

Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras

Effect of heat stress on embryo production in superovulated cows and on the pregnancy rate in recipient cows

Renato Raúl Lozano-Domínguez^a, Marco Antonio Asprón-Pelayo^b, Carlos Gustavo Vásquez-Peláez^b, Everardo González-Padilla^c, Carlos Fernando Aréchiga-Flores^d

RESUMEN

Los objetivos fueron determinar el efecto de interacción del estrés calórico de la época de producción del embrión y la de transferencia sobre la tasa de gestación de vacas receptoras, y evaluar si existe efecto del estrés calórico sobre la producción y calidad embrionaria en vacas superovuladas. Vacas lactantes de la raza Holstein fueron superovuladas en la época templada (n=20) y cálida (n=22). Los embriones fueron colectados, congelados y transferidos a vacas Holstein lactantes durante la época templada (n=54) y cálida (n=53). La respuesta superovulatoria (85.1 %) y la tasa de fertilización (76.2 %) fueron similares en ambas épocas ($P > 0.05$). En la época templada, el número de óvulos y embriones (10.6), y embriones transferibles (7.4) colectados por vaca fueron superiores a los observados en la época cálida (6.1 y 4.4, respectivamente) ($P < 0.05$). La tasa de gestación de las vacas receptoras fue más alta durante la época templada cuando éstas recibieron un embrión producido en condiciones templadas (45.0 %), que en aquéllas que recibieron un embrión de época cálida (21.5 %, $P < 0.05$). Independientemente de la época de producción del embrión, la tasa de gestación de las vacas receptoras fue menor durante la época cálida (13.9 %) que en la templada (33.2 %, $P < 0.05$). El estrés calórico compromete la producción embrionaria y la competencia del embrión para el establecimiento de la gestación, y se mostró un efecto materno durante la época cálida, que impacta negativamente la sobrevivencia del embrión después de la transferencia.

PALABRAS CLAVE: Vacas lecheras, Estrés calórico, Transferencia embrionaria, Tasa de gestación.

ABSTRACT

Objectives were determine the interaction effect of heat stress from embryo production season and embryo transfer season on pregnancy rates of recipient lactating cows, and evaluate effects of heat stress on embryo production and quality from superovulated cows. Lactating Holstein cows were superovulated during temperate (n=20) and warm (n=22) seasons. Embryos were collected, frozen and transferred into recipient lactating Holstein cows during temperate (n=54) and warm (n=53) seasons. Superovulatory response (85.1 %) and fertilization rates were similar (76.2 %) for both seasons ($P > 0.05$). The number of oocytes and embryos (10.6), and transferable embryos (7.4) collected per cow during the temperate season were superior to the warm season (6.1 and 4.4 respectively, $P < 0.05$). Pregnancy rates of recipient cows were higher during temperate season when they received an embryo produced during temperate season (45.0 %), than when they received an embryo produced during warm season (21.5 %, $P < 0.05$). Regardless of embryo collection season, pregnancy rates of recipient cows during the warm season were lower (13.9 %) than ones observed in recipient cows during the temperate season (33.2 %, $P < 0.05$). Heat stress compromised embryo yield and embryo competence for establishment of pregnancy, and reduced the ability of recipient cows to become pregnant after transfer.

KEY WORDS: Dairy cow, Heat stress, Embryo transfer, Pregnancy rate.

Recibido el 9 de octubre de 2009. Aceptado para su publicación el 3 de marzo de 2010.

^a Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Pabellón, km. 32.5 Carretera Aguascalientes-Zacatecas. Rincón de Romos, Aguascalientes, México. renato_lozano@hotmail.com. Correspondencia al primer autor.

^b Universidad Nacional Autónoma de México.

^c Coordinación General de Ganadería. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Recursos Naturales, Pesca y Alimentación.

^d Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas.

INTRODUCCIÓN

En estudios *in vivo*⁽¹⁾ e *in vitro*⁽²⁻⁵⁾ se ha observado que el estrés calórico compromete la competencia del ovocito para ser fertilizado⁽¹⁾ y el desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocisto^(3,4,5). Se ha descrito que la susceptibilidad del embrión al estrés calórico se da en los primeros tres días de edad⁽⁶⁾; y que los embriones desarrollados *in vitro* son más resistentes a este efecto cuando presentan un desarrollo de 4 a 8 células^(7,8,9).

La transferencia embrionaria se ha visto como una alternativa para incrementar la tasa de gestación de las vacas lecheras en épocas cálidas. Varios estudios realizados en vacas receptoras de embriones frescos producidos *in vitro*^(10,11) o de embriones recolectados de vacas superovuladas^(12,13,14) han informado una mejora de la tasa de gestación en condiciones de estrés calórico, comparada con la observada en vacas servidas con inseminación artificial.

Existen pocas investigaciones diseñadas para determinar un efecto de interacción del estrés calórico de la época de producción del embrión y la época de transferencia sobre la tasa de gestación de vacas receptoras lactantes. En algunos estudios realizados durante el verano no se observó mejora de la tasa de gestación de vacas receptoras de embriones producidos en condiciones de confort térmico^(13,15) e incluso se mostró una reducción de este parámetro⁽¹⁶⁾.

Los objetivos del estudio fueron determinar en vacas Holstein lactantes durante su pico de lactancia, el efecto de interacción del estrés calórico de la época de producción del embrión y la de transferencia sobre la tasa de gestación de vacas receptoras, y evaluar si existe efecto del estrés calórico sobre la producción y calidad embrionaria en vacas superovuladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en dos explotaciones comerciales de ganado lechero del altiplano central de México (Aguascalientes, México; 22° 05' N y

INTRODUCTION

In vivo⁽¹⁾ and *in vitro* studies⁽²⁻⁵⁾ have reported effects of heat stress compromising oocyte competence to be fertilized⁽¹⁾ and/or embryonic development to the blastocyst stage^(3,4,5). Embryonic susceptibility to heat stress decreases in day 3-embryos⁽⁶⁾; and embryos become more resistant to the adverse effects of heat shock in culture as they developed to the 4 to 8-cell stage of development^(7,8,9).

Embryo transfer has been considered as a alternative for increasing the pregnancy rate in dairy cows in warm season. Several studies using recipient cows exposed to heat stress have shown improvements on pregnancy rates in response to embryo transfer of fresh *in vitro*-derived embryos^(10,11) or fresh *in vivo* collected embryos^(12,13,14) compared to cows artificially inseminated.

There are not enough studies designed to determine an interaction of effect of heat stress during the time of embryo production and the time of embryo transfer on pregnancy rate of recipient cows. Some studies using recipient cows during the summer did not observe an increase in pregnancy rates^(13,15) and include was observed a reduction of this parameter⁽¹⁶⁾.

Objectives of the present study were to determine in lactating Holstein cows during their lactation peak, the interaction effect of heat stress from embryo production season and embryo transfer season on pregnancy rates of recipient cows, and assessing heat stress on embryo production and quality in super ovulated cows.

