ITH \geq 72$  y el porcentaje de días con  $ITH \geq 72$  durante su gestación. Las variables utilizadas y su significado se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Variables utilizadas y su significado en el análisis estadístico a partir de la base de datos de 10.790 animales.

<b>Datos de la vaca bajo estudio (Cría)</b>	
<b>Variable</b>	<b>Descripción</b>
Edad al Primer Servicio (meses)	Edad en meses al primer servicio de la hembra bajo estudio.
Edad al Primer Servicio Agrupado (en Meses)	Edad categorizada (en meses) al primer servicio de la hembra bajo estudio.
Edad al Primer Parto (meses)	Edad al primer parto expresado en meses.
Mes Primer Servicio Posparto de la Cría Agrupado	Mes en que la hembra bajo estudio recibió <i>su primer servicio</i> luego de su primer parto agrupado en trimestres (Enero-Febrero-Marzo/Abril-Mayo-Junio/Julio-Agosto-Septiembre/Octubre-Noviembre-Diciembre).
Mes de Servicio efectivo de la Cría Agrupado	Mes de servicio en el cual la hembra bajo estudio <i>quedó preñada</i> luego de su primer parto agrupado por trimestres (Enero-Febrero-Marzo/Abril-Mayo-Junio/Julio-Agosto-Septiembre/Octubre-Noviembre-Diciembre).
Tipo de Parto Agrupado	Tipo de Parto agrupado en Normal o Distócico.
Sexo de la Cría	Sexo de la Cría agrupado en Macho y Hembra.
Estado de la Cría	Estado de la Cría agrupado en Vivo o Muerto.
Lactancia Total (a la primera lactancia en miles de litro)	Total de Leche producida a la primera lactancia en miles de litros.
<b>VARIABLES DE LA MADRE DE LA HEMBRA BAJO ESTUDIO</b>	
<b>Variable</b>	<b>Descripción</b>
Mes de Servicio Efectivo Agrupado	Mes de servicio efectivo de la madre de la hembra bajo estudio categorizado en trimestres (Enero-Febrero-Marzo/Abril-Mayo-Junio/Julio-Agosto-Septiembre/Octubre-Noviembre-Diciembre).
Mes de Servicio Efectivo	Mes de servicio efectivo de la madre de la hembra bajo estudio.
Nº de Parto Agrupado	Número de parto agrupado en tres categorías.

Nº de Parto Agrupado (Primípara. Multípara)	Número de parto agrupado en multíparas y primíparas.
<b>Variables del Índice de Temperatura y Humedad</b>	
<b>Variable</b>	<b>Descripción</b>
Días con ITH alto	Días con Índice de Temperatura y Humedad mayor o igual a 72 ( $ITH \geq 72$ )
Ciclos con ITH alto	Tres o más días consecutivos con $ITH \geq 72$
Días con ITH alto en el primer, segundo o tercer tercio de la gestación	Días con $THI \geq 72$ calculado durante toda la gestación y por cada trimestre en el desarrollo de la hembra bajo estudio.
Ciclos con ITH alto en el primer, segundo o tercer tercio de la gestación	Ciclos considerando tres o más días consecutivos con $THI \geq 72$ , calculados durante toda la gestación y por cada trimestre en el desarrollo de la hembra bajo estudio.
Mediana de Ciclos o de Días con ITH alto en primer, segundo trimestre y total de la gestación	Mediana de ciclos o de días con $ITH \geq 72$ durante la totalidad y los respectivos períodos de la gestación
Percentil de Ciclos o de Días con ITH alto en primer, segundo trimestre y total de la gestación	Percentil de ciclos o de días con $ITH \geq 72$ durante la totalidad y los respectivos períodos de la gestación.
% Días con ITH alto 72 (durante la gestación)	Porcentaje de días con $ITH \geq 72$ durante toda la gestación
Mediana del % de Días con ITH alto (durante la gestación)	Mediana del Porcentaje de días con un $ITH \geq 72$ durante toda la gestación.
Percentil del % de Días con ITH Alto (durante la gestación)	Percentil del Porcentaje de días con un $ITH \geq 72$ durante toda la gestación.
Mediana y Percentil del Promedio de ITH (durante la gestación)	Mediana y Percentil de la media del promedio general de ITH durante toda la preñez.
<b>Variable Aleatoria</b>	
Establecimiento productor de leche (Tambo)	
<b>Variables Respuesta</b>	
<b>Variable</b>	<b>Descripción</b>
IPC	Intervalo-parto-concepción correspondiente al primer parto de la vaca bajo estudio.
IPPS	Intervalo-parto-primer servicio correspondiente al primer parto de la vaca bajo estudio.

En la Figura 7 se muestra la línea de tiempo del periodo de evaluación de las vacas en estudio desde la concepción hasta el momento del primer servicio luego del primer parto.



**Figura 7.** Línea de tiempo del periodo de evaluación de las vacas en estudio desde la concepción hasta el momento del primer servicio luego del primer parto.

### 3.1.3. Análisis Estadístico

El análisis estadístico consideró variables independientes relacionadas con: **a)** las madres de las vacas en estudio, **b)** las vacas en estudio y **c)** las variables relacionadas con las condiciones ambientales (ITH). Las variables de respuesta (variables de salida) seleccionadas fueron: intervalo de parto a concepción (IPC) e intervalo de parto a primer servicio (IPPS), ambas correspondientes al primer parto de las vacas incluidas en el estudio.

Se utilizaron modelos lineales generalizados mixtos (MMLG) y, según la distribución de la variable de respuesta, se utilizó la función *gamma*. Con el propósito de contemplar otros factores que podrían haber afectado dentro del modelo, por ejemplo, el grado de utilización de sombra, alimentación, recursos humanos y su capacitación, el establecimiento de producción lechera se consideró como factor aleatorio.

Inicialmente, cada variable independiente se comparó con la variable de respuesta en un análisis univariado. Las variables que fueron significativas en el modelo univariado ( $P < 0,15$ ) se incluyeron en un modelo multivariable, que se ajustó eliminando las variables no significativas (cuando éstas no generaron cambios en los estimadores superiores al 25%). Este procedimiento se ejecutó siguiendo un proceso hacia atrás. Cuando dos o más variables se relacionaron entre sí o explicaron un mismo factor, solo una de ellas se incorporó al modelo. Los modelos se

compararon teniendo en cuenta su criterio de información de Akaike (AIC) y el valor  $P$  de cada variable incluida en el modelo (Dohoo *et al.*, 2009; Dohoo *et al.*, 1997). Una vez obtenido el modelo multivariado final para cada variable de salida (IPC; IPPS), se realizó un análisis univariado entre las variables independientes que quedaron incluidas en el modelo multivariado y aquellas variables independientes que, a pesar de haber sido significativas en el análisis univariado, no fueron incluidas en el modelo multivariado. Este análisis se realizó con el objetivo de comprender la relación entre dichas variables y que pudieran explicar las razones por las cuales esas variables no fueron incluidas en el modelo multivariado obteniéndose resultados complementarios a los respectivos modelos finales. Todos los análisis estadísticos se realizaron a través del programa InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

### **3.2. Evaluación de Parámetros Hormonales y Reproductivos en Vacas Holando Argentino expuestas a Diferentes ITH Durante su Desarrollo.**

#### **3.2.1. Animales**

Se utilizaron vacas adultas multíparas de raza Holando Argentino de siete tambos comerciales de los departamentos Las Colonias y Castellanos de la provincia de Santa Fe y de la localidad de Las Varas, departamento San Justo al centro-este de la provincia de Córdoba, es decir, localizados en la principal cuenca lechera de Argentina ( $n=102$ ). El rango de bovinos evaluados por establecimiento comprendió entre 2 a 41. El criterio de inclusión de las vacas para su posterior análisis consistió en que dispusieran de fecha de nacimiento real o, en su defecto, la fecha efectiva de servicio de la madre de la hembra bajo estudio.

Las vacas se encontraban bajo un sistema pastoril con suplementación estratégica, con una dieta caracterizada en su mayoría por pasturas de alfalfa, avena o centeno suplementada en diferentes proporciones con ensilaje de maíz o alfalfa y grano de maíz, expeler de soja y heno (rollos o megafardos); según la temporada del año y el nivel de producción. Los sistemas a los que pertenecían eran de partos continuos y todas las vacas tuvieron un período seco de al menos 60 días antes del parto.

#### **3.2.2. ITH y Grupos de Animales**

A partir del ITH obtenido de los datos de registros de la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela (INTA), se diseñaron 23 variables de exposición relacionadas a dicho período y al

agrupamiento de los animales. Las vacas incluidas en el estudio fueron clasificadas de acuerdo con el ITH durante la gestación. Para ello la gestación se dividió en trimestres y en cada trimestre se calcularon los ciclos y cantidad de días con ITH igual o superior a 72 como se detalló previamente. Adicionalmente, se calculó para cada vaca los promedios ITH, el porcentaje de días con  $ITH \geq 72$  y el índice de exposición (relación entre el número de días con  $ITH \geq 72$  comprendido en cada ciclo sobre la totalidad de ciclos para cada período de la gestación). Con el fin de evaluar el impacto de los índices de temperatura y humedad se calcularon, para cada vaca en estudio, las variables promedio ITH, porcentaje de días con  $ITH \geq 72$ , ciclos e índice de exposición (sumatoria de días con  $ITH \geq 72$  dentro de ciclos del período o trimestre sobre el total de ciclos de ese período o trimestre de gestación) durante los primeros 150 días de gestación y desde el día 151 al parto.

Teniendo en cuenta el momento en el cual se establece la reserva folicular ovárica en bovinos se dividió la gestación en dos periodos: **periodo 1** (P1, desde la concepción hasta los 150 días de gestación) y **periodo 2** (P2, desde los 151 días hasta el nacimiento). Además, se realizaron análisis considerando tres trimestres: **trimestre 1** (T1, 0-90 días), **trimestre 2** (T2, 91-180 días) y **trimestre 3** (T3, 181-nacimiento).

### 3.2.3. Parámetros Evaluados

Para la presente investigación se establecieron ocho variables de respuestas en relación a las condiciones del ITH en los diferentes periodos del desarrollo de las vacas del estudio: Recuento de Folículos Antrales (RFA), concentración de  $17 \beta$ -Estradiol (E2), progesterona (P4), e insulina en plasma y concentración de E2, P4, insulina y AMH en Líquido Folicular.

#### 3.2.3.1. Sincronización del estro, seguimiento de los animales y obtención de muestras

El grupo de animales destinado al recuento folicular y toma de muestras fue sometido al control reproductivo mediante palpación rectal para evaluar la reanudación de la actividad ovárica posparto y constatar la salud de los animales. A partir de la primera ovulación posparto se comenzó la sincronización de celos mediante el protocolo G-6-G seguido por Ovsynch (Bello *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2015). Para esto se determinó el día 0 del protocolo como el momento del inicio de la sincronización donde se aplicó doble dosis de  $PGF_{2\alpha}$  (150  $\mu$ g cloprostenol; EnzaprostR DC, Biogénesis-Bagó, Garín, Buenos Aires, Argentina) separadas por 12 horas para inducir la luteólisis (am-pm) (Hatler *et al.*, 2008), seguido de una dosis de GnRH (20  $\mu$ g acetato de buserelina; GonaxalR, Biogénesis-Bagó, Argentina) dos días después para estimular

la ovulación de los folículos dominantes presentes. Seis días posteriores a la primera dosis de GnRH (día 8), las vacas recibieron una segunda dosis de GnRH. Siete días más tarde (día 15), recibieron las dos últimas dosis de PGF<sub>2α</sub>, separadas por 12 horas, para inducir la luteólisis. Se tomaron muestras de sangre en la fase de proestro (del día 18 del protocolo de sincronización al día anterior a la ovulación prevista del ciclo estral). Las muestras de sangre se obtuvieron mediante agujas 25/12 (25 mm largo x 1,2 mm diámetro) acopladas a jeringas plásticas de 20 ml. La técnica de extracción utilizada fue la de punción a través de vasos coccígeos en la zona ventral de las primeras vértebras coccígeas.

La obtención de líquido folicular se realizó mediante ovariectomía o a través de aspiración guiada por ecografía.

Mediante ovariectomía se obtuvieron ambos ovarios los que fueron destinados a otras determinaciones complementarias fuera de esta tesis. Para esto se utilizó la técnica de ovariectomía bilateral por flanco izquierdo con el animal en pie. Inmediatamente después de la sujeción del animal se le aplicó una dosis intramuscular de 6-8 mg de clorhidrato de xilazina (xilazina 2 % Over®). A continuación, se llevó a cabo la tricotomía de la zona a intervenir para posteriormente realizar una anestesia local infiltrativa por medio de la técnica Magda modificada, “L” invertida o infiltrativa del flanco y epidural baja en el espacio sacrococcígeo (Garnero y Perusia, 2002) utilizando 160 ml, 40-100 ml y 1 ml/100 kg de peso vivo respectivamente de clorhidrato de lidocaína (Lidocaína 2 %, Over®). Luego de la antisepsia de la zona se procedió con una incisión desde caudo-dorsal hacia cráneo-ventral de la piel en un primer paso y luego de los planos musculares de la pared abdominal izquierda, de una longitud suficiente para facilitar al cirujano el acceso a la cavidad abdominal. Se localizó el ovario derecho y se colocó una pinza hemostática Kocher modificada *ad hoc* (sin diente) y se realizó la ligadura del pedículo ovárico por transfixión con hilo de lino no absorbible simple. Luego, se seccionó con tijera y se extrajo el ovario derecho, procediéndose de la misma forma con el ovario izquierdo. Para finalizar se suturaron los planos musculares y la piel y se trataron los animales con antibióticos sistémicos, coagulantes, antiinflamatorios y antiparasitarios externos durante 3 días.