MATERIALS AND METHODS

Experiments were performed in two commercial dairy herds of central México (Aguascalientes, Mexico; 22° 05' N and 102° 16' W). A local weather station was located between both dairy herds at a 5 km distance.

Feed was provided six times a day as a total mixed ration (TMR) using a 35:65 forage: concentrate ratio based on corn silage, green rye grass and

102° 16' O). La estación climática estuvo localizada entre ambos hatos lecheros a una distancia de 5 km, en el municipio de San Francisco de los Romo, Aguascalientes.

La alimentación se proporcionó seis veces al día en forma de ración integral. La relación forraje: concentrado fue de 35:65. La composición de la dieta contenía en base seca: 1.79 Mcal/kg de energía neta de lactancia; 17.7 % de proteína cruda, de la que el 37 % fue no degradable; 19.6 % de fibra detergente ácido; 35 % de fibra detergente neutro; 7.1 % de grasa y 31 % de carbohidratos no estructurales. Las vacas tuvieron libre acceso al agua y a una mezcla de sales minerales.

La superovulación y la colección embrionaria fueron realizadas en dos épocas: 1) Templada, los tratamientos superovulatorios iniciaron el 5 de febrero (n= 10) y el 12 de marzo (n= 10) y la colección embrionaria se realizó el 17 de febrero y el 24 de marzo, respectivamente; 2) Cálida, los tratamientos superovulatorios iniciaron el 21 de mayo (n= 10) y el 2 de julio (n= 12), y la colección embrionaria se realizó el 2 de junio y el 14 de julio, respectivamente.

Colección embrionaria

Se utilizaron 42 vacas lactantes Holstein clínicamente sanas de dos hatos comerciales de producción de leche, las cuales se ordeñaron tres veces al día sin recibir durante el período de estudio somatotropina bovina. Al inicio del estudio, de las vacas donadoras se registraron el número de partos, los días en leche la producción de leche estimada a 305 días (P305), la condición en una escala de 1 a 5⁽¹⁷⁾ y el peso corporal en ambas épocas de superovulación y colección embrionaria.

En cada época de colección embrionaria se registró la temperatura ambiente (°C) y la humedad relativa (HR) en una estación climática local. La temperatura registrada en °C se transformó a grados Fahrenheit (°F). Se calculó el índice temperatura-humedad (THI) utilizando la temperatura máxima y la humedad relativa promedio⁽¹⁸⁾, con la siguiente ecuación:

alfalfa hay; concentrate was a commercial mixture containing: cottonseed, wet brewer's grains, undegradable protein (Soybestâ, Grain Staples Inc.) and rumen bypass fat (Megalacâ, Rumen Bypass Fat, Arm & Hammer Animal Nutrition Group). Diet composition on a dry matter basis was: 1.79 Mcal / Kg net energy for lactation; 17.7% crude protein (of which 37 % was non-degradable), 19.6% acid detergent fiber; 35% neutral detergent fiber; 7.1% fat and 31% non-structural carbohydrates. Cows had free access to water and mineral salts.

Superovulation and embryo collection were performed during two seasons: 1. Temperate, superovulatory treatments were initiated on February 5 (n= 10) or March 12 (n= 10) and embryo collections were performed on February 17 and March 24, respectively; 2. Warm, superovulatory treatments were initiated on May 21 (n= 10) and July 2 (n= 12), and embryo collections were performed on June 2 and July 14, respectively.

Embryo collection

Clinically-healthy lactating Holstein cows (n= 42) from two commercial herds were included in this study. Cows were milked (3x) and not bovine somatotropin (bST) treated. Calving number, days in milk (DIM), 305-d predicted milk yield (P305), body condition score (BCS) on 1 to 5 scale⁽¹⁷⁾ and body weight (BW) at the beginning of the study were recorded for each embryo donor cow in both embryo collection season.

For each embryo collection season, maximum ambient temperature (°F) and relative humidity average (RH) were recorded at a local research weather station. Temperature-humidity index was calculated (THI)⁽¹⁸⁾, through the following equation:

$$THI = °F - [(0.55 - ((RH/100) \times 0.55)) * (°F - 58)]$$

Average ambient temperature (29.5 ± 0.4 °C), relative humidity (52.9 ± 3.5 %) and THI (78.0 ± 0.3) were all higher ($P < 0.01$) in the warm season than in the temperate (25.6 ± 0.3, 33.1 ± 3.4 and 70.5 ± 0.3, respectively) (Table 1).

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

En el Cuadro 1, se observa que los valores medios de temperatura ambiente (29.5 ± 0.4 °C), humedad relativa (52.9 ± 3.5) y THI (78.0 ± 0.3) de la época cálida fueron superiores ($P < 0.01$) a los observados en la templada (25.6 ± 0.3 , 33.1 ± 3.4 y 70.5 ± 0.3 , respectivamente)

El tratamiento superovulatorio inició entre 9 y 11 días después del estro con un total de 400 mg de hormona folículo estimulante (Folltropin-V, Vetrepharm, Inc.) del mismo lote de producción por vía im cada 12 h durante cuatro días usando dosis decrecientes⁽¹⁹⁾. Al tercer día del tratamiento se administraron por vía im 50 mg prostaglandina F_{2α} (Lutalyse, Pharmacia & Upjohn, Inc.) fraccionadas en dos aplicaciones, una por la mañana y otra por la tarde. La detección del estro se realizó en forma continua con el apoyo de detectores de monta que se activaban a la presión (Kamar Heatmount® Detector, Kamar Inc.). La inseminación artificial se realizó a las 12 y 24 h de detectada la primera monta homosexual.

Siete días después de la inseminación artificial, se realizó un examen genital y se determinó el número de cuerpos lúteos presentes en ambos ovarios. Los embriones fueron recuperados del útero en forma no quirúrgica mediante lavados con una solución salina

Superovulatory treatment initiated 9 to 11 d after estrus. A total of 400 mg of follicle stimulating hormone (Folltropin-V, Vetrepharm, Inc., London, Ontario, Canada) from the same lot was administered, im, every 12 h during 4 d using decreasing doses as described elsewhere⁽¹⁹⁾. At d 3 of superovulatory treatment, 50 mg prostaglandin F_{2α} (Lutalyse, Pharmacia & Upjohn, Inc.) were administered i.m. (am-pm). Estrus detection was performed continuously with the aid of detection devices mounted on the tailhead (Kamar Heatmount® Detector, Kamar Inc.). Artificial insemination using a single straw of frozen semen was performed at 12 and 24 h after detection of estrus.

At d 7 after AI, ovarian transrectal palpation was performed to determine number of corpora lutea. Embryos were obtained non-surgically from the uterus by flushing with phosphate-buffered saline supplemented with 0.4% (wt/vol) bovine serum albumin using a two-way Foley catheter (Unomedical, Bakar Arang Industrial). Embryo collection was performed by a single qualified professional. Washing effluent from uterine horns was passed through a 75 μm filter (Embryo Miniflush™ System). The filter was washed and decanted into a 100 x 100 μm grid Petri dish (Falcon Inc., USA) for searching embryos and oocytes were recovered using a 12x stereoscopic microscope.

Cuadro 1. Temperatura ambiente, humedad relativa e índice temperatura – humedad (THI) registrados en dos épocas de colección embrionaria

Table 1. Ambient temperature, relative humidity and temperature – humidity index (THI) recorded in two embryo collection seasons

Climatic variable	Temperate season		Warm season	
	LSM ± SEM	Range	LSM ± SEM	Range
Maximum temperature, °C	25.6 ± 0.35 ^a	23.2 - 28.1	29.5 ± 0.36 ^b	26.4 - 32.7
Minimum temperature, °C	5.7 ± 0.47 ^a	1.3 - 8.0	12.4 ± 0.48 ^b	7.8 - 16.4
Relative humidity, %	33.1 ± 3.40 ^a	13.7 - 56.2	52.7 ± 0.49 ^b	30.5 - 70.2
THI	70.5 ± 0.30 ^a	68.7 - 72.4	78.0 ± 0.30 ^b	75.9 - 81.6

Temperate (February 9 - 17/ 2001 and March 12 - 24/ 2001) and Warm (May 21 - June 2 / 2001 and July 2 - 14 / 2001). LSM=least-squares means ± standard error of the means (SEM).

^{ab} Subscripts that differ within a row represent differences ($P < 0.01$).

amortiguada con fosfatos (SSF) y suplementada con 0.4% de albúmina sérica bovina, usando una sonda Foley de dos vías (Unomedical, Bakar Arang Industrial). La colección embrionaria se realizó por un solo profesional calificado. El efluente del lavado de los cuernos uterinos pasó a través de un filtro de 75 μM (Embryo Miniflush™ System). El filtro fue lavado y decantado a una caja de Petri cuadrada 100 x 100 mm (Falcon Inc.) para la búsqueda de los embriones y óvulos, con la ayuda de un microscopio estereoscópico con 12 aumentos.

Los embriones recolectados se evaluaron conforme a lo descrito en el Manual de Procedimientos de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones⁽²⁰⁾, de acuerdo a su estadio de desarrollo y calidad. Se congelaron exclusivamente embriones del estadio de blastocisto de calidad excelente o buena con el crioprotector ethylene glycol (AB Technology Inc.). Los embriones se equilibraron en SSF con 1.5 M de ethylene glycol por un período máximo de 5 min, tiempo en el cual los embriones fueron empajillados. Las pajillas con los embriones fueron colocadas en una congeladora manual previamente enfriada a $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de un minuto se indujo la cristalización; posteriormente la temperatura se llevó hasta $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una tasa de $-0.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sumergiéndose después las pajillas en nitrógeno líquido.

Los embriones producidos y congelados ($n=107$) durante la época templada (PT) y cálida (PC); de calidad excelente ($n=66$) y buena ($n=41$) fueron distribuidos al azar, dentro del mismo hato a dos épocas de transferencia (T): 1) Templada (TT), del 15 de enero al 27 de marzo; 2) Cálida (TC), del 1 de mayo al 17 de agosto. De esta forma se formaron los siguientes grupos experimentales: producción templada – transferencia templada (PT-TT); producción templada – transferencia cálida (PT-TC); producción cálida – transferencia templada (PC-TT); y producción cálida – transferencia cálida (PC-TC).

Transferencia de embriones

Como receptoras se utilizaron 107 vacas Holstein lactantes con tres ordeños al día sin recibir durante el período de estudio somatotropina bovina. El día

Collected embryos were evaluated according to procedures of the Manual of the International Embryo Transfer Society with set in the Manual of the International Embryo Transfer Society⁽²⁰⁾, in accordance with their development stage and quality. Only those embryos of excellent or good quality at the blastula stage were frozen with ethylene glycol as cryoprotectant (AB Technology Inc.). Embryos were balanced in phosphate buffer solution with 1.5 M of ethylene glycol for a maximum period of 5 min, when embryos were placed into 0.25 ml straws. Straws with embryos were placed in a manual freezer that was previously cooled to $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$. After 1 min, crystallization was induced; afterwards, the temperature was lowered to $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a rate of $-0.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and straws were then submerged in liquid nitrogen.

Embryos collected and frozen during the temperate (TC) and warm (WC) seasons ($n=107$) of excellent ($n=66$) and good ($n=41$) qualities were distributed at random in the same herds in two embryo transfer seasons (T): Temperate (TT), from the January 15 to March 27; and Warm (WT), from May 1 to August 17. Therefore, experimental groups were: Temperate Collection-Temperate Transfer (TC-TT); Temperate Collection-Warm Transfer (TC-WT); Warm Collection-Temperate Transfer (WC-TT); and Warm Collection-Warm Transfer (WC-WT).

Embryo transfer

Clinically-healthy lactating Holstein recipient cows were used ($n=107$). Cows were milked (3x) and not bST-treated. On the day of embryo transfer, calving number, DIM and BCS and BW were recorded for each cow, in both embryo transference season.

Maximum ambient temperature and relative humidity average were recorded in a local weather station. Average maximum temperature ($28.2 \pm 0.3\text{ }^{\circ}\text{C}$), relative humidity ($58.7 \pm 1.4\%$) and THI (76.5 ± 0.5) recorded in the warm season were higher than those recorded in the temperate season ($24.5 \pm 0.3\text{ }^{\circ}\text{C}$, $45.5 \pm 1.7\%$ and 70.1 ± 0.5 , respectively) ($P < 0.01$) (Table 2).

Embryo transfer was performed on d 7 after estrus. Embryos were thawed at ambient temperature

de la transferencia se registraron de las vacas receptoras el número de partos, los días en leche, la condición y el peso corporal y la P305 en ambas épocas de transferencia.

La temperatura y la humedad del ambiente se registraron en una estación climática local. Los valores medios de temperatura máxima (28.2 ± 0.3), humedad relativa (58.7 ± 1.4) y THI (76.5 ± 0.5) registrados en la época cálida fueron superiores a los observados en la época templada (24.5 ± 0.3 ; 45.5 ± 1.7 y 70.1 ± 0.5 , respectivamente) ($P < 0.01$) (Cuadro 2).

La transferencia embrionaria se realizó al séptimo día después del estro. Los embriones se descongelaron a temperatura ambiente por 10 seg seguida de la inmersión en agua a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 seg^(13,21). Los embriones fueron transferidos en forma no quirúrgica y se depositaron en el tercio anterior del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo. En cada evento de transferencia se registró el tiempo transcurrido (min) desde el momento de la descongelación hasta la finalización de la transferencia. Posteriormente, las vacas receptoras se observaron dos veces al día para la detección del estro hasta que se realizó el diagnóstico de gestación por palpación rectal entre 40 a 45 días de edad del embrión.