Para la aspiración folicular guiada por ecografía, se recurrió a un sistema de ultrasonido digital Chison 8300vet equipado con un transductor microconvexo de 5,0 MHz montado en una sonda transvaginal para aspiración folicular (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil). La misma posee una guía para la colocación de una aguja calibre 20 G con bisel ecogénico que se conecta por medio de una tubuladura de teflón a tubos contenedores cónicos estériles de 50 ml. Para la aspiración se empleó una bomba de vacío (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil) a una

presión de aspiración de 500 mm Hg. El dispositivo de aspiración fue introducido vía vaginal hasta contactar con el fondo de la misma y el ovario localizado por tacto rectal, fue acercado y fijado al transductor de la sonda. Luego se procedió a la introducción de la aguja a través de la pared vaginal y posteriormente a través de la pared folicular para la toma de muestra. Inmediatamente de recolectado el líquido folicular rico en células de la granulosa, se derivó a su conservación a temperatura de refrigeración (4-6°C) y traslado al laboratorio para su procesamiento que consistió en separar las células de la granulosa del resto del líquido mediante centrifugación. Las células se conservaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento para otras determinaciones fuera de esta tesis. El líquido folicular sobrenadante se almacenó a -80°C para las posteriores determinaciones hormonales.

### **3.2.3.2. Recuento de folículos antrales $\geq 3$ mm**

Para la realización del RFA, como indicador de fertilidad (Ireland *et al.*, 2011), se evaluó la dinámica folicular de hembras gestadas bajo diferentes ITH mediante la evaluación transrectal por ultrasonografía mediante el ecógrafo Mindray Z6 Vet con un transductor transrectal lineal, de los folículos mayores o iguales a 3 mm. Se realizó el recuento de los folículos antrales  $\geq 3$  mm a las 48-72 h luego de la aplicación de la primera dosis de GnRH, en coincidencia con el reclutamiento folicular y el pico de cantidad de folículos escaneando en todas sus caras ambos ovarios (Burns *et al.*, 2005).

### **3.2.3.3. Mediciones hormonales**

La concentración de E2 y P4 en líquido folicular (LF) y plasma fue cuantificada en un laboratorio externo mediante *kits* de inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA. Roche Diagnostics GmbH, Alemania) en un sistema COBAS e411 (Roche Diagnostics), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, que se validaron previamente en bovinos (Díaz *et al.*, 2015). La sensibilidad del ensayo fue de 5,00 pg/ml para el E2 y 0,05 ng/ml para la P4. (Tabla 3).

Se determinó la concentración de AMH en LF utilizando un *kit* comercial de ELISA (Beckman Coulter, Inc., USA, referencia A73818). Se siguieron las instrucciones del fabricante, realizando una curva estándar de 7 puntos, para lo cual se utilizaron los calibradores

correspondientes (Beckman Coulter, Inc., USA, referencia A73819). Se determinó la absorbancia (OD) de cada calibrador y de las muestras en un lector de microplacas (Clario Star, BMG LABTECH), a una longitud de onda de 450 nm con corrección a 600 nm. La concentración de cada muestra luego se calculó por extrapolación de la curva estándar.

La concentración de insulina en plasma fue analizada por radioinmunoanálisis (RIA), en un laboratorio externo perteneciente al Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME, CONICET, Buenos Aires). Se utilizó un anticuerpo anti-insulina bovina (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) y un estándar de insulina humana provisto por Laboratorios Beta (Buenos Aires, Argentina). La concentración detectable mínima fue de 0,05 ng/ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron siempre inferiores al 8% y al 11%, respectivamente. Por su parte, la insulina intrafolicular se determinó utilizando un *kit* comercial de ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (DIASource Immuno Assays S.A., Bélgica, referencia KAP1251). Se realizó la curva estándar con los calibradores según las instrucciones del fabricante y se determinó la absorbancia (OD: *Optical Density*) de cada calibrador y de las muestras en un lector de microplacas (Clario Star, BMG LABTECH), a una longitud de onda de 450 nm con corrección a 650 nm. La concentración de cada muestra luego se calculó por extrapolación de la curva estándar, utilizando para la misma un ajuste dado por la función logística de 4 parámetros.

**Tabla 3.** Variables utilizadas en el Estudio observacional sobre los animales

Variable	Descripción
RFA	Recuento de folículos antrales $\geq 3$ mm a las 48-72 h luego de la aplicación de la primera dosis de GnRH, en coincidencia con el reclutamiento folicular y el pico de cantidad de folículos escaneando en todas sus caras ambos ovarios.
E2	Concentración de 17 $\beta$ -estradiol en líquido folicular y plasma.
P4	Progesterona en líquido folicular y plasma.
In	Insulina en plasma y líquido folicular.
AMH	Hormona Anti-Mülleriana en líquido folicular.

### 3.2.4. Análisis Estadístico

Para evaluar el efecto del estrés térmico se contempló el ITH durante los diferentes trimestres y periodos de la gestación sobre una serie de indicadores relacionados con la fertilidad de los animales bajo estudio. En este sentido, las variables relacionadas con ITH fueron las de exposición y los parámetros evaluados fueron las de respuesta.

Para las inferencias estadísticas se emplearon modelos lineales generalizados mixtos y, de acuerdo a la distribución de las variables de respuesta, se utilizó la función de enlace correspondiente. En este sentido, para RFA se utilizó una distribución de Poisson; para la concentración de P4 en plasma y LF, insulina en LF y AMH se utilizó la distribución Gamma y para E2 en LF y plasma e insulina en plasma se empleó la distribución Normal. Por su parte, se consideró a la edad del animal como covariable dentro del modelo junto con las variables relacionadas al ITH. El establecimiento comercial (tambo) al cual pertenecían los animales fue considerado como factor aleatorio dentro del modelo. Fueron consideradas variables significativas con un  $P < 0,05$ . Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## **4. RESULTADOS**

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Evaluación de índices reproductivos. Análisis Retrospectivo.

#### 4.1.1. Intervalo Parto Concepción (IPC)

##### 4.1.1.1. Análisis Univariado

La asociación existente entre las variables de entrada del modelo y la variable de respuesta IPC se detalla en la Tabla 4. De las 31 variables evaluadas, 24 se asociaron con el IPC de la vaca en estudio ( $P < 0,150$ ) en el análisis univariado.

En esta primera instancia del análisis de los datos se destaca que dentro de las variables que quedaron incluidas en el modelo univariado, no solo se encontraron las pertenecientes al animal en esa primera lactancia, sino factores asociados a su desarrollo (*in útero*), es decir, todas las variables relacionadas al Índice de Temperatura y Humedad.

**Tabla 4.** Factores asociados a la modificación del Intervalo Parto Concepción (IPC).

Variable Entrada/Efecto Fijo	Categorías	Media	Error Estándar	Valor P
Mes de Servicio Efectivo Agrupado <sup>1</sup>	E.F.M	140,96	4,71	0,06
	A.M.J	144,03	4,37	
	J.A.S	148,75	4,51	
	O.N.D	148,65	4,60	
Mes de Servicio Efectivo	Enero	145,23	6,09	0,21
	Febrero	141,41	6,21	
	Marzo	136,21	5,88	
	Abril	144,91	5,91	
	Mayo	144,84	5,04	
	Junio	143,23	4,90	
	Julio	147,95	5,14	
	Agosto	151,79	5,42	
	Septiembre	146,85	5,38	
	Octubre	147,74	5,34	

	Noviembre	154,23	5,67	
	Diciembre	143,38	5,57	
Días con ITH alto <sup>2</sup> en Primer Trimestre				0,210
Ciclos con ITH alto en Primer Trimestre				<b>0,120</b>
Ciclos con ITH alto en Segundo Trimestre				<b>0,008</b>
Días con ITH alto en Segundo Trimestre				<b>0,004</b>
Ciclos con ITH alto en Tercer Trimestre				0,900
Días con ITH alto en Tercer Trimestre				0,813
Promedio ITH <sup>3</sup> (durante la gestación)				<b>0,012</b>
Promedio ITH alto (durante la gestación)				0,210
% Días con ITH alto 72 (durante la gestación)				<b>&lt;0,001</b>
Mediana de Ciclos con ITH alto en Primer Trimestre	<=2	144,86	4	0,367
	>2	146,53	4,1	
Percentil de Ciclos con ITH alto en Primer Trimestre	<=0	142,8	4,04	<b>0,069</b>
	1 - 4	147,39	4,21	
	>4	147,15	4,21	
Mediana de Ciclos con ITH alto en Segundo Trimestre	<=3	143,81	3,99	<b>0,050</b>
	>=4	147,42	4,1	
Percentil en Ciclos con ITH alto en Segundo Trimestre	<=2	142,73	4,2	<b>0,034</b>
	<=5	148,23	4,51	
	>5	148,88	4,51	
Mediana en Días con ITH alto en Segundo Trimestre	<=28	143,47	3,98	<b>0,018</b>
	>=29	147,83	4,11	
Percentil en Días con ITH alto en Segundo Trimestre.	<=14	144,05	3,55	<b>0,001</b>
	<=43	149,07	3,71	
	>43	151,71	3,75	
Mediana del Promedio de ITH (durante la gestación)	<=66,37	143,97	4	<b>0,085</b>
	>66,37	147,14	4,09	
Percentil del Promedio de ITH (durante la gestación)	<=65,2	143,36	4,11	0,185
	<=67,37	145,66	4,16	
	>67,37	147,48	4,21	
Mediana del % de Días con ITH alto (durante la gestación)	<=32,24	143,56	3,99	<b>0,28</b>
	>32,24	147,91	4,1	
Percentil del % de Días con ITH Alto (durante la gestación)	<=29,24	143,51	3,55	<b>&lt;0,001</b>
	<=34,85	149,13	3,69	
	>34,85	152,06	3,77	
Nº de Parto Agrupado <sup>5</sup>	1 Parto	141,97	4,09	<b>&lt;0,001</b>

	2 a 5 Partos	148,57	4,09	
	> a 6 Partos	136,21	4,70	
N° de Parto Agrupado (Primípara. Multípara) <sup>6</sup>	Primíparas	141,87	4,06	<b>0,008</b>
	Multíparas	147,13	4,00	
<b>Variables de las Vaca bajo estudio</b>				
Edad al Primer Servicio (meses)				<b>&lt;0,001</b>
Edad al Primer Servicio Agrupado <sup>4</sup> (en Meses)	<19 a Meses	142,30	3,95	<b>0,004</b>
	20-29 Meses	148,01	4,16	
	> a 30 Meses	156,55	6,23	
Edad al Primer Parto (meses)				<b>&lt;0,001</b>
Mes de Servicio Efectivo de la Vaca bajo Estudio (agrupado por trimestre)	Enero-Febrero-Marzo	157,69	4,77	<b>&lt;0,001</b>
	Abril-Mayo-Junio	157,94	4,45	
	Julio-Agosto-Septiembre	138,36	3,87	
	Octubre-Noviembre-Diciembre	134,34	4,81	
Tipo de Parto Agrupado	Normal	144,38	3,97	<b>0,003</b>
	Distócico	151,90	4,71	
Sexo de la Cría	Macho	152,67	4,16	<b>&lt;0,001</b>
	Hembra	150,60	4,18	
Estado de la Cría	Vivo	144,04	3,88	<b>&lt;0,001</b>
	Muerto	161,05	5,47	
Lactancia Total (a la primera lactancia en miles de litro)				<b>&lt;0,001</b>

<sup>1</sup> **Mes de servicio efectivo agrupado** (por trimestre) de la Vaca que dio origen a la Hembra a la que se le evaluarán las respectivas variables de ITH durante su gestación. <sup>2</sup> **ITH Alto** es cuando los valores del Índice de Temperatura y Humedad fue  $\geq 72$  imputado en los respectivos días y ciclos y períodos de gestación detallado en la tabla. <sup>3</sup> **Promedio de ITH** es la media del Índice de Temperatura y Humedad durante la totalidad de la gestación. <sup>4</sup> **Edad al Primer Servicio Agrupado** en meses. <sup>5</sup> **N° de Parto Agrupado** en tres categorías de acuerdo a si han tenido 1; 2-5 o más de 6 partos corresponden a la Vaca que dio origen a la Hembra en estudio. <sup>6</sup> **N° de Parto Agrupado (Primípara. Multípara)** corresponde a la vaca que dio origen a la hembra en estudio.