El día de la transferencia del embrión se obtuvo una muestra sanguínea de las vacas receptoras en

for 10 sec, followed by immersion water at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 12 sec^(13,21). Embryo were transferred by non-surgically methods and placed in the anterior third of the uterine horn ipsilateral to corpus luteum. For each transfer event, timed elapsed (minuts) between thawing and end of transfer was recorded. Afterward, estrus was evaluated twice daily for estrus detection up the moment of pregnancy diagnosis carried out by rectal palpation between 40 to 50 d of embryo age.

Blood samples were obtained at the time of embryo transfer into a Vacutainer® tube without heparin (Tyco Healthcare Group LP) maintained at $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the next day for centrifugation at 700 xg for 10 min. Serum was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for radioimmunoassay to determine progesterone levels (Coat-A-Count Progesterone, Diagnostic Products Corporation). Assay sensitivity was 0.1 ng/ml with an intra-and inter-assay variation of 3.7 % and 5.8 % at 0.49 ng/ml; and 5.6 % and 6.1 % at 20 ng/ml, respectively.

Assessed variables

The evaluated variables were the following: percentage of cows that responded to superovulation treatment; number of corpora lutea at the time of embryo collection; fertilization rate (number of embryo divided by the number of embryos plus oocytes); number of embryos plus oocytes, number

Cuadro 2. Temperatura ambiente, humedad relativa e índice temperatura - humedad (THI) registrados durante las épocas de transferencia embrionaria

Table 2. Ambient temperature, relative humidity and temperature – humidity index (THI) recorded in two embryo transfer seasons

Climatic variable	Temperate season		Warm season	
	LSM \pm SEM	Range	LSM \pm SEM	Range
Maximum temperature, $^{\circ}\text{C}$	24.5 ± 0.37 ^a	9.6 to 30.9	28.2 ± 0.30 ^b	22.3 to 34.5
Minimum temperature, $^{\circ}\text{C}$	5.1 ± 0.24 ^a	-2.4 to 10.8	13.9 ± 0.19 ^b	9.8 to 17.8
Relative humidity, %	45.5 ± 1.78 ^a	23.7 to 88.3	58.7 ± 1.45 ^b	22.1 to 88.5
THI	70.16 ± 0.50 ^a	50.2 to 74.7	76.54 ± 0.50 ^b	71.9 to 80.6

Temperate (January 15 – March 27 /2002) and Warm (May 1 – August 17 / 2002). LSM=least-squares means \pm standard error of the means (SEM).

^{ab} Subscripts that differ within a row represent statistical differences ($P < 0.01$).

un tubo Vacutainer sin heparina (Tyco Healthcare Group LP) y fue transportada al laboratorio en refrigeración a 5 °C. Al día siguiente por la mañana, las muestras se centrifugaron a 700 *xg* por 10 min, y los sueros fueron almacenados a -20 °C hasta su procesamiento en el laboratorio de radioinmunoensayo para la medición de la concentración sérica de progesterona (Coat-A-Count Progesterone, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). A dosis de 0.49 ng/ml el sistema presentó una sensibilidad de 0.1 ng/ml, con un coeficiente de variación intra e interensayo de 3.6 y 5.8 %, respectivamente. A dosis de 20.0 ng/ml, los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 5.6 y 6.1%, respectivamente.

Variables evaluadas

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de vacas que respondieron al tratamiento superovulatorio; número de cuerpos lúteos detectados al momento de la colección embrionaria; tasa de fertilización (número de embriones entre el número de embriones y óvulos); número de embriones más óvulos, número de embriones y número de óvulos colectados por vaca; tasa de colección de embriones más óvulos (número de embriones más óvulos colectados entre el número de cuerpos lúteos); tasa de colección embrionaria (número de embriones entre el número de cuerpos lúteos); distribución porcentual de las vacas superovuladas en relación al número de embriones y óvulos recolectados; grado de desarrollo y calidad de los embriones recolectados; y tasa de gestación de las vacas receptoras de embriones.

Análisis estadístico

Para determinar la similitud de las características productivas de las vacas donadoras y receptoras al inicio del estudio en ambas épocas, como son: el número de partos; los días en leche; la condición y el peso corporal; la producción estimada de leche a 305 días y la concentración sérica de progesterona de la vaca receptora al momento de la transferencia se evaluaron por medio de un análisis de varianza con bloques al azar. El modelo al que se atribuyó la varianza consideró al hato como bloque y la época

of embryos and number of oocytes collected per cow; embryo plus oocytes collection rate (number of embryos plus oocytes divided by the number of corpora lutea); embryo collection rate (number of embryos divided by the number of corpora lutea); percentage distribution of superovulated cows relative to number of collected embryos and oocytes; development and quality of embryos collected and pregnancy rates of recipient cows.

Statistical analysis

A variance model of random blocks was used to evaluate similitude of calving number; DIM; BCS and BW; P305 of both donor and recipient cows at the beginning of the study in both seasons; and serum progesterone levels at the moment of embryo transfer. The model to which variance was attributed variance considered the herd as a block, and the embryo collection and transfer season as principal effect⁽²²⁾.

Climate variables pertaining to both the collection and transfer seasons were analyzed through a variance test, where either the embryo collection season or the embryo transfer season was considered as the principal effect⁽²²⁾.

Superovulatory response; number of corpora lutea; fertilization rate; number of embryos and oocytes, number of embryos, number of oocytes; embryos and oocytes collection rate, embryos collection rate; percentage distribution of the embryos according to their stage of development; quality degree of embryos and percentage distribution of the cows superovulated in relation to the number of embryos and oocytes collected were analyzed by means of a chi-squared test⁽²²⁾.

The expected value of pregnancy rates of recipient cows (Y) was analyzed through a first-order multiple logistic regression model and represented as:

$$E\{Y\} = [1 + \exp(-\beta' X)]^{-1}$$

Where:

$$\beta' X^{-1} = \beta_0 + \beta_1(P)_1 + \beta_2(T)_2 + \beta_{12}(P \times T) + \beta_3(EQ)_3 + \beta_4(P305)_4 + \beta_5(ETT)_5$$

de colección embrionaria y la de transferencia como efecto principal⁽²²⁾.

Las variables climáticas de las épocas de colección embrionaria y transferencia se analizaron por análisis de varianza, donde la época de colección embrionaria o de transferencia se consideró como efecto principal⁽²²⁾.

La respuesta superovulatoria; número de cuerpos lúteos; tasa de fertilización; número de embriones y número de óvulos; tasa de colección de embriones más óvulos; tasa de colección de embriones; distribución porcentual de los embriones por grado de desarrollo y calidad; y la distribución porcentual de las vacas superovuladas en relación al número de embriones y óvulos recolectados se analizaron con Ji-cuadrada⁽²²⁾.