#### 4.1.1.2. Análisis Multivariado

Se observó que aquellas vacas que estuvieron expuestas a una mayor cantidad de **Ciclos con ITH alto** durante el Primer Trimestre ( $P= 0,023$ ) presentaron un mayor IPC, con un aumento de 1,002 días para cada ciclo de exposición (Tabla 5). Las vacas cuyas madres eran **multíparas** al momento del estudio presentaron un intervalo parto concepción más alto (156 días) en comparación con aquellas vacas cuyas madres eran **primíparas** (IPC: 149 días) ( $P< 0,001$ ) (Tabla 5). Asimismo, los animales que presentaron una mayor **edad al primer parto (meses)**, presentaron un mayor Intervalo Parto Concepción ( $P< 0,001$ ) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Modelo Multivariante (AIC: 17291;  $P<0,001$ ;  $n= 10.555$ ). Ajustado a partir de las variables que obtuvieron un  $P<0,150$  en el análisis univariado. Variable aleatoria: Tambo  $P=0,081$ . Variable de Respuesta: Intervalo Parto Concepción.

Variable Entrada/Efecto Fijo	Categorías	Promedio	Error estándar	Coefficiente Beta	Intervalo de Confianza 95%	Valor P
Ciclos con ITH alto en Primer Trimestre	-	2,89	0,002	0,004	0,001- 0,007	0,023
N° de Parto Agrupado (Primípara/Multípara)	Primíparas	149	0,012	-0,045	(-0,068) - (-0,022)	<0,001
	Multíparas	156	-	Referencia	-	-
Edad al Primer Parto (meses)	-	29,82	0,001	0,006	0,004 - 0,008	<0,001
Mes de Servicio Efectivo de la Vaca bajo Estudio (agrupado por trimestres)	Enero- Marzo	168	0,017	0,174	0,140 - 0,208	<0,001
	Abril- Junio	163	0,015	0,142	0,114 – 0,171	<0,001
	Julio- Septiembre	142	0,014	0,005	(-0,023) - (0,033)	0,727
	Octubre- Diciembre	141	-	Referencia	-	-
Sexo de la Cría	Macho	157	0,011	0,054	0,033- 0,074	<0,001
	Hembra	149	-	Referencia	-	
Lactancia Total (a la primera lactancia en miles de litros)	-	8,02	0,002	0,082	0,079 – 0,085	<0,001

Por otro lado, la variable **mes de servicio efectivo de la vaca bajo estudio (agrupado por trimestre)** se asoció con el IPC de la vaca en estudio. En este sentido, las hembras bovinas que recibieron servicio durante los meses de enero-febrero-marzo presentaron una extensión del intervalo parto concepción (168 días) en comparación con las vacas que recibieron servicio en octubre-noviembre-diciembre (141 días) ( $P < 0,001$ ) (Tabla 5).

Las vacas que parieron un **macho** manifestaron un intervalo parto concepción mayor (157 días) que las que dieron una **hembra** (IPC: 149 días) ( $P < 0,001$ ) (Tabla 5). Finalmente, en relación a la variable de entrada **lactancia total a la primera lactancia (en miles de litros)**, las vacas que tuvieron una mayor producción de leche durante su primera lactancia tuvieron un IPC más largo ( $P < 0,001$ ), con un aumento de 1,004 días de IPC en vacas que excedió el promedio de producción en miles de litros (Tabla 5).

#### **4.1.1.3. Resultados Complementarios al Modelo Final**

Las asociaciones significativas no incluidas en el modelo multivariante se detallan a continuación.

Los ciclos variables con ITH alto en el primer trimestre se asociaron con el mes de servicio efectivo de la madre (agrupada en trimestres) ( $P < 0,001$ ) y con el promedio de ITH a lo largo de la gestación completa ( $P < 0,001$ ): vacas que recibieron servicio durante los trimestres de enero-marzo y octubre-diciembre estuvieron expuestas a 4,0 y 6,7 ciclos respectivamente en relación con aquellos que recibieron servicio en los trimestres de abril-junio, julio-septiembre, que estuvieron expuestos a menos de 2 ciclos. Esto significa que los animales gestados en los meses de verano tuvieron un mayor número de ciclos con un ITH alto y el promedio de ITH más alto.

A su vez, el número de partos se asoció con el tipo de parto ( $P < 0,001$ ): las vacas cuyas madres eran primíparas presentaban un promedio de 7,70% de distocia en comparación con aquellas cuyas madres eran multíparas que tenían 3,60% de distocia. Además, el N° de partos se asoció con la edad al primer servicio ( $P < 0,001$ ) (20 meses para hijas de madres multíparas y 21 meses para hijas de madres primíparas).

Por su parte, la edad al primer parto de la vaca en estudio se asoció a la edad al primer servicio (meses) ( $P < 0,001$ ) entendiéndose que a mayor edad al primer servicio mayor fue la edad al parto. A su vez, el nacimiento de un ternero macho se asoció con una mayor predisposición a sufrir distocia ( $P < 0,001$ ) (ternero macho: 13,2%, ternero hembra 8,40%).

Por su parte, la producción de leche se asoció con días con ITH alto en el segundo trimestre de gestación ( $P= 0,001$ ), promedio de ITH (gestación completa) ( $P< 0,001$ ) y porcentaje de días con  $ITH \geq 72$  (gestación completa). Estas tres asociaciones indican que, a valores más altos de ITH durante el desarrollo intrauterino, las vacas tuvieron una mayor producción de leche con un aumento de 1 a 1,5 mil litros por cada aumento en las variables asociadas con ITH.

Por otro lado, la lactancia se asoció con el tipo de parto agrupado como normal o distócico ( $P< 0,001$ ): las vacas que tuvieron partos normales presentaron una producción de leche promedio de 6,776 mil litros durante su lactancia en comparación con aquellas que tuvieron partos distócicos, cuya producción fue de 7,377 mil litros. Asimismo, la lactancia (en la primera lactancia) se vio afectada por la edad en el primer servicio, determinando que por cada mes de retraso en el parto en relación con el promedio (19,53 meses), las vacas producían 0,860 mil litros de leche menos ( $P< 0,001$ ).

#### **4.1.2. Intervalo Parto Primer Servicio (IPPS)**

##### ***4.1.2.1. Análisis Univariado***

La asociación existente entre las variables de entrada del modelo y la variable de respuesta IPPS se detalla en la Tabla 6.

En la Tabla 6 se puede observar que, de las 31 variables evaluadas, 15 estuvieron asociadas con el IPPS (Primer Parto) de la Vaca en Estudio ( $P< 0,15$ ) en el análisis univariado. Tal como ocurrió para el IPC, muchas variables asociadas con el ITH quedaron incluidas en el modelo univariado.

**Tabla 6.** Factores potenciales asociados a la modificación del IPPS (Primer Parto).

Variable Entrada/Efecto Fijo	Categorías	Media	Error Estándar	Valor P
Mes de Servicio Efectivo Agrupado <sup>1</sup>	E.F.M	84,71	1,99	0,270
	A.M.J	84,52	1,85	
	J.A.S	86,03	1,88	
	O.N.D	84,87	1,89	
Mes de Servicio Efectiva	Enero	84,27	2,39	0,301
	Febrero	86,20	2,54	
	Marzo	83,89	2,44	
	Abril	86,86	2,41	
	Mayo	84,02	2,05	
	Junio	83,89	2,02	
	Julio	84,45	2,06	
	Agosto	86,12	2,15	
	Septiembre	88,06	2,24	
	Octubre	85,37	2,15	
	Noviembre	86,02	2,19	
	Diciembre	82,76	2,20	
Días con ITH alto <sup>2</sup> en Primer Trimestre				0,980
Ciclos con ITH alto en Primer Trimestre				0,340
Ciclos con ITH alto en Segundo Trimestre				<b>0,110</b>
Días con ITH alto en Segundo Trimestre				<b>0,060</b>
Ciclos con ITH alto en Tercer Trimestre				0,770
Días con ITH alto en Tercer Trimestre				0,360
Promedio ITH <sup>3</sup> (durante la gestación)				0,820
Promedio ITH alto (durante la gestación)				0,790
% Días con ITH alto 72 (durante la gestación)				0,510
Mediana de Ciclos con ITH alto en Primer Trimestre	<=2	84,58	1,78	<b>0,130</b>
	>2	85,79	1,83	
Percentil de Ciclos con ITH alto en Primer Trimestre	0	83,58	1,79	<b>0,003</b>
	1 - 4	86,87	1,88	
	>4	86,17	1,85	
Mediana de Ciclos con ITH alto en Segundo Trimestre	<=3	84,57	1,79	0,180
	>=4	85,64	1,82	

Percentil en Ciclos con ITH alto en Segundo Trimestre	<=2	84,16	1,80	<b>0,130</b>
	<=5	85,54	1,88	
	>5	85,96	1,88	
Mediana en Días con ITH alto en Segundo Trimestre	<=28	84,64	1,79	0,244
	>=29	85,67	1,82	
Percentil en Días con ITH alto en Segundo Trimestre.	<=14	84,36	1,82	<b>0,071</b>
	<=43	84,54	1,84	
	>43	86,38	1,87	
Mediana del Promedio de ITH (durante la gestación)	<=66,37	84,83	1,80	0,510
	>66,37	85,35	1,81	
Percentil del Promedio de ITH (durante la gestación)	<=65,2	84,94	1,85	0,930
	<=67,37	85,04	1,85	
	>67,37	85,29	1,85	
Mediana del % de Días con ITH alto (durante la gestación)	<=32,24	84,79	1,80	0,440
	>32,24	85,40	1,81	
Percentil del % de Días con ITH Alto (durante la gestación)	<=29,24	84,70	1,84	0,77
	<=34,85	85,28	1,85	
	>34,85	85,31	1,86	
N° de Parto Agrupado <sup>5</sup>	1 Parto	141,97	4,09	<b>&lt;0,001</b>
	2 a 5 Partos	148,57	4,09	
	> a 6 Partos	136,21	4,70	
N° de Parto Agrupado (Primípara. Multípara) <sup>6</sup>	Primíparas	141,87	4,06	<b>0,008</b>
	Multíparas	147,13	4,00	
<b>Variables de las Vacas bajo estudio</b>				
Edad al Primer Servicio (Meses)				<b>&lt;0,001</b>
Edad al Primer Servicio Agrupado (en Meses) <sup>4</sup>	<19 a Meses	81,60	1,68	<b>&lt;0,001</b>
	20-29 Meses	88,19	1,84	
	> a 30 Meses	93,84	2,76	
Edad al Primer Parto (meses)				<b>&lt;0,001</b>
Mes Primer Servicio Postparto de la Vaca bajo Estudio (agrupado por trimestre)	Enero/Febrero/Marzo	94,28	2,20	<b>&lt;0,001</b>
	Abril/Mayo/Junio	87,86	1,94	
	Julio/Agosto/Septiembre	81,71	1,78	
	Octubre/Noviembre/Diciembre	80,86	1,78	
Tipo de Parto Agrupado	Normal	85,10	1,83	0,260
	Distócico	83,53	2,21	

Sexo de la Cría	Macho	86,20	1,80	<0,001
	Hembra	83,72	1,76	
Estado de la Cría	Vivo	84,55	1,74	<0,001
	Muerto	90,54	2,32	
Lactancia Total (a la primera lactancia en miles de litro)				<0,001

<sup>1</sup> **Mes de servicio efectivo agrupado (por trimestre)** de la Vaca que dio origen a la Hembra a la que se le evaluarán las respectivas variables de ITH durante su gestación. <sup>2</sup>**ITH Alto** es cuando los valores del Índice de Temperatura y Humedad fue  $\geq 72$  imputado en los respectivos días y ciclos y períodos de gestación detallado en la tabla. <sup>3</sup> **Promedio de ITH** es la media del Índice de Temperatura y Humedad durante la totalidad de la gestación. <sup>4</sup> **Edad al Primer Servicio Agrupado en meses.** <sup>5</sup> **Nº de Parto Agrupado** en tres categorías de acuerdo a si han tenido 1; 2-5 o más de 6 partos corresponden a la Vaca que dio origen a la Hembra en estudio. <sup>6</sup> **Nº de Parto Agrupado (Primípara. Multípara)** corresponde a la vaca que dio origen a la hembra en estudio.

#### 4.1.2.2. Análisis Multivariado

En la Tabla 7 se detalla el modelo multivariante asociado al intervalo parto primer servicio a partir de las variables que obtuvieron un  $P < 0,15$  al análisis univariado.

**Tabla 7. Modelo Multivariante (AIC: 14.037;  $P < 0,001$ ;  $n = 10.555$ ) ajustado a partir de las variables que obtuvieron un  $P < 0,150$  en el análisis univariado. Variable aleatoria: Tambo:  $P = 0,012$ . Variable de Respuesta: Intervalo Parto Primer Servicio (primer parto).**

Variable Entrada/Efecto Fijo	Categorías	Promedio	Error Estándar	Coefficiente Beta	Intervalo de Confianza 95 %	Valor P
Mediana de Ciclos con ITH alto en Primer Trimestre	$\leq 2$	88,07	0,008	-0,019	(-0,034) - (-0,004)	0,015
	$> 2$	89,74	-	Referencia	-	-
Nº de Parto Agrupado	1	88,21	0,015	0,002	(-0,028) - (0,032)	0,892
	2 a 5	90,49	0,014	0,028	(-0,001) - (0,056)	0,054
	$> 6$	88,02	-	Referencia	-	-
Edad al Primer Servicio (Meses)	-	19,54	0,001	0,014	0,011 - 0,016	$< 0,001$
Edad al Primer Parto (meses)	-	29,82	0,001	-0,002	(-0,005)-(- $< 0,001$ )	0,031
Mes Primer Servicio Posparto de la Vaca bajo Estudio (agrupado por trimestres)	Enero-Marzo	97,23	0,012	0,147	0,123 - 0,170	$< 0,001$
	Abril-Mayo-Junio	90,77	0,010	0,078	0,057 - 0,098	$< 0,001$
	Julio-Agosto-Septiembre	84,28	0,010	0,004	(-0,016) - (0,024)	0,716
	Octubre-Noviembre-Diciembre	83,97		Referencia	-	-
Estado de la Cría	Vivo	86,12	0,014	-0,064	(0,091) - (-0,036)	$< 0,001$
	Muerto	91,77		Referencia	-	-
Sexo de la Cría	Macho	89,77	0,008	0,019	0,004 - 0,034	0,012
	Hembra	88,04		Referencia	-	-
Lactancia Total (a la primera lactancia en miles de litros)	-	8,02	0,001	0,022	0,019 - 0,024	$< 0,001$

Pudo determinarse que las vacas que estuvieron expuestas durante la gestación a una mayor **mediana de ciclos con ITH alto en el primer trimestre de gestación** presentaron un mayor IPPS, es decir, las que las vacas expuestas a más de dos ciclos durante el primer trimestre de gestación presentaron 90 días aproximadamente de IPPS en comparación con los 88 días de animales que padecieron menos de dos ciclos en dicho período ( $P = 0,015$ ) (Tabla 7).