El valor esperado de la tasa de gestación de las vacas receptoras (Y) se analizó con un modelo de regresión logística múltiple de primer orden y representado como:

$$E\{Y\} = [1 + \exp(-\beta' X)]^{-1}$$

Donde:

$$\beta'X^{-1} = \beta_0 + \beta_1(P)_1 + \beta_2(T)_2 + \beta_{12}(P \times T) + \beta_3(EQ)_3 + \beta_4(P305)_4 + \beta_5(ETT)_5$$

Este modelo fue ajustado por el método de máxima verosimilitud; donde los efectos considerados fueron: época de producción del embrión (P), época de transferencia del embrión (T), interacción de las épocas de producción y de transferencia (P x T), calidad del embrión (CE), producción de leche estimada a 305 días (P305) y tiempo de transferencia del embrión (TTE), respectivamente⁽²²⁾.

RESULTADOS

Vacas donadoras

El número de partos (2.4 ± 0.25), los días en leche (105.3 ± 7.0) y la condición corporal (3.3 ± 0.07) fueron similares en ambas épocas de colección embrionaria ($P > 0.05$). La producción de leche estimada a 305 días (P305) ($11,609.9 \pm 473.0$ L) y el peso corporal (674.8 ± 18.8 kg)

This model was fitted by the method of maximum likelihood; where effects considered were: embryo production season (P), embryo transfer season (T), interaction of embryo production and embryo transfer seasons (P x T), embryo quality (EQ), P305 and embryo transfers timing (ETT), respectively⁽²²⁾.

RESULTS

Donor cows

Calving number (2.4 ± 0.25), DIM (105.3 ± 7.0) and body condition (3.3 ± 0.07) were similar in both embryo collection seasons ($P > 0.05$). Milk production adjusted to 305 d ($11,609.9 \pm 473.0$ L) and body weight (674.8 ± 18.8 kg) were higher in the temperate season than in the warm season ($9,992.7 \pm 444.9$ L and 612.2 ± 17.8 kg, respectively) ($P < 0.01$).

Recipient cows

Calving number (1.98 ± 0.09), DIM (86.0 ± 2.7), body condition (3.3 ± 0.04) and body weight (596.6 ± 10.5 kg) were similar in both transfer seasons ($P > 0.05$). Milk production adjusted to 305 d ($9,829.3 \pm 276.8$ L) was greater in cows transferred in the temperate season than in those transferred in the warm season ($8,570.2 \pm 279.4$ L).

Superovulatory response and embryo collection

Superovulatory response, number of corpora lutea detected at the moment of embryo collection and the fertilization rate were similar in both seasons ($P > 0.05$). In the temperate seasons, number of embryos and oocytes and the embryo plus oocytes collection rate per cow were greater than the observed in warm season ($P < 0.05$) (Table 3). There was a tendency of a greater proportion of cows during the warm season (36.8 %) to have 0 to 2 embryos and oocytes collected compared to the observed in temperate season (11.8, $P < 0.07$); as well as, a greater percentage of cows of temperate season (36.8 %) had 9 to 11 embryos and oocytes collected than the observed in warm season (10.5 %, $P < 0.06$).

PRODUCCIÓN EMBRIONARIA Y GESTACIÓN EN ESTRÉS CALÓRICO

Cuadro 3. Efecto de la época de colección embrionaria sobre la respuesta ovulatoria, el número de cuerpos lúteos (NCL) por vaca el día de la colección embrionaria, la tasa de fertilización y la colecta embrionaria

Table 3. Effect of the embryo production season on superovulation response, number of corpora lutea (NCL) per cow present at the day of embryo collection, fertilization rate, and embryo collection

Variable	Temperate season		Warm season	
	n	LSM ± SEM	n	LSM ± SEM
Superovulation response	20	85.0 ± 0.07 a	22	86.3 ± 0.07 a
Corpora lutea per cow	17	11.9 ± 1.20 a	19	11.7 ± 1.10 a
Fertilization, %	17	72.4 ± 0.07 a	19	80.0 ± 0.07 a
Number of embryos plus oocytes / NCL, %	17	89.3 ± 12.20 a	19	53.6 ± 11.60 b
Number of embryos / NCL, %	17	59.7 ± 9.90 a	19	41.8 ± 9.40 a
Embryos plus oocytes per cow	17	10.6 ± 1.50 a	19	6.1 ± 1.40 b
Embryos per cow	17	7.5 ± 1.30 a	19	4.5 ± 1.20 b
Oocytes per cow	17	3.2 ± 0.80 a	19	1.6 ± 0.70 a

^{ab} Subscripts that differ within a row represent statistical differences ($P < 0.01$).

fueron superiores en vacas de época templada, comparados a lo observado en época cálida ($9,992.7 \pm 444.9$ L y 612.2 ± 17.8 kg, respectivamente) ($P < 0.01$).

Vacas receptoras

El número de partos (1.98 ± 0.09), los días en leche (86.0 ± 2.7), la condición corporal (3.3 ± 0.04) y el peso corporal (596.6 ± 10.5 kg) de las vacas receptoras el día de la transferencia embrionaria fueron similares entre épocas de transferencia ($P > 0.05$). La P305 en vacas de época de transferencia templada ($9,829.3 \pm 276.8$ L) fue superior ($P < 0.01$) a la observada en vacas de época cálida (8570.2 ± 279.4 L).

Respuesta superovulatoria y colecta embrionaria

La respuesta superovulatoria, el número de cuerpos lúteos detectados al momento de la colecta embrionaria y la tasa de fertilización fueron similares en ambas épocas ($P > 0.05$). En la época templada, el número de embriones y óvulos y la tasa de colección de embriones más óvulos por vaca fueron superiores a lo observado en la época cálida ($P < 0.05$) (Cuadro 3). En la época cálida se observó una tendencia de mayor porcentaje de vacas a las que se les recolectó de 0 a 2 embriones y

Distribution of embryos collected in accordance to their stage of development blastula (58.1 %), morula (26.1 %) and retarded (15.7 %) was not different between seasons ($P > 0.05$). However, the proportion of embryos of excellent quality were higher in temperate season (62.0 %) than the observed in warm season (42.0 %, $P < 0.01$).

Pregnancy rates

Pregnancy rates of recipient cows were higher when embryo transfers were performed during temperate season (33.3 %) as compared to warm season (14.0 %; $P < 0.05$). Pregnancy rates of recipient cows were higher when embryos were collected and transferred during the temperate season (45 %) than when embryos were collected during the warm season and transferred during the temperate season (21.5 %, $P < 0.05$). There was a tendency for higher pregnancy rates in cows receiving excellent-quality embryos (30.4 %) than ones receiving good-quality embryos (16.9 %; $P < 0.11$) (Table 4).

There was no effect of P305 on pregnancy rates of recipient cows ($P > 0.05$). Serum progesterone concentrations of recipient cows on the day of embryo transfer (1.93 ± 0.2 ng/ml) and embryo transfer timing (4.12 ± 0.15 min) were similar for both seasons ($P > 0.05$).