A su vez los animales que fueron gestados por vacas con 2 a 5 partos (**variable Nº de parto agrupado**) mostraron un alargamiento en el IPPS con respecto a aquellos animales congregados bajo la categoría de un solo parto (90 versus 88 días respectivamente) ( $P = 0,054$ ) (Tabla 7).

Una mayor **edad al primer servicio** estuvo asociada con un aumento del IPPS ( $P < 0,001$ ). En este sentido se observó que las vacas con mayor edad al primer servicio tuvieron un

alargamiento en su IPPS a la primera lactancia (Tabla 5). Por otro lado, las vacas con menor **edad al primer parto** presentaron un IPPS más corto ( $P < 0,031$ ) (Tabla 7).

Además, las vacas que recibieron servicio durante los meses de enero, febrero y marzo tuvieron un alargamiento en el IPPS (97 días) en contraste con las que fueron servidas durante el trimestre octubre, noviembre y diciembre, que manifestaron 83 días de IPPS ( $P < 0,001$ , variable **mes primer servicio posparto de la vaca bajo estudio, agrupado por trimestre**) (Tabla 7).

Del análisis multivariado se desprende también que el **estado de la cría** causó un alargamiento en el IPPS dado que las crías muertas causaron un mayor tiempo de retorno a los servicios luego del parto (91 días), en contraste con las crías nacidas vivas que presentaron 86 días ( $P < 0,001$ ) (Tabla 7).

Por otro lado, se observó que las vacas que parieron un macho (**sexo de la cría**) tuvieron un alargamiento en el IPPS (90 vs 88 días) ( $P < 0,012$ ) (Tabla 5). Por último, se evidenció que a una mayor producción láctea se manifestó un alargamiento de 1,051 días en el IPPS por cada mil litros más de leche producida ( $P < 0,001$ ) (Tabla 7, **variable lactancia total a la primera lactancia en miles de litros**).

#### **4.1.2.3. Resultados Complementarios al Modelo Final**

Las asociaciones significativas no incluidas en el modelo multivariante se detallan a continuación y siguiendo la misma metodología que para IPC.

La variable **Mediana de los ciclos con ITH alto en el primer trimestre de gestación** se asoció positivamente con los ciclos con ITH alto en el segundo trimestre de gestación ( $P = 0,001$ ) y con los días con ITH alto en el segundo trimestre de gestación (animales con una mediana de ciclos  $< 2$  tienen 29 días de ITH  $\geq 72$  y los animales con una mediana de ciclos  $\geq 2$  tienen 31 días de ITH  $\geq 72$ ) ( $P = 0,001$ ). También hubo asociaciones positivas entre la **mediana de ciclos con ITH alto en el primer trimestre de gestación** y el **percentil de ciclos con ITH alto en el primer trimestre de gestación** ( $P < 0,001$ ), el **percentil de ciclos con ITH alto en el segundo trimestre de gestación** ( $P = 0,006$ ), y **percentil de días con ITH alto en el segundo trimestre de gestación** ( $P = 0,011$ ). Se verificó un aumento en los percentiles cuando la mediana fue mayor que dos. Es decir, las vacas cuyo desarrollo ocurrió durante los meses estivales tuvieron una mayor cantidad de ciclos y días con índices de temperatura y humedad superior a 72.

Por su parte, la edad al primer parto se asoció con la edad al primer servicio (meses) ( $P < 0,031$ ) interpretándose que a mayor edad al primer servicio mayor fue la edad al parto.

Finalmente, la variable lactancia total (en la primera lactancia) se relacionó positivamente con los ciclos con un ITH alto en el segundo trimestre (aumento de 1,059 mil litros por unidad de ITH incrementada) ( $P = 0,002$ ) y días con ITH alto en el segundo trimestre (aumento de 1,967 mil litros por unidad de ITH aumentada) ( $P < 0,001$ ). Además, se observó una asociación entre la producción durante la lactancia (en la primera lactancia) con el percentil de días con ITH alto en el segundo trimestre: vacas expuestas a percentiles de  $\geq 43$  días produjeron 6.864 litros de leche en comparación con las vacas expuestas a  $\leq 14$  días que produjeron 6.585 litros ( $P < 0,001$ ), interpretándose que el mayor ITH durante el desarrollo tuvo un impacto positivo sobre la producción láctea.

Asimismo, las variables relacionadas con la lactancia mostraron una tendencia a asociarse con el número de partos agrupados como primíparas o multíparas ( $P = 0,061$ ). Las vacas gestadas por madres multíparas tuvieron menos producción (6.656 mil litros) en su primera lactancia que las gestadas por vacas primíparas (6.862 mil litros).

#### **4.2. Evaluación de parámetros de fertilidad. Niveles hormonales y RFA.**

La asociación entre las variables de entrada relacionadas al ITH durante diferentes estadios de la gestación de la vaca bajo estudio y las variables de respuesta se observan en la Tabla 8 y Tabla 9.

**Tabla 8.** Asociación entre la exposición a estrés por calor en los períodos P1 y P2 y gestación completa y las concentraciones hormonales sistémicas e intrafoliculares y RFA en las hijas durante la vida adulta. Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ ). Los valores de  $p$  para asociaciones significativas fueron de  $p \leq 0,05$ ; y para tendencias de  $0,05 < p \leq 0,10$ .

VARIABLE ENTRADA (Efecto Fijo)	RFA	AMH LF (ng/ml)	E2 LF (ng/ml)	E2 Plasma (ng/ml)	P4 LF (ng/ml)	P4 Plasma (ng/ml)	Insulina LF	Insulina Plasma
	$p^1$ Beta	$p^1$ Beta	$p^1$ Beta	$p^1$ Beta	$p^1$ Beta	$p^1$ Beta	$p^1$ Beta	$p^1$ Beta
Promedio ITH (durante la gestación) <sup>2</sup>	0,122	0,472	<b>0,059</b> -110.03	0,440	0,229	0,683	0,972	0,689
% Días con ITH alto (durante la gestación) <sup>3</sup>	0,149	0,541	<b>0,051</b> -27.47	0,765	0,223	0,910	0,583	0,995
Promedio ITH durante P1	0,323	0,880	0,937	0,264	0,464	0,782	0,621	0,238
% Días con ITH alto durante P1	0,616	0,656	0,944	0,177	0,347	0,926	0,660	0,136
Ciclos con ITH alto durante P1	0,644	0,730	0,846	0,310	0,294	0,640	0,669	0,160
Índice de Exposición durante P1	<b>0,100</b> -0,303	0,582	0,839	0,392	0,389	0,620	0,726	0,553
Promedio ITH durante P2	0,951	0,498	0,242	<b>0,084</b> -0,215	0,856	0,977	0,640	0,316
% Días con ITH alto durante P2	0,611	0,397	0,239	0,121	0,697	0,979	0,947	0,135
Ciclos con ITH alto durante P2	0,665	0,234	0,171	<b>0,079</b> -0,334	0,374	0,705	0,769	<b>0,080</b> <b>0,018</b>
Índice de Exposición durante P2	0,283	0,499	0,627	0,291	0,891	0,475	0,895	0,330

**Tabla 9.** Asociación entre la exposición a estrés por calor en los tres Trimestres de la gestación y las concentraciones hormonales sistémicas e intrafoliculares y RFA en las hijas durante la vida adulta. Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ ). Los valores de  $p$  para asociaciones significativas fueron de  $p \leq 0,05$ ; y para tendencias de  $0,05 < p \leq 0,10$ .

VARIABLE ENTRADA (Efecto Fijo)	RFA	AMH LF (ng/ml)	E2 LF (ng/ml)	E2 Plasma (ng/ml)	P4 LF (ng/ml)	P4 Plasma (ng/ml)	Insulina LF	Insulina Plasma
	P <sup>1</sup> Beta	P <sup>1</sup> Beta	P <sup>1</sup> Beta	P <sup>1</sup> Beta	P <sup>1</sup> Beta	P <sup>1</sup> Beta	P <sup>1</sup> Beta	P <sup>1</sup> Beta
Promedio ITH en T1	0,345	0,683	0,549	0,116	0,798	0,853	0,740	0,315
Ciclos con ITH alto en T1	0,504	0,486	0,676	<b>0,045</b> 0,478	0,627	0,964	0,825	0,176
% Días con ITH alto en T1	0,370	0,745	0,580	<b>0,052</b> 0,050	0,684	0,844	0,735	0,201
Índice de Exposición en T1 <sup>4</sup>	0,214	0,699	0,793	0,116	0,627	0,892	0,426	0,239
Promedio ITH en T2	0,605	0,700	0,126	0,474	0,202	0,753	0,735	0,385
Ciclos con ITH alto en T2	0,837	0,546	0,142	<b>0,081</b> -0,215	0,282	0,367	0,556	0,723
% Días con ITH alto en T2	0,892	0,994	0,221	0,298	0,206	0,509	0,730	0,651
Índice de Exposición en T2	0,896	0,801	0,528	0,567	<b>0,025</b> 0,097	0,890	0,786	0,369
Promedio ITH en T3	0,990	0,496	0,392	0,138	0,706	0,940	0,617	0,214
Ciclos con ITH alto en T3	0,759	0,271	0,339	0,206	0,279	0,755	0,652	<b>0,089</b> 0,020
% Días con ITH alto en T3	0,777	0,428	0,364	0,275	0,557	0,812	0,849	0,130
Índice de Exposición en T3	0,991	0,753	0,190	0,405	0,940	0,828	0,503	0,470

Las Tablas 8 y 9 muestran que, las variables relacionadas con el ITH en los diferentes estadios de la gestación estuvieron asociadas con la concentración de E2 **en líquido folicular y en plasma**, al igual que la **Progesterona en líquido folicular**. La concentración de **AMH, Insulina en Líquido Folicular y Progesterona en Plasma** no estuvieron asociadas con las variables de ITH en los diferentes períodos de la gestación. La determinación de AMH en plasma no fue posible su análisis debido a que las concentraciones presentes han sido inferiores al límite de detección de la técnica utilizada. Asimismo, la concentración de **Insulina en Plasma** tuvo una tendencia positiva con la variable Ciclos con ITH alto durante el Segundo Periodo de la gestación ( $P= 0,080$ ) y específicamente en el Tercer Trimestre de Gestación ( $P= 0,089$ ). Por su parte, en relación con el **RFA** se observó una tendencia negativa con el Índice de Exposición durante los Primeros 150 días de Gestación ( $P= 0,100$ ).

El **Estradiol en Líquido Folicular** se asoció con el Promedio ITH alto durante toda la gestación ( $P= 0,051$ ). Asimismo, se observó una tendencia negativa (indicada por el valor de  $\beta$ ) con el Promedio ITH durante toda la gestación ( $P= 0,059$ ), es decir, que aquellas vacas que estuvieron mayor cantidad de días expuestas a condiciones de  $ITH \geq 72$ , presentaron una disminución en la concentración de Estradiol en líquido folicular.

Asimismo, los animales que presentaron mayor cantidad de Ciclos con ITH alto en el Primer Trimestre de Gestación ( $P= 0,045$ ) y mayor % Días con ITH alto en Primer Trimestre de la Gestación ( $P= 0,052$ ), manifestaron una asociación positiva con la concentración de estradiol en plasma. Sin embargo, se detectó una tendencia negativa con los Ciclos con ITH alto en Segundo Trimestre de Gestación ( $P= 0,081$ ) y el Promedio ( $P= 0,084$ ) y los Ciclos con ITH alto en el segundo periodo de la gestación ( $P= 0,079$ ), entendiéndose que las vacas con mayor exposición a ITH elevado durante el segundo periodo de la gestación y, específicamente, en el segundo trimestre de la misma, tuvieron menores niveles de Estradiol en plasma en la vida adulta.

La restante variable significativa en el análisis estadístico, fue la concentración de **Progesterona en Líquido Folicular** que mostró una asociación positiva ( $P= 0,025$ ) con el Índice de Exposición en el Segundo Trimestre de Gestación, es decir, que las vacas con mayor índice de exposición en dicho período, presentaron un aumento en la concentración de progesterona intrafolicular durante la adultez.

## **5. DISCUSIÓN**

---

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Influencia del estrés calórico sobre los índices reproductivos. Análisis retrospectivo.

El término estrés es comúnmente utilizado para indicar una condición ambiental que es adversa al bienestar animal (Stott, 1981). La magnitud del estrés y su impacto asociado en la producción animal son difíciles de definir. Stott (1981) señaló que la única forma de medir la magnitud del estrés es a través de la respuesta animal. Así, diferentes índices han sido propuestos para identificar condiciones de estrés en situaciones comerciales de producción de leche y carne bovina. Para cuantificar dicha magnitud, se han creado una serie de índices, siendo el Índice de Temperatura y Humedad, desarrollado por Thom (1959), el que ha llegado a ser el estándar para la clasificación térmica del ambiente en muchos estudios de producción y manejo animal (Hahn *et al.*, 2003), siendo el indicador biometeorológico utilizado en la presente investigación. Los resultados del análisis retrospectivo de este estudio han permitido identificar asociaciones relevantes entre las condiciones en las que fueron gestadas las vacas y eventos reproductivos ocurridos al menos tres años después. Estos permitirán continuar con investigaciones en el tema y tomar decisiones a la hora de evaluar la performance reproductiva de un modo diferencial e inclusive al momento de selección de animales para reposición.

En este sentido, este trabajo es uno de los primeros estudios retrospectivos en la zona de procedencia de los animales evaluados y con el número de animales analizados, que ha podido identificar asociaciones entre variables ambientales que impactaron durante el desarrollo y su efecto en la vida productiva en vacas lecheras durante su adultez.

En la presente investigación, se ha identificado que los ambientes con un  $ITH \geq 72$  durante el primer trimestre de desarrollo intrauterino se asociaron negativamente con los índices reproductivos IPC e IPPS de la descendencia durante la vida adulta.

Otros investigadores han demostrado que el estrés por calor materno durante el periodo seco afecta el rendimiento durante la vida postnatal (Ahmed *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2016a). En dichos estudios se detectó que el estrés por calor conduce a un menor peso corporal de la cría al año de edad (a pesar de que no hay diferencia en el peso corporal en la vida adulta), así como a un menor rendimiento en producción de leche en la primera lactancia (Monteiro *et al.*, 2016b). Estos autores también encontraron que las vaquillonas nacidas de madres que padecieron estrés por calor durante la gestación tardía tenían una mayor probabilidad de descarte antes de la pubertad debido al retraso del crecimiento, enfermedades y malformación en comparación con las vacas secas que fueron colocadas en condiciones ambientales mejoradas mediante

ventiladores, aspersión y sombra (Monteiro *et al.*, 2016a). Curiosamente, también observaron que estas vaquillas presentaron un mayor número de servicios por concepción (confirmado 30 días después de la inseminación) y una menor producción de leche en la primera lactancia que las nacidas de vacas con condiciones ambientales normales de alta temperatura y humedad (Monteiro *et al.*, 2016a). Sin embargo, debe considerarse que estos estudios se llevaron a cabo en condiciones experimentales, en las que las vacas fueron colocadas bajo situaciones de alto ITH con y sin acceso a mejoras en las instalaciones para facilitar la disipación del calor (Monteiro *et al.*, 2016a; Monteiro *et al.*, 2016b; do Amaral *et al.*, 2009). Debe considerarse que la mayoría de esos estudios informaron la exposición de las vacas a un ambiente con ITH elevado solo en la última etapa de la preñez y sus efectos sobre la descendencia. En este sentido, Akbarinejad *et al.* (2017) mostraron efectos del estrés por calor materno en vacas lecheras sobre la fertilidad, la longevidad productiva y la reserva ovárica en la descendencia. Estos autores estudiaron 206 vacas agrupadas como no expuestas o expuestas durante un período mayor a dos meses y medio en el primer, segundo o tercer trimestre de gestación a ITH superior a 72 y encontraron que el segundo y tercer trimestre parecían ser períodos más críticos. En el presente estudio, encontramos que un  $ITH \geq 72$  en la primera etapa del desarrollo intrauterino de las vacas se asoció con el IPC y el IPPS en la vida adulta. Cabe señalar que los datos aquí informados provienen de una gran cantidad de animales y se evaluaron diferentes establecimientos de producción lecheras localizado en la principal cuenca lechera de la Argentina. Estos datos mostrarían una relación con el desarrollo temprano de estos animales (Monniaux *et al.*, 2014).

Tal como se detalló en los resultados, quedaron dentro de los modelos multivariantes factores asociados a las variables respuestas el IPC e IPPS no relacionados al ITH. Dichos factores de confusión fueron contemplados con el fin de neutralizar su impacto dentro de los resultados obtenidos. Es decir que, además de las variables relacionadas al ITH, también se contemplaron factores propios que impactan en la performance reproductiva. En este sentido, dentro de los modelos multivariantes, el intervalo parto concepción e intervalo parto primer servicio fueron influenciados por otras variables previamente descritas por muchos autores, tales como partos distócicos, el nacimiento de un ternero macho o un ternero muerto (Johanson y Berger 2003; Dhakal *et al.*, 2013). En este sentido, el parto de un ternero macho está asociado con mayor peso al nacer lo que implica más dificultades para parir, lo que confirma resultados anteriores de que el peso del ternero se asocia con distocia (Linden *et al.*, 2009). Estos estudios también mostraron que las vacas que paren un ternero macho son más propensas a experimentar distocia que las vacas que dan a luz a un ternero hembra, probablemente relacionado con un mayor peso

en los terneros machos que en las terneras (Johanson *et al.*, 2003; Linden *et al.*, 2009). Asimismo, en un estudio de cohorte prospectivo realizado en una granja lechera comercial ubicada en Nueva York, se determinó que la asistencia durante el parto se asoció con un mayor peso al nacer (Linden *et al.*, 2009). Estos autores determinaron que estas variables podrían estar asociadas con algunos efectos posteriores como asistencia obstétrica, eventos de cojera y producción de leche, pero no con incidencia de muerte fetal, mortalidad de terneros después de las doce horas posparto, reproducción o supervivencia de las madres. Por otro lado, Tenhagen *et al.* (2007) realizó un estudio retrospectivo de casos y controles en granjas lecheras del norte de Alemania con el objetivo de analizar el efecto de diferentes grados de distocia en la fertilidad de las vacas, la viabilidad de los terneros y las vacas, entre otras variables. Estos autores observaron que los casos leves de distocia no tuvieron un efecto significativo sobre la producción de leche, la fertilidad y la supervivencia de las vacas. La viabilidad de la descendencia se redujo por los casos leves y severos de distocia, mientras que la diferencia entre cesáreas y controles fue mínima. Por otro lado, los casos más graves de distocia y cesáreas tuvieron efectos importantes en la fertilidad y supervivencia de las vacas (Tenhagen *et al.*, 2007). En la presente investigación observamos que las vacas con partos distócicos presentaron una diferencia de producción de leche mayor en su primera lactancia con respecto a las que tuvieron partos normales, posiblemente la magnitud de la asistencia durante el parto, en sintonía a lo descrito por Tenhagen *et al.* (2007), no fue significativa.

En nuestra investigación, el ITH en el momento del servicio en la vaca en estudio tuvo una influencia significativa en los IPC e IPPS, lo cual ha sido previamente descrito por muchos autores (Collier *et al.*, 2017; De Rensis y Scaramuzzi, 2003; Tao *et al.*, 2019). En vacas con estrés por calor, la duración e intensidad del estro se reduce. En verano, las manifestaciones del estro (como actividad motora y número de montas) se reducen y la incidencia de anestro y ovulación silenciosa aumentan (Collier *et al.*, 2017; De Rensis y Scaramuzzi, 2003; Tao *et al.*, 2019). Por lo tanto, en climas cálidos hay una reducción en el número de inseminaciones y un aumento en la proporción de inseminaciones infructuosas. El calor causa estrés en los animales, lo que resulta en un aumento de la frecuencia respiratoria, hipertermia y una disminución en la ingesta de materia seca (Berman *et al.*, 1985; De Rensis y Scaramuzzi, 2003). Esto tiene influencia directa en los patrones hormonales (Luteinizante y Foliculoestimulante y hormonas esteroides). Por otro lado, hay un agravamiento del equilibrio energético negativo y alteraciones en el entorno uterino. Todos los eventos mencionados producen subfertilidad y, en consecuencia, pérdidas económicas (Collier *et al.*, 2017; De Rensis y Scaramuzzi, 2003; Tao *et al.*, 2019).

Dentro del estudio retrospectivo de los resultados, en el presente estudio encontramos una asociación positiva entre la producción de leche y el ITH alto durante la gestación completa y, principalmente, en el segundo trimestre de la preñez. Otros autores encontraron que las hijas de las vacas que estuvieron expuestas a estrés por calor durante los últimos dos meses de preñez (período seco), producían menos leche en comparación con aquellas cuyas madres tuvieron acceso a ambientes controlados que favorecieron la disipación del calor (Dahl *et al.*, 2017; Tao *et al.*, 2019). Estos resultados difieren con los encontrados en nuestro estudio. En este sentido, se debe considerar que el desarrollo de la glándula mamaria comienza en el período prenatal y continúa durante la vida postnatal (prepuberal, puberal, gestación y las sucesivas lactancias de la vaca) (Svennersten-Sjaunja y Olsson, 2005). Barash *et al.* (1996) determinaron en un estudio retrospectivo realizado en Israel, los efectos del mes de nacimiento de la vaca en la producción de leche, grasa y proteínas. Estos autores observaron que la producción de leche fue más baja en vacas nacidas a principios de primavera y más alta en vacas nacidas en otoño. Esto se atribuyó a cambios en la temperatura o el fotoperíodo durante la preñez y las modificaciones hormonales relacionadas con dicho evento. En este sentido, los nacimientos de terneros en otoño podrían estar relacionados con altos niveles de temperatura durante su desarrollo intrauterino, especialmente durante el segundo trimestre, en relación con los nacimientos de terneros en primavera. En el presente estudio, no encontramos un efecto del ITH durante el último trimestre que afecte los índices estudiados, lo que no descarta la posibilidad de un efecto de estrés posnatal o efectos aditivos de la exposición a factores estresantes en cualquiera de las etapas de la gestación sumadas a una exposición después del nacimiento.

Se ha informado que las temperaturas elevadas al final de la gestación generan cambios metabólicos que incluyen concentraciones bajas de insulina en terneros recién nacidos (Kamal *et al.*, 2014; Tao *et al.*, 2014). Por su parte, Van Eetvelde *et al.* (2017) reportaron bajas concentraciones de insulina en vaquillonas nacidas en primavera y verano en relación a las nacidas en invierno. Estos resultados indican diferencias en el metabolismo de los terneros recién nacidos, lo que sugiere una relación con las temperaturas ambientales al final de la gestación. Tao *et al.* (2014) informaron concentraciones reducidas de insulina y una mayor sensibilidad a la insulina en terneros nacidos de madres que estuvieron expuestas a estrés por calor en la última parte de la gestación. Es interesante notar que las terneras con un nivel de insulina más bajo al nacer produjeron más leche durante la primera lactancia (Van Eetvelde *et al.* 2017). Se desconoce el mecanismo exacto detrás de esta asociación, pero se pueden sugerir varias explicaciones. Van Eetvelde *et al.* (2017) sugieren que una mayor sensibilidad a la insulina podría inducir un crecimiento mayor de los tejidos (incluido el tejido mamario) durante

la vida temprana, lo que resulta en un mayor rendimiento en la primera lactancia. Por lo tanto, es razonable sugerir que las vacas de primer parto con bajas concentraciones de insulina al nacer, además de un rápido crecimiento corporal, podrían tener un mayor riesgo de resistencia a la insulina cuando alcanzan la edad del primer parto. En el ganado lechero, se acepta generalmente que es necesario un estado de resistencia a la insulina en las primeras etapas de la lactancia para asegurar un suministro adecuado de glucosa a la glándula mamaria (Bell, 2006). La mayor sensibilidad a la insulina al nacer podría inducir una mayor resistencia a la insulina y explicar así la mayor producción de leche durante la primera lactancia. Se ha reportado que, terneros y terneras sometidas a estrés por calor, tuvieron con frecuencia un aumento de insulina y una disminución de las hormonas tiroideas. La insulina evita que los animales movilicen el tejido adiposo (Baumgard y Rhoads 2013). Esto podría conducir a un catabolismo de proteínas acelerado en la glándula mamaria y los músculos para obtener más sustrato energético, comprometiendo el rendimiento del crecimiento. Esto podría estar relacionado con la reducción en los niveles de hormonas tiroideas, por su correlación positiva con el aumento de peso y el desarrollo de tejidos (Magdub *et al.*, 1982). Estas alteraciones en la fisiología y en el metabolismo energético tienden a ser mecanismos adaptativos (Wang *et al.*, 2020) y juegan un papel fundamental en la vida productiva y reproductiva futura.