óvulos durante la época cálida (36.8 %) que en la época templada (11.8 %, $P < 0.07$); mientras que el porcentaje de vacas a las que se les recolectó de 9 a 11 embriones y óvulos la tendencia fue mayor en la época templada (35.3 vs 10.5 %, $P < 0.06$).

La distribución porcentual de los embriones por su estadio de desarrollo: blastocito (58.1 %); mórula (26.1 %) y retrasados (15.7 %) no fue diferente entre épocas de colección embrionaria ($P > 0.05$). Sin embargo, el porcentaje de embriones de calidad excelente fue mayor en la época templada (62.0 %) que lo observado en la época cálida (42.0 %, $P < 0.01$).

Tasa de gestación

La tasa de gestación de las vacas receptoras de embriones fue mayor durante la época templada (33.3 %) que durante la cálida (14.0 %, $P < 0.05$). La tasa de gestación de las vacas receptoras de época templada fue más alta cuando recibieron embriones producidos durante la época templada (45.0 %), que en aquéllas que recibieron embriones producidos en época cálida (21.5 %, $P < 0.05$) (Cuadro 4). Se observó una tendencia de mayor tasa de gestación de las vacas receptoras cuando recibieron embriones de calidad excelente (30.4 %), que en aquéllas que recibieron embriones de calidad buena (16.9 %, $P < 0.11$).

No se encontró efecto de la P305 sobre la tasa de gestación de las vacas receptoras ($P > 0.05$). La concentración sérica de progesterona de las vacas receptoras el día de la transferencia del embrión (1.93 ± 0.2 ng/ml) y el tiempo de transferencia del embrión (4.12 ± 0.15 min) fueron similares en ambas épocas ($P > 0.05$).

DISCUSIÓN

El estrés calórico afecta la viabilidad embrionaria y el medio ambiente materno para el establecimiento de la gestación. El hecho de que la tasa de gestación de las vacas receptoras de época templada se haya reducido en más del 50 % cuando éstas habían recibido un embrión producido en época cálida, comparada con la observada en vacas que recibieron

Cuadro 4. Porcentaje de gestación de las vacas receptoras por efecto de la época de producción del embrión (P), la época de transferencia (T), la interacción (P x T) y la calidad del embrión transferido

Table 4. Pregnancy rate of embryo recipients cows by effect of embryo production season (P), embryo transfer season (T), their interaction (P x T) and quality of transferred embryos

	n	Pregnancy rate
Embryo production season:		
Temperate	51	29.8
Warm	56	17.4
Embryo transfer season:		
Temperate	54	33.3 ^a
Warm	53	14.0 ^c
Production x Transfer (P x T):		
Temperate – Temperate (TP – TT)	26	45.0 ^a
Temperate – Warm (TP – WT)	25	14.5 ^{bc}
Warm – Temperate (WP – TT)	28	21.5 ^c
Warm – Warm (WP – WT)	28	13.4 ^{bc}
Embryo quality:		
Excellent	66	30.4
Good	41	16.9

ab Different letters within the same effect indicate significant difference ($P < 0.01$).

ac Different letters within the same effect indicate significant difference ($P < 0.05$).

DISCUSSION

Heat stress affects both embryo viability and maternal environment for a successful pregnancy. The fact that in recipient cows of temperate season was observed a decrease pregnancy rate greater than 50 % when they received embryos produced during the warm season, as compared to those that received embryos produced during the temperate season might indicate a negative effect of heat stress on the viability of the embryo, despite have already developed to the blastula development stage.

This adverse effect of heat stress during early development of embryos has been previously

un embrión cuyo origen de producción fue de época templada, podría indicar un efecto negativo del estrés calórico sobre la viabilidad del embrión, aún cuando éste se haya desarrollado hasta el estadio de blastocisto. Este efecto adverso del estrés calórico sobre el desarrollo temprano del embrión ha sido previamente reportado en estudios *in vivo*⁽⁶⁾ e *in vitro*^(5,23,24). Otra posibilidad pudo haber sido el efecto que tiene el estrés calórico sobre el desarrollo y la calidad del folículo y el óvulo antes de la ovulación, que reduce el desarrollo y la sobrevivencia del embrión^(1,3,4,5). Al respecto, se ha demostrado que la eliminación frecuente de folículos desarrollados durante el verano, permite el reclutamiento de folículos saludables e incrementa la proporción de embriones producidos *in vitro* hasta el estadio de blastocisto^(2,3).

En el presente estudio, el efecto positivo de los embriones producidos en condiciones templadas para incrementar la tasa de gestación no fue observado en vacas receptoras en condiciones de estrés calórico; y que independientemente de la época de producción del embrión y la calidad del embrión, las vacas receptoras de época cálida presentaron una reducción de la tasa de gestación de más del 58 %, que puede deberse a la presencia de un efecto materno que impacta sobre la sobrevivencia del embrión después de la transferencia. Estos datos concuerdan con lo observado en vacas receptoras Holstein expuestas a condiciones de estrés calórico^(16,23). Sin embargo, otros estudios realizados en todas las estaciones del año han informado una tasa de gestación similar en vacas Holstein^(13,15) y en vacas *Bos indicus*⁽²⁵⁾, cuando se les transfiere embriones producidos en condiciones de termoneutralidad.

Se ha descrito que la menor fertilidad observada durante la época cálida puede ser explicada por la pérdida embrionaria temprana^(23,26,27); la cual ha sido asociada cuando las vacas receptoras recibieron un embrión al inicio del verano⁽²³⁾; cuando se tienen alteraciones inducidas por estrés calórico en la síntesis de proteínas por el endometrio durante los primeros ocho días del ciclo estral^(28,29), y con menor secreción de interferon-tau en el día 17 en conceptus en cultivo⁽³⁰⁾.

reported by *in vivo*⁽⁶⁾ and *in vitro* studies^(5,23,24). Another possibility could be adverse effects of heat stress on follicle and oocyte before ovulation, and this could hinder the development and capacity of an embryo to survive^(1,3,4,5). Other studies had demonstrated that frequent elimination of follicles developed during the summer allowed the recruitment of healthy follicles and increased the proportion of *in vitro* produced embryos developing to the blastocyst stage^(2,3).

In the present study, the positive effect of non-heat stressed embryos to increase the pregnancy rates were not observed in recipient cows during the warm season; and, independently of the embryo production season and the embryo quality, a decrease of 58 % in pregnancy rates observed in recipient cows exposed to heat stress conditions, indicating the presence of critical maternal effects impacting embryo survival after transference. Data agree with that observed in recipient lactating Holstein cows exposed to heat stress conditions^(16,23). However, another studies have reported similar pregnancy rates of recipient Holstein cows^(13,15) and *Bos indicus* cows⁽²⁵⁾, at all times of the year using non heat-stressed embryos.

Some studies have described that reduced fertility during the warm season can be explained by early embryonic loss^(23,26,27); and it have been associated when recipient cows received an embryo during the early summer⁽²³⁾, or induced alterations of protein synthesis by the endometrium during the first 8 d of the estrous cycle^(28,29) and with a reduced secretion of interferon-tau in cultured d-17 conceptuses⁽³⁰⁾.

Embryotrophic growth factors present in the uterine lumen⁽³¹⁾ have been considered a survival factor for pre-implantation bovine embryos exposed to heat stress. Reduced plasma levels of insulin have been reported during the summer^(32,33), as well as insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and glucose⁽³³⁾; due to a reduced dry matter intake⁽³⁴⁾, and a negative energy balance^(33,35). Heat-shocked embryos cultured with IGF-1 have allowed to continue development to the blastocyst stage^(24,36,37) improving pregnancy rates of recipient cows⁽²³⁾.

Los factores de crecimiento embriotróficos presentes en el lumen uterino⁽³¹⁾ han sido considerados como factores de sobrevivencia para la pre-implantación de los embriones bovinos expuestos a estrés calórico. Durante el verano se han descrito menores concentraciones de insulina^(32,33), del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1 (IGF-1) y glucosa⁽³³⁾; eventos asociados al menor consumo de materia seca⁽³⁴⁾ y al balance de energía negativo^(33,35). Varios estudios han observado en embriones cultivados con IGF-1 y que sufrieron un shock térmico, que estos pudieron continuar su desarrollo hasta el estadio de blastocisto^(24,36,37) y mejoraron la tasa de gestación de las vacas receptoras⁽²³⁾. Por lo que se ha establecido que quizá con la manipulación del sistema IGF-1 con la administración de somatotropina bovina en vacas lactantes expuestas a estrés calórico se puede incrementar la sobrevivencia embrionaria, el crecimiento del concepto, la producción de interferon-tau y la tasa de preñez⁽³⁸⁾.

La producción estimada de leche a 305 días de las vacas receptoras no afectó la tasa de gestación, como ha sido informado en otros estudios^(16,39); probablemente debido a la poca variabilidad de la producción de leche entre las vacas dentro de cada época de evaluación. Sin embargo, este efecto no debe de ser descartado, ya que se ha observado una relación negativa del alto nivel de producción de leche de las vacas con la pérdida embrionaria después de la transferencia de embriones⁽¹⁴⁾; y con menor fertilidad observada durante el verano en hatos lecheros de Florida, EE.UU⁽⁴⁰⁾ y del centro – norte de México⁽⁴¹⁾.

Independientemente de la época de transferencia, la calidad del embrión fue un factor que influyó sobre la tasa de gestación de las vacas receptoras, cuyo efecto ha sido documentado⁽¹⁶⁾. Aún cuando el tiempo requerido para realizar la transferencia embrionaria fue similar entre épocas, se observó que un mayor tiempo de transferencia redujo la tasa de gestación; quizá debido a un mayor tiempo de contacto del embrión descongelado con el crioprotector, que probablemente cause un daño en la integridad del embrión⁽²¹⁾.

Moreover, manipulation of the IGF-I system with somatotropin in lactating dairy cows exposed to heat stress could enhance embryonic survival, conceptus length, interferon-tau production and pregnancy rates⁽³⁸⁾.

Milk production estimated at 305 d in recipient cows did not affect pregnancy rates, as has been shown by other studies^(16,39). Lack of effect in present study could be due to small variability among milk yield of cows within each season in both herds evaluated. However, these effect should be not discarded because another studies have observed a negative relationship of higher milk yield cows with embryonic loss after embryo transfer⁽¹⁴⁾; and with a lower fertility during the summer from dairies located in Florida, USA⁽⁴⁰⁾ and north-central México⁽⁴¹⁾.

Embryo quality was a factor influencing pregnancy rates of recipient cows, independently of embryo transfer season, whose effect has been widely documented⁽¹⁶⁾. Even though time required to perform ET was similar between seasons, it was observed that if the time used in placing the embryo in the uterus of the recipient cow was increased, pregnancies were compromised, this may be due to a longer exposure of the thawed embryo to the cryoprotector, which probably damages its integrity⁽²¹⁾.

Serum progesterone concentrations in recipient cows at the moment of embryo transfer did not show any relationship to pregnancy rate, as it is reported in other studies^(10,39). Therefore, such criterion has a limited practical use in embryo-transfer programs.

A decreased number of embryos and oocytes collected per cow during the warm season, even the number of corpora lutea was not compromised could be linked to ovulation failures, whose event have been observed frequently in dairy cows exposed to heat stress^(16,33,42) and also in those showing low concentration of insulin and IGF-I⁽⁴³⁾.

Another possible cause of low embryo collection in cows in the warm season could be due to the fact that corpora lutea detected at the moment of embryo

Las concentraciones séricas de progesterona de las vacas receptoras al momento de la transferencia del embrión no tuvieron relación alguna con la tasa de gestación, lo que concuerda con lo informado en otros estudios^(10,39), por lo que esta variable tiene un uso práctico limitado en programas de transferencia embrionaria.

Un menor número de embriones y óvulos recolectados por vaca durante la época cálida, aún cuando el número de cuerpos lúteos no fue comprometido, podría relacionarse con fallas en la ovulación, cuyo evento se ha observado con mayor frecuencia en vacas que estuvieron expuestas a estrés calórico^(16,33,42) y en aquellas cuyas concentraciones de insulina e IGF-1 estuvieron bajas⁽⁴³⁾.

Otra posible causa de la menor colecta embrionaria en vacas de época cálida podría ser que los cuerpos lúteos detectados al momento de la colección embrionaria hubieran sido en realidad folículos luteinizados, como fue observado en vacas superovuladas con hipotiroidismo inducido⁽⁴⁴⁾.

El estrés calórico no fue determinante para afectar la tasa de fertilización, cuyo dato coincide con lo descrito, tanto en estudios *in vivo* realizados en vaquillas superovuladas que fueron expuestas a altas temperaturas durante 10 h al inicio del estro⁽¹²⁾; como en estudios de fertilización *in vitro*, al utilizarse óvulos obtenidos de vacas expuestas a estrés calórico durante el verano⁽⁴⁾.

La ausencia de efecto del estrés calórico sobre el desarrollo embrionario fue similar a lo informado en vacas superovuladas con altos niveles de producción de leche durante el verano⁽¹²⁾. En contraste, en estudios *in vitro* se observó un menor porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto cuando estos fueron expuestos a temperaturas fluctuantes en los primeros ocho días después de la fertilización, similares a las observadas en las vacas en un día de verano⁽⁴⁵⁾. Por lo que quizá el nivel de estrés calórico del presente estudio no fue suficiente para comprometer el desarrollo embrionario, pero sí para afectar la calidad embrionaria, como ha sido descrito por otros autores⁽¹⁶⁾.

collection could have been actually luteinized follicles, as was seen in superovulated cows with induced hypothyroidism⁽⁴⁴⁾.