Por otro lado, debe considerarse que muchos factores ambientales (incluido el ITH) podrían afectar el desarrollo postnatal de la glándula mamaria. Diversos autores han encontrado asociaciones entre el entorno materno durante la gestación y diferentes características en la progenie (Banos *et al.*, 2007; Van Eetvelde *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2020). Dentro de estos estudios, muchos han evaluado la influencia de la demanda de energía en la madre para el crecimiento, la preñez y la producción de leche en el desarrollo fetal. La producción de leche es el principal competidor del feto por los nutrientes durante la gestación y puede influir en el desarrollo de este último indirectamente al comienzo de la gestación, cuando los requerimientos de nutrientes fetales son bajos y luego directamente más tarde en la gestación cuando son altos (Banos *et al.*, 2007; Van Eetvelde *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2020).

La capacidad de una vaca preñada para mantener un embrión está determinada en gran medida por la forma en que divide los nutrientes para apoyar el desarrollo fetal junto con su propio crecimiento, mantenimiento y producción de leche. Aunque las necesidades de energía de un embrión en desarrollo son muy pequeñas, el entorno uterino materno de una vaca de alto rendimiento puede crear un efecto en la descendencia a través de rutas hormonales o de otro tipo que son detectables a través de una serie de características como la producción de leche, la resistencia a enfermedades, supervivencia, puntuación de condición corporal (BCS), energía

corporal y fertilidad en la descendencia. Conceptualmente, el propio nivel de energía de una madre se puede deducir de su BCS, producción de leche y edad al parto. Estos pueden verse como indicadores del entorno materno durante la gestación (Banos *et al.*, 2007).

En el ganado bovino, se ha investigado el posible efecto negativo de la alta producción de leche durante la gestación sobre el rendimiento de la descendencia, lo que ha dado lugar a resultados contradictorios. Berry *et al.* (2008) reportaron una reducción en el rendimiento de la primera lactancia en vaquillonas nacidas de madres de alto rendimiento, mientras que otros autores no encontraron ningún efecto en la producción de leche materna (Banos *et al.*, 2007; Astiz *et al.*, 2014; Van Eetvelde *et al.*, 2017). La falta de una asociación clara entre la cantidad de leche producida por la madre durante la gestación y los efectos a largo plazo sobre la capacidad de producción de la descendencia podría deberse a otros factores maternos que ejercen modificaciones en el metabolismo de la descendencia (Van Eetvelde *et al.*, 2017). En este sentido, una vaca en condiciones de estrés calórico debe destinar parte de los nutrientes para disipar el calor, que se suma a sus requerimientos, en detrimento de la producción de leche y también del desarrollo embrionario/fetal. Es probable que una de las razones de estos cambios se encuentre en los cambios metabólicos que pueden ocurrir en las hembras preñadas, que pueden tener una influencia directa o indirecta en el desarrollo del ternero.

En este punto, es importante aclarar que la relación positiva entre el ITH alto y la lactancia observada en nuestro estudio no implica una relación causa-efecto, pero puede ser una asociación estadística no causal. En este sentido, el presente estudio, podría ser pertinente para profundizar investigaciones con el fin de establecer la posible relación entre el ITH durante la preñez y las variables fisiológicas involucradas en la lactancia.

## **5.2. Influencia del Estrés Calórico sobre Niveles Hormonales y RFA.**

Se han registrado en el presente trabajo de tesis, asociaciones y tendencias entre la concentración plasmática e intrafolicular de E2 y P4 en las hijas y los indicadores de estrés calórico en las madres. Nuestros resultados indican asociaciones positivas o negativas dependiendo del periodo del desarrollo en que el ITH fue elevado. En el primer trimestre de gestación, las vacas expuestas a un número mayor de ciclos y porcentaje de días con elevado ITH presentaron asociación positiva con los niveles de E2 plasmático y, en cambio, una tendencia de asociación negativa con los ciclos con ITH elevados en el segundo trimestre y periodo de la gestación. Además, se determinó que las hijas de vacas que estuvieron expuestas

a estrés por calor (elevado promedio de ITH $\geq$ 72 y % Días con ITH alto) durante toda la gestación presentaron una disminución en los E2 en líquido folicular durante el proestro. No se encontró asociación entre la concentración plasmática de progesterona en las hijas y el ITH $\geq$ 72 que padecieron en su desarrollo. En cambio, se registró una asociación de la concentración de progesterona en líquido folicular con el índice de exposición en el segundo trimestre de la gestación.

Las gonadotrofinas hipofisiarias estimulan a las células de la granulosa y la teca y preparan al folículo para la producción de estradiol y otros factores necesarios para la continuidad de las fases finales de maduración ovocitaria en el folículo dominante y posterior ovulación o para la atresia en los folículos subordinados (Vásquez–Cano y Olivera, 2010). Vacas con bajos niveles de E2 podrían ver afectada su performance reproductiva. En este sentido, la disminución en el E2 (sistémico y folicular) se refleja en una disminución en la intensidad y duración del celo y la supresión de LH, afectando la cascada de eventos indispensables la correcta ovulación y por ende el normal ciclo reproductivo (Roth y Wolfenson, 2016).

Bajo condiciones de estrés calórico, los folículos presentan una capacidad esteroidogénica reducida caracterizada por una disminución en la actividad aromatasa por parte de las células de la granulosa y una disminución en la concentración de estradiol en el folículo dominante (Wolfenson *et al.*, 1997; Bridges *et al.*, 2005). Roth *et al.* (2001) reportaron un efecto retardado del estrés por calor sobre la producción de esteroides en folículos preovulatorios bovinos una vez que el efecto estresante había cesado. Los efectos potencialmente adversos de la disminución en la producción de E2 implican un impacto en la duración e intensidad del estro, así como la supresión de la secreción de LH, lo que sucesivamente puede alterar los eventos involucrados en el proceso de ovulación afectando la fertilidad (Wolfenson *et al.*, 2000; Roth *et al.*, 2001; Roth y Wolfenson, 2016). Cerca del momento en que ocurre la ovulación, el pico de LH induce un cambio de predominio de E2 a P4 en el LF de folículos preovulatorios (Dieleman *et al.*, 1983). Asimismo, podrían producirse alteraciones en la retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario traduciendo en un impacto sobre la capacidad ovulatoria del folículo preovulatorio, al igual que sobre el pool de folículos antrales del cual aquellos que llegan a estadios ovulatorios son seleccionados (Hunter *et al.*, 2004). En este sentido varios autores reportaron que vacas con mastitis (Lavon *et al.*, 2010, 2011) o con restricción nutricional (Bossis *et al.*, 1999; Mackey *et al.*, 2000; Wolfenson *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2012) presentan una disminución tanto en el pico preovulatorio de LH como en la capacidad esteroidogénica folicular. Wilson *et al.* (1998ab) encontraron que la concentración de estradiol en plasma fue significativamente menor tanto para vacas como en vaquillonas en

condiciones de estrés calórico. Por otro lado, en estudios sobre estrés calórico, en ambientes naturales o con el uso de mitigadores de calor (ventilación, sombras, aspersores), no se encontraron diferencias en la concentración de estradiol en vacas con o sin estrés calórico (Roth *et al.*, 2001; de Castro e Paula *et al.*, 2008).

A estos efectos directos que ocurren en las hembras expuestas a un estresor, debemos sumar los efectos indirectos sobre las crías, cuando las madres estuvieron expuestas a esos estresores durante la gestación. Estudios previos realizados con factores estresantes durante el período fetal demostraron su implicancia cuando adulto, tales reportes llevados a cabo en ratas destetadas, se relacionan con los primeros trabajos en este tema (Levine, 1957) donde se determinó que la capacidad del ambiente para modificar la función hipotálamo-pituitario-adrenal en estadios de desarrollo temprano y que perdure aun en la edad adulta era posible. En estudios realizados en terneros cuyas madres fueron sometidas a estrés por transporte durante la preñez, el *clearance* de cortisol fue más lento que en los controles y el peso de la pituitaria aumentó significativamente (Lay *et al.*, 1997ab). En este sentido, muchos estudios han reportado efectos de la subnutrición o sobrenutrición de las madres sobre la fertilidad de las hijas (Evans *et al.*, 2012; Mossa *et al.*, 2013). Se han observado cambios en el desarrollo gonadal y la expresión génica pituitario-gonadal en fetos bovinos de madres que fueron restringidas nutricionalmente en el segundo y tercer tercio de la gestación (Weller *et al.*, 2016). Se determinó además una menor expresión del gen FSHB en la pituitaria fetal en las hijas de vacas con aportes nutricionales restringidos que en la de vacas con ingesta *ad libitum*, a los 199 y 268 días de gestación (Weller *et al.*, 2016). Estos autores también demostraron que los ovarios de fetos de vacas con ingesta *ad libitum* tenían mayor expresión de P450arom, StAR, BMPR2, TGFBR1, GDF9, FSHR, Bax y CASP3 que los de vacas con ingesta moderada, a los 199 y 268 días de gestación (Weller *et al.*, 2016). Ha sido demostrado que, en las ovejas, la desnutrición materna retrasa el desarrollo folicular (Rae *et al.*, 2001) y aumenta la expresión de genes apoptóticos en el ovario fetal (Lea *et al.*, 2006). Muchos estudios se han centrado en las consecuencias de la desnutrición durante la preñez de las madres, en sus hijos (Mossa *et al.*, 2013). Estos estudios han enfatizado que las mayores consecuencias se dan en las últimas etapas de la gestación, durante las cuales aumentan los requerimientos nutricionales del feto. En este sentido, los requerimientos de crecimiento de las crías se ven incrementados al final de la gestación cuando se produce el mayor crecimiento del feto. Sin embargo, se debe considerar que, en el ganado bovino, tanto las gónadas (ovarios y testículos) como el eje hipotalámico-pituitario se desarrollan precozmente, en el primer y segundo trimestre de gestación, y que cualquier alteración en este período lábil puede tener consecuencias en la reproducción durante

la vida adulta (Rhind *et al.*, 2001; Monniaux *et al.*, 2014). En fetos de ambos sexos, el desarrollo del eje hipotalámico-hipofisario y la síntesis asociada de gonadotropinas son potencialmente sensibles a influencias nutricionales y de otro tipo (Rhind *et al.*, 2001). En este sentido debe considerarse que tanto las gonadotropinas como los esteroides intervienen en la regulación de la esteroidogénesis y el desarrollo ovárico y folicular fetal (Burkhart *et al.*, 2010; Fortune *et al.*, 2013). Los cambios en la programación fetal reportados podrían estar involucrados en las alteraciones a nivel endócrino de la progenie encontradas en este trabajo.

Existe evidencia que indica que el estrés calórico afecta el desarrollo del embrión (Hansen, 2005). En este sentido ha sido descrito que los ovocitos en el folículo, la fecundación y los primeros dos días de desarrollo embrionario son sensibles a condiciones de elevados ITH, adquiriendo el embrión cierta tolerancia al tercer y cuarto día (Hansen, 2005). Sakatani *et al.* (2012) encontraron resultados similares con la aplicación de un tratamiento de 40°C durante 24 horas en un cultivo de mórulas, el cual no tuvo ningún efecto adverso en el desarrollo de blastocitos mientras que sí hubo una disminución significativa en el porcentaje de blastocitos desarrollados cuando el mismo tratamiento se aplicó a nivel de cigotos. Todas estas alteraciones podrían tener un impacto en la programación fetal de ese embrión de superar el período de gestación.

Nuestros resultados muestran que el  $ITH \geq 72$  pudo influenciar negativamente el RFA donde detectamos una tendencia negativa. Monniaux *et al.* (2014) describen que el número de folículos antrales varía muy poco en un mismo animal durante ciclos estrales sucesivos a lo largo de su vida. Asimismo, los animales con bajo promedio de folículos, mostraron una baja respuesta a la FSH y baja calidad ovocitaria. En este sentido, diversos autores han demostrado que animales con menor cantidad de folículos en la reserva ovárica se correlaciona con la fertilidad individual de las hembras bovinas, reflejadas en menores concentraciones de progesterona, bajos niveles circulantes de hormona anti-Mülleriana durante la fase lútea y una pared endometrial más delgada (Ireland *et al.*, 2008, 2011; Fortune *et al.*, 2013; Evans *et al.*, 2010). Por el contrario, una mejor reserva ovárica se traduce en un *pool* mayor de folículos antrales y una respuesta superovulatoria mayor (en técnicas de biotecnologías de la reproducción) (Murphy, 2018). La confirmación experimental de esta hipótesis, en vacas, proviene de estudios recientes que demuestran que la población folicular dicta no solo el número de ovulaciones en respuesta al tratamiento con gonadotropinas, sino también la supervivencia de los embriones producidos. La aneuploidía del ovocito, y consecuentemente del embrión, es la principal causa de falla en la embriogénesis (Murphy, 2018). Asimismo, en el análisis retrospectivo realizado, se observó que elevados ITH estuvieron asociados con el

intervalo parto primer celo y el intervalo parto primer servicio y esto podría estar relacionado a su vez con la cantidad de folículos antrales y el estado de los ovocitos dentro de los mismos.

Es sabido que la concentración de hormona anti Mülleriana, producida por células de la granulosa del folículo, en suero es útil como biomarcador para el tamaño relativo de la reserva ovárica de folículos antrales (Irland *et al.*, 2008), en nuestra investigación no encontramos una asociación entre dicha hormona determinada en líquido folicular del folículo dominante y las condiciones de estrés calórico durante la gestación.

Así como la Hipótesis de Barker (*“Mothers, babies and health in later life”*) es un complejo modelo explicativo de la participación de condiciones durante la vida intrauterina en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes en la edad adulta en humanos, en base a sus estudios en Inglaterra durante los años 1968-1978, nuestro trabajo aporta conocimientos al impacto de las condiciones de ITH elevados durante la gestación y posterior vida productiva de las vacas.

## **6. CONCLUSIONES**

---

## 6. CONCLUSIONES

La exposición a elevados índice de temperatura y humedad, mostraron asociaciones estadísticas con las variables respuestas Intervalo Parto Concepción e Intervalo Parto Primer Servicio al Primer Parto de la progenie durante su vida adulta.

Por otra parte, pudo determinarse que la concentración de E2 *en líquido folicular y en plasma*, al igual que la P4 *en líquido folicular* estuvo asociada con el ITH.

Es probable que estas condiciones adversas generen cambios en el ambiente uterino y, por ende, afecten al embrión-feto, lo que conduciría a cambios permanentes en la vida adulta y posiblemente en las generaciones futuras. Queda por evaluar si estos cambios están relacionados con marcas epigenéticas en células relacionadas con el desarrollo reproductivo. En este sentido, las asociaciones de la presente investigación pueden dar lugar a estudios experimentales para determinar las bases biológicas involucradas e incluso ahondar en medidas que atenúen aún más las condiciones ambientales adversas durante etapas críticas del desarrollo fetal.

Estos resultados contribuyen al conocimiento general de las herramientas de manejo para mejorar las condiciones en las que se mantienen las vacas durante las estaciones cálidas, especialmente en áreas donde las condiciones adversas para el ganado se alcanzan fácilmente como ocurre en la cuenca lechera santafesina en Argentina.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- **Aerts JM, Bols PE.** 2010. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod Domest Anim* 45: 171–179.
- **Ahmed BMS, Younas U, Asar TO, Dikmen S, Hansen PJ, Dahl GE.** 2017 Cows exposed to heat stress during fetal life exhibit improved thermal tolerance. *J Anim Sci* 2017;95:3497. <https://doi.org/10.2527/jas2016.1298>.
- **Akbarinejad V, Gharagozlou F, Vojgani M.** 2017 Temporal effect of maternal heat stress during gestation on the fertility and anti-Müllerian hormone concentration of offspring in bovine. *Theriogenology* 2017;99:69–78. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.05.018>
- **Astiz S, Gonzalez-Bulnes A, Sebastian F, Fargas O, Cano I, Cuesta P.** 2014. Maternal aging affects life performance of progeny in a Holstein dairy cow model. *J Dev Orig Health Dis* 2014;5:374e84. <https://doi.org/10.1017/S2040174414000361>.
- **Banos G, Brotherstone S, Coffey MP.** 2007. Prenatal maternal effects on body condition score, female fertility, and milk yield of dairy cows. *J Dairy Sci* 2007;90: 3490e9. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-809>.
- **Barash H, Silanikove N, Weller JI.** 1996. Effect of Season of Birth on Milk, Fat, and Protein Production of Israeli Holsteins. *J Dairy Sci* 1996;79:1016–20. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76453-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76453-6).
- **Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C.** 2002. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 31:1235-1239.
- **Bártová E, Krejčí J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S.** 2008. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J. Histochem. Cytochem.* 2008; 56 (8):711-21.
- **Baumgard LH, Rhoads RP.** 2013. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. *Annu Rev Anim Biosci* 2013;1:311e37. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103644>.
- **Bell AW.** 2006. Prenatal programming of postnatal productivity and health of livestock: a brief review. *Aust J Exp Agric* 2006;46:725. <https://doi.org/10.1071/EA06006>

- **Bello NM, Steibel JP y Pursley JR** 2006 Optimizing Ovulation to First GnRH Improved Outcomes to Each Hormonal Injection of Ovsynch in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **89** 3413–3424.
- **Berman A, Folman Y, Kaim M, Mamen M, Herz Z, Wolfenson D.**1985. Upper Critical Temperatures and Forced Ventilation Effects for High-Yielding Dairy Cows in a Subtropical Climate. *J Dairy Sci* 1985;68:1488–95. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80987-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80987-5).
- **Berry DP, Lonergan P, Butler ST, Cromie AR, Fair T, Mossa F.** 2008. Negative influence of high maternal milk production before and after conception on offspring survival and milk production in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2008;91: 329e37. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0438>.
- **Bossis I, Wettemann RP, Welty SD, Vizcarra JA, Spicer LJ, Diskin MG.** 1999. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *J Anim Sci.* 77: 1536-1546.
- **Bridges PJ, Brusie MA, Fortune JE.** 2005. Elevated temperatura (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. *Domest Anim Endocrinol.* 29: 508-522.
- **Brown Brandl, T.M.; Eigenberg, R.A.; Hahn, G.L.; Nienaber, J.A.; Mader, T.L.; Spiers, D.E.; & Parkhurst, A.M.** 2005. Analyses of thermoregulatory responses of feeder cattle exposed to simulated heat waves. *Int. J. Biometeorol.* 49(5): 285–296.
- **Murphy B.D.** 2018. La Reserva Folicular. Centro de Investigación en Reproducción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Montreal. <https://revistageneticabovina.com/reproduccion/la-reserva-folicular/>
- **Burkhart MN, Juengel JL, Smith PR, Heath DA, Perry GA, Smith M, Garverick HA.** 2010. Morphological development and characterization of aromatase and estrogen receptors alpha and beta in fetal ovaries of cattle from days 110 to 250. *Anim. Reprod. Sci.* 117:43-54.
- **Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Knight PG, Ireland JJ.** 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod.* 73:54-62.
- **Carroll JA, Forsberg NE.** 2007. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 23:105-149.

- **Carvalho MR, Aboujaoude C, Peñagaricano F, Santos JEP, DeVries TJ, McBride BW.** 2020. Associations between maternal characteristics and health, survival, and performance of dairy heifers from birth through first lactation. *J Dairy Sci* 2020;103:823e39. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17083>.
- **Coe CL, Kramer M, Czeh B, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C, Fuchs E.** 2003. Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys. *Biol Psychiatry* 54: 1025–1034.
- **Collier RJ, Renquist BJ, Xiao Y.A** 2017. 100-Year Review: Stress physiology including heat stress. *J Dairy Sci* 2017;100:10367–80. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13676>.
- **Coloma, W., Mehaba, N., Such, X., Salama, A.A.K., y Caja, G.** 2017. Efectos del Estrés Prenatal por Calor en la Reacción Emocional y Conductual de Cabritas durante la Cría. AIDA 201), XVII Jornadas sobre Producción Animal, 773-775
- **Dahl GE, Tao S, Laporta J.** 2017. Triennial lactation symposium/bolfa: Late gestation heat stress of dairy cattle programs dam and daughter milk production. *J Anim Sci* 2017;95:5701–10. <https://doi.org/10.2527/jas2017.2006>.
- **De Castro e Paula, L.A., Andrzejewski, D. Julian, L.J. Spicer and Hansen P.J.** 2008. Oxygen and steroid concentrations in preovulatory follicles of lactating dairy cows exposed to acute heat stress. *Theriogenology* 69(7): 805–813.
- **De Rensis F, Scaramuzzi RJ.** 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow- A review. *Theriogenology* 2003;60:1139–51. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00126-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00126-2).
- **Dhawal K, Maltecca C, Cassady JP, Baloch G, Williams CM, Washburn SP.** 2013. Calf birth weight, gestation length, calving ease, and neonatal calf mortality in Holstein, Jersey, and crossbred cows in a pasture system. *J Dairy Sci* 2013;96:690–8. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5817>.
- **Díaz PU, Stangaferro ML, Gareis NC, Silvia WJ, Matiller V, Salvetti NR, Rey F, Barberis F, Cattaneo L y Ortega HH** 2015. Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: An experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology* 84 1149–1160.
- **Dieleman S, Bevers M, Poortman J, Van Tol H.** 1983. Steroid and pituitary hormone concentrations in the fluid of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH in the peripheral blood. *J Reprod Fertil*; 69: 641–649.17

- **Do Amaral BC, Connor EE, Tao S, Hayen J, Bubolz J, Dahl GE.** 2009. Heat-stress abatement during the dry period: Does cooling improve transition into lactation? *J Dairy Sci* 2009;92:5988–99. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2343>.
- **Dohoo IR, Martin W, Stryhn H.** 2009. Model-Building Strategies. In: McPike M, editor. *Vet. Epidemiol. Res.* 2nd ed., Canada: Inc; p. 317–32.
- **Dohoo IR, Ducrot C, Fourichon C, Donald A, Hurnik D.**1997. An overview of techniques for dealing with large numbers of independent variables in epidemiologic studies. *Prev Vet Med* ;29:221–39. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(96\)01074-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(96)01074-4).
- **Erickson BH.** 1966a. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J Reprod Fertil* 11, 97–105.
- **Erickson BH.** 1966b. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci* 25, 800–805.
- **Evans ACO, Mossa F, Walsh SW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Ireland JJ.** 2012. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod Dom Anim* 47:31-37.
- **Evans AC, Mossa F, Fair T, Lonergan P, Butler ST, Zielak-Steciwo AE, Smith GW, Jimenez-Krassel F, Folger J, Ireland JL, Ireland JJ.** 2010. Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. Pages 421-429 in *Reproduction in Domestic Ruminants VII. Soc. Reprod. Fertil., Vol. 67.* Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom.
- **Forero, L.** 2004. Conceptos sobre metritis bovina: un problema poco considerado en la ganadería actual. Sitio Argentino de Producción Animal [http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/enfermedades\\_reproduccion/05-conceptos\\_metritis\\_bovina.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/05-conceptos_metritis_bovina.pdf)
- **Fortune JE, Yang MY, Allen JJ, Herrick SL.** 2013. Triennial Reproduction Symposium: the ovarian follicular reserve in cattle: what regulates its formation and size. *J Anim Sci.* 2013 91:3041-50.
- **Gabory A, Attig L, Junien C.** 2011. Developmental programming and epigenetics. *Am J Clin Nutr* 94:1943S–1952S.
- **Gallardo M, Valtorta S.** 2011. Estrés por calor en ganado lechero: impactos y mitigación. *Producción y bienestar animal. Hemisferio Sur.* 124 p.
- **García Robles R, Ayala Ramírez PA, Perdomo Velásquez B, Sandra P.** 2012 *Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución*

humana Revista Ciencias de la Salud, vol. 10, núm. 1, pp. 59-71 Universidad del Rosario Bogotá, Colombia.

- **Garnero O y Perusia O** 2002. Círugía de cabeza, cuello y torax. Aparato reproductor de la hembra. En: Garnero O, Perusia O, Manual de anestésias y cirugías del bovino. 3ra edición. Editorial Imprenta San Cayetano, Santa Fe. 31: 59-76
- **Gluckman PD, Hanson MA, Bateson P.** 2009. Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease. *Lancet*. 373:1654–7.
- **Grandin T.** 1997. Assessment of stress during handling and transport. *J Anim Sci*. 75: 249–257.
- **Hahn GL, TL Mader, RA Eigenberg.** 2003. Perspectives on development of thermal indices for animal studies and management. Proc Symp Interactions between climate and animal production, EAAP Technical series N° 7, Pp 31-44.
- **Hahn, G.L.; Gaughan, J.B.; Mader, T.L.; & Eigenberg, R.A.** 2009. Chapter 5: Thermal indices and their applications for livestock environments. En: De Shazer, J. A. Livestock energetics and thermal environmental management. American Society of Agricultural and Biological Engineers. St. Joseph (USA). pp.113–130.
- **Hahn, G.L.; Mader, T.L.; Gaughan, J.B.; Hu, Q.S.; & Nienaber, J.A.** 1999. Heat waves and their impacts on feedlot cattle. En: Proc. 15th Intl. Cong. of Biomet. and Intl. Cong. Urban Climatology. Sydney (Australia).
- **Hansen, K. R., G. M. Hodnett, N. Knowlton, and L. B. Craig.** 2011. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertil. Steril*. 95:170-175.
- **Hansen, P.J.** 2005. Managing the heat-stressed cow to improve reproduction. p. 9–11. In Proceedings of the 7th Western Dairy Management Conference. Marzo.
- **Hatler TB, Hayes SH, Ray DL, Reames PS y Silvia WJ** 2008. Effect of subluteal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows. *The Veterinary Journal* 177 360–368.
- **Hausmann MF, Carroll JA, Weesner GD, Daniels MJ, Matteri RL, Lay DC Jr.** 2000. Administration of ACTH to restrained, pregnant sows alters their pigs' hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J Anim Sci* 78, 2399–2411.
- **Heim Jr., R.R.** 2015. An overview of weather and climate extremes – Products and trends. *Weather Clim. Extrem.* 10, Part B: 1–9.
- **Holliday R.** 2002. Epigenetics comes of age in the twenty first century. *Journal of Genetics* 81: 1-4. In Proceedings of the 7th Western Dairy Management Conference.