Heat stress was not determinant for affect the fertilization rate, in coincidence with what has been already described both in *in vivo* studies performed on superovulated heifers exposed to high temperatures for 10 h at beginning of estrus⁽¹²⁾ and in *in vitro* fertilization studies using oocytes obtained from cows exposed to heat stress in summer⁽⁴⁾.

Lack of deleterious effects of heat stress on embryonic development coincides to what is reported for superovulated high-producing dairy cows during the summer⁽¹²⁾. Contrariwise, *in vitro* studies was observed a minor percentage of embryos that reached the blastocyst stage when embryos were exposed to fluctuating temperatures during the first eight days after fertilization, similar to changes in body temperature experienced by cows throughout a summer day⁽⁴⁵⁾. Perhaps, heat stress levels in the present study was not enough to compromise embryonic development, but sufficient for affecting embryo quality, as has been reported by other authors⁽¹⁶⁾.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The fact that bovine embryos produced and collected during a temperate season increased pregnancy rates of recipient cows in comfort thermic, and such phenomenon was not observed for cows receiving embryos produced and collected during the warm season, implies perhaps a damage in the quality oocyte and on embryo development due to effects of heat stress, that could have affect embryo viability to assure pregnancy in recipient cows. Reduced pregnancy rates observed in recipient cows under warm season, regardless of the embryo production season and its quality, could implies the existence of maternal effects associated to heat stress conditions on embryo viability after transference. Due to this, heat stress should be managed strategically to reduce its detrimental effect on pregnancy rates of recipient cows, especially around of time of embryo transference.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

El hecho que los embriones producidos durante la época templada haya incrementado la tasa de gestación de las vacas receptoras en condiciones de confort térmico, y que dicho evento no haya sido observado en vacas que recibieron embriones producidos durante la época cálida, implica quizá un daño en la calidad del óvulo y en el desarrollo embrionario por efecto del estrés calórico, que pudo haber afectado la viabilidad del embrión para asegurar la gestación de la vaca receptora. La menor tasa de gestación observada en vacas receptoras de épocas cálidas, independientemente de la época de producción del embrión y su calidad, puede implicar un efecto materno asociado al estrés calórico sobre la viabilidad del embrión después de la transferencia. Es por esto que quizá el estrés calórico pudiera ser estratégicamente manejado para disminuir su efecto detrimental sobre la tasa de gestación de las vacas receptoras, especialmente alrededor del tiempo de la transferencia del embrión.

AGRADECIMIENTOS

La investigación fue apoyada por el CONACyT (31457-B); Fundación Produce Aguascalientes A.C. y la Asociación de Productores de Leche del Estado de Aguascalientes. Se agradece en forma especial a los propietarios y personal de campo de las explotaciones lecheras de “Granja El Sol” y “Rancho Las Palomas”, quienes colaboraron con la aportación de los animales y facilitaron las labores de manejo del ganado.

LITERATURA CITADA

1. Sartori S, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002;85:2803-2812.
2. Guzeloglu, A, Ambrose JD, Kassa T, Diaz T, Thatcher MJ, Thatcher WW. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. *Anim Reprod Sci* 2001;66:15-34.

ACKNOWLEDGMENTS

Research was supported in part by CONACyT Grant No. 31457-B; Fundación Produce Aguascalientes A.C. and Asociación de Productores de Leche del Estado de Aguascalientes. Authors thank owners and personnel of “Las Palomas” and “El Sol” dairies for their collaborative work providing animals and facilities. Authors also thank Dr. Peter J. Hansen for his valuable comments and suggestions.

End of english version

3. Roth Z, Arav A, Zeron Y, Braw-Tal R, Wolfenson D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* 2001;122:737-744.
4. Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J Dairy Sci* 2002;85:390-396.
5. Sakatani M, Kobayashi S, Takahashi M. Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 2003;67:77-82.
6. Ealy AD, Drost M, Hansen PJ. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J Dairy Sci* 1993;76:2899-2905.
7. Ealy AD, Howell LJ, Monterroso VH, Aréchiga CF, Hansen PJ. Development changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. *J Anim Sci* 1995;73:1401-1407.
8. Hansen PJ. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology* 2007;68:242-249.
9. Hansen PJ. To be or not to be. Determinants of embryo survival following heat shock. *Theriogenology* 2007;68:40-48.
10. Ambrose JD, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Leibfried-Rutledge ML, Thatcher MJ, et al. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen *in vitro* produced embryos to increase pregnancy rates in heat stressed dairy cattle. *J Dairy Sci* 1999;82:2369-2376.
11. Al-Katanani YM, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Kringinger CE, Block J, Thatcher W, Hansen PJ. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* 2002;58:171-182.
12. Putney D, Mullins S, Thatcher WW, Drost M, Gross TS. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim Reprod Sci* 1989;19:37-51.
13. Drost M, Ambrose JD, Thatcher MJ, Cantrell CK, Wolfsdorf KE, Hasler JF, Thatcher WW. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology* 1999;52:1161-1167.

14. Vasconcelos JL, Demétrio DG, Santos RM, Chiari JR, Rodrigues CA, Sá Filho OG. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology* 2006;65:192-200.
15. Sartori R, Gümen A, Guenther JN, Souza AH, Caraviello DZ, Wiltbank MC. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2006;65:1311-1321.
16. Chebel RC, Demétrio DG, Metzger J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology* 2008;69:98-106.
17. Ferguson JD, Galligan DT, Thomsen N. Principal descriptor of body condition score in Holstein cows. *J Dairy Sci* 1994;77:2695-2703.
18. Ingraham RH, Stanley RW, Wagner WC. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in Hawaii. *J Dairy Sci* 1975;59:2086-2090.
19. Putney DJ, Drost M, Thatcher WW. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology* 1989;31:765-778.
20. Stringfellow DA, Seidel MS. Manual of the International Embryo Transfer Society. 3rd. ed. Savoy, IL, USA. International Embryo Transfer Society Inc.; 1998.
21. Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshida N, Kano N, Macda J, et al. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology* 1998;49:1051-1058.
22. SAS Institute Inc. SAS/STAT Users Guide, version 6, 4th ed. SAS Inst., Cary, NC.; 1989.
23. Block J, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Rivera RM, Paula-Lopez FF, Ocon OM, Krininger III CE, Liu J, Hansen PJ. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of in vitro-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. *J Anim Sci* 2003;81:1590-1602.
24. Jousan DF, Hansen PJ. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol Reprod* 2004;71:1665-1670.
25. Barati F, Niasari-Naslaji A, Bolourchi M, Razavi K, Naghzali E, Sarhaddi F. Pregnancy rates of frozen embryos recovered during winter and summer in Sistani cows. *Iranian J Vet Res* 2007;8:151-154.
26. López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Garbayo JM, Hunter RH. Timing of early foetal loss for single and twin pregnancies in dairy