- **Hunter MG, Robinson RS, Mann GE, Webb R.** 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim Reprod Sci.* 82-83:461-77.
- **Ireland J, Smith GWB, Scheetz DA y Folger JKA** 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve. *Reproduction, Fertility and Development* 23 1–14.
- **Ireland JJ, Zielak AE, Jimenez-Krassel F, Folger J, Bettgowda A, Scheetz D, Walsh S, Mossa F, Knight PG, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO.** 2009. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biol Reprod* 80, 954–964.
- **Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen AP, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans AC, Ireland JJ.** 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod* 79, 1219–1225.
- **Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO.** 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod* 22, 1687–1695.
- **Jenuwei T.** 2015. Epigenética <http://epigenome.eu/es/1,1,0.html>
- **Jenuwein T.** 2006. The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J.* 273:3121–35
- **Johanson JM, Berger PJ.** 2003. Birth weight as a predictor of calving ease and perinatal mortality in Holstein cattle. *J Dairy Sci* 2003;86:3745–55. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73981-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73981-2).
- **Kamal MM, Van Eetvelde M, Depreester E, Hostens M, Vandaele L, Opsomer G.** 2014. Age at calving in heifers and level of milk production during gestation in cows are associated with the birth size of Holstein calves. *J Dairy Sci* 2014;97:5448e58. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7898>
- **Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG.** 2006. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol.* 572:31-44.

- **La Marca A, Volpe A**, 2006. Anti-Mullerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool. *Clin Endocrinol* 64: 603–610.
- **Lavon Y, Leitner G, Klipper E, Moallem U, Meidan R, Wolfenson D**. 2011. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. *Domest Anim Endocrinol*. 40:98–109.
- **Lavon Y, Leitner G, Voet H, Wolfenson D**. 2010. Naturally occurring mastitis effects on timing of ovulation, steroid and gonadotrophic hormone concentrations, and follicular and luteal growth in cows. *J Dairy Sci*. 93:911–21.
- **Lay DCJ, Randel RD, Friend TH, Carroll JA, Welsh THJ, Jenkins OC, Neuendorff DA, Bushong DM, Kapp GM**. 1997a. Effects of prenatal stress on the fetal calf. *Domest Anim Endocrinol* 14: 73–80.
- **Lay DCJ, Randel RD, Friend TH, Jenkins OC, Neuendorff DA, Bushong DM, Lanier EK & Bjorge MK**. 1997b. Effects of prenatal stress on suckling calves. *J Anim Sci* 75: 3143–3151.
- **LCI** 1970. Patterns of transit losses, Livestock Conservation Inc. Omaha (USA).
- **Lea RG, Andrade LP, Rae MT, Hannah LT, Kyle CE, Murray JF**. 2006. Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary. *Reproduction* 2006;131:113–24. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00844>.
- **Levine S**. 1957. Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats. *Science* 156: 258–260.
- **Levitt NS, Lambert EV, Woods D, Hales CN, Andrew R, Seckl JR**. 2000. Impaired glucose tolerance and elevated blood pressure in low birth weight, nonobese, young South African adults: early programming of cortisol axis. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4611–4618.
- **Linden TC, Bicalho RC, Nydam D V**. 2009. Calf birth weight and its association with calf and cow survivability, disease incidence, reproductive performance, and milk production. *J Dairy Sci* 2009;92:2580–8. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1603>.
- **Looper ML, Vizcarra, JA, Wettemann RP, Malayer JR, Braden, TD, Geisert RD y Morgan, GL**. 2003. Influence of estradiol, progesterone, and nutrition on concentrations of gonadotropins and GnRH receptors, and abundance of mRNA for GnRH receptors and gonadotropin subunits in pituitary glands of beef cows. *J Anim Sci* 81:269-278.

- **Mackey DR, Wylie AR, Sreenan JM, Roche JF, Diskin MG.** 2000. The effect of acute nutritional change on follicle wave turnover, gonadotropin, and steroid concentration in beef heifers. *J Anim Sci* 78: 429–442.
- **Magdub A, Johnson HD, Belyea RL.** 1982. Effect of environmental heat and dietary fiber on thyroid physiology of lactating cows. *J Dairy Sci* 1982;65:2323e31. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82504-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82504-6).
- **McAllister EJ, Dhurandhar NV, Keith SW.** 2009. Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 49: 868–913.
- **Melo, O.** 2004. Análisis crítico de la ganadería bovina argentina, 8ª Jornada El Negocio de la Carne, INTA Centro Regional Córdoba, E.E.A. Manfredi, Córdoba.
- **Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C.** 2014. The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles: What Is the Link?1. *Biol Reprod* 2014;90:1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.117077>.
- **Monteiro APA, Guo JR, Weng XS, Ahmed BM, Hayen MJ, Dahl GE.** 2016. Effect of maternal heat stress during the dry period on growth and metabolism of calves. *J Dairy Sci* 2016a;99:3896–907. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10699>.
- **Monteiro APA, Tao S, Thompson IMT, Dahl GE.** 2016. In utero heat stress decreases calf survival and performance through the first lactation. *J Dairy Sci* 2016b;99:8443–50. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11072>.
- **Morgan DK, Whitelaw E.** 2008. The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Mamm. Genome.* 2008; 19 (6):394-7.
- **Mossa F, Carter F, Walsh SW, Kenny DA, Smith GW, Ireland JLH.** 2013. Maternal Undernutrition in Cows Impairs Ovarian and Cardiovascular Systems in Their Offspring1. *Biol Reprod* 2013;88:1–9.
- **Mossa FS, Walsh W, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ, Evans AC.** 2012. Low numbers of ovarian follicles  $\geq 3$  mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J Dairy Sci.* 95:2355-2361.
- **Murphy B.** 2018. La reserva folicular. Centro de Investigación en Reproducción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Montreal. <https://revistageneticabovina.com/reproduccion/la-reserva-folicular/>
- **Nilsson, E and Skinner, M.** 2009. Progesterone regulation of primordial follicle assembly in bovine fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol.* 10,313(1-2).

- **OCLA.** 2018. Observatorio de la Cadena Láctea Argentina. 2018. <http://www.ocla.org.ar/contents/news/details/12486474-informacion-de-la-produccion-primaria>
- **Ouellet J, Laporta J, Dahl GE.** 2020. Late gestation heat stress in dairy cows: Effects on dam and daughter. *Theriogenology* 150 (2020) 471e479
- **Phillips DI, Bennett FI, Wilks R, Thame M, Boyne M, Osmond C, Forrester TE.** 2005. Maternal body composition, offspring blood pressure and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Paediatr Perinat Epidemiol* 19: 294–302.
- **Prieto, P.** 2015. Programación fetal en bovinos. Impacto sobre caracteres
- **Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G.** 2009. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:192–206.
- **Rae MT, Palassio S, Kyle CE, Brooks AN, Lea RG, Miller DW.** 2001. Effect of maternal undernutrition during pregnancy on early ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. *Reproduction* 2001;122:915–22.
- **Rhind SM, Rae MT, Brooks AN.** 2001. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 2001;122:205–14.
- **Rich Erdman** 2016. Regulación Epigenética de la Producción en Vacas Lecheras. Animal and Avian Sciences Department. University of Maryland. <https://ganaderiasos.com/wp-content/uploads/2016/04/regulacion-epigenetica-de-la-produccion-en-vacas-lecheras.pdf>
- **Rich Erdman** 2013. Regulación Epigenética de la Producción en Vacas Lecheras. Animal and Avian Sciences Department. University of Maryland. <https://ganaderiasos.com/wp-content/uploads/2016/04/regulacion-epigenetica-de-la-produccion-en-vacas-lecheras.pdf>
- **Roth Z y Wolfenson D.** 2016. Comparing the effects of heat stress and mastitis on ovarian function in lactating cows: basic and applied aspects. *Dom Anim Endocrinol.* 56: S218-S227.
- **Roth Z, Arav A, Bor A, Zeron Y, Braw-Tal R, Wolfenson D.** 2001. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* 122:737–744.
- **Roussel S, Boissy A, Montigny D, Hemsworth PH, Duvaux-Ponter C.** 2005. Gender-specific effects of prenatal stress on emotional reactivity and stress physiology of goat kids. *Horm Behav* 47: 256–266.

- **Russe I.** 1983. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl. Anat.* 24:77-92.
- **Sakatani, M., N.V. Alvarez, M. Takahashi, y P.J. Hansen.** 2012. Consequences of physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response genes in cattle. *J. Dairy Sci.* 95(6): 3080–3091.
- **Schneider, G; Comeron, E.** 2002 El Tambo versus la agricultura: el país de los extremos. <http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/economia/>
- **SENASA.** 2019. Recomendaciones para prevenir el estrés calórico en el ganado bovino. <https://www.argentina.gob.ar/noticias/recomendaciones-para-prevenir-el-estres-calorico-en-el-ganado-bovino>
- **Singh K, Molenaar AJ, Swanson KM, Gudex B, Arias JA, Erdman RA, and Stelwagen K.** 2012. Epigenetics: a possible role in acute and transgenerational regulation of dairy cow milk production. *Animal.* 6:375–381.
- **Smith, M. F.** 1986. Recent advances in corpus luteum physiology. *J Dairy Sci.* 69 (3):911-926.
- **Smitz JE, Cortvrindt RG.** 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* 123: 185–202.
- **Stott GH.** 1981. What is animal stress and how is it measured? *J Anim Sci* 52, 150-153.
- **St-Pierre, N.R.; Cobanov, B.; & Schnitkey, G.** 2003. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *J. Anim. Sci.* 86(31): E52–E77.
- **Svennersten-Sjaunja K, Olsson K.** 2005. Endocrinology of milk production. *Domest Anim Endocrinol* 2005;29:24158. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.03.006>.
- **Tao S, Dahl GE, Laporta J, Bernard JK, Orellana Rivas RM, Marins TN.** 2019. Physiology Symposium: Effects of heat stress during late gestation on the dam and its calf. *J Anim Sci* 2019;97:2245–57. <https://doi.org/10.1093/jas/skz061>.
- **Tao S, Monteiro APA, Hayen MJ, Dahl GE.** 2014. Short communication: maternal heat stress during the dry period alters postnatal whole-body insulin response of calves. *J Dairy Sci* 2014;97:897e901. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7323>.
- **Tenhagen BA, Helmbold A, Heuwieser W.** 2007. Effect of various degrees of dystocia in dairy cattle on calf viability, milk production, fertility and culling. *J Vet Med Ser A Physiol Pathol Clin Med* 2007;54:98–102. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2007.00850.x>.
- **Thom EC.** 1959. The discomfort index. *Weatherwise* 12, 57-59.

- **Valtorta, SE. y. Leva PE.**1998. Respuestas del animal al ambiente. Capítulo 2 en: Producción de leche en verano. Centro de publicaciones de la Secretaría de Extensión de la UNLitoral. Santa Fe, Argentina.
- **Van Eetvelde M, Kamal MM, Vandaele L, Opsomer G.** 2017. Season of birth is associated with first-lactation milk yield in Holstein Friesian cattle. *Animal* 2017;11:2252e9. <https://doi.org/10.1017/S1751731117001021>.
- **Vásquez–Cano, J; Olivera M.** 2010 . Cellular Signaling in the Bovine Antral Follicles. *Orinoquia* 14 (2): 178-187.2010
- **Viltart O, Vanbesien-Mailliot CC.** 2007. Impact of prenatal stress on neuroendocrine programming. *ScientificWorldJournal*. 2007 Sep 1;7:1493-537. doi: 10.1100/tsw.2007.204. PMID: 17767365; PMCID: PMC5901338.
- **Walsh SW, Mehta JP, McGettigan PA, Browne JA, Forde N, Alibrahim RM, Mulligan FJ, Loftus B, Crowe MA, Matthews D, Diskin M, Mihm M, Evans AC.** 2012. Effect of the metabolic environment at key stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis. *Physiol Genomics*. 44: 504–517.
- **Wang J, Li J, Wang F, Xiao J, Wang Y, Yang H.** 2020. Heat stress on calves and heifers: a review. *J Anim Sci Biotechnol* 2020;11:1e8. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00485-8>
- **Ward AM, Moore V, Steptoe A, Cockington R, Robinson JS, Phillips DIW.** 2004a. Size at birth and cortisol responses to psychological stress: evidence for fetal programming. *J Hypertens* 122: 2295–2301.
- **Ward AM, Syddall HE, Wood PJ, Chrousos GP, Phillips DI.** 2004b. Fetal programming of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis: low birth weight and central HPA regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1227–1233.
- **Weller MMDCA, Fortes MRS, Marcondes MI, Rotta PP, Gionbeli TRS, Valadares Filho SC.**2016. Effect of maternal nutrition and days of gestation on pituitary gland and gonadal gene expression in cattle. *J Dairy Sci* 2016;99:3056–71. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9673>.
- **West, J.W.** 2003. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 86(6): 2131–2144.
- **Wilson SJ, Kirby CJ, Koenigsfeld AT, Keisler DH, Lucy MC.** 1998. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. *J Dairy Sci.* 1998 Aug;81(8):2132-8. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75789-3. PMID: 9749377.

- **Wilson SJ, Marion RS, Spain JN, Spiers DE, Keisler DH, Lucy MC.** 1998. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *J Dairy Sci.* 1998 Aug;81(8):2124-31. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75788-1. PMID: 9749376.
- **Wolfenson D, Inbar G, Roth Z, Kaim M, Bloch A, Braw-Tal R.** 2004. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology* 62: 1042–1055
- **Wolfenson D, Roth, Z., R. Meidan, R. Braw-Tal.** 2000. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J. Reprod. Fertil.* 120(1): 83–90.
- **Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y, Meidan R.** 1997. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim Reprod Sci.* 47:9–19.
- **Yang MY, Fortune JE.** 2008. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol. Reprod.* 78:1153-1161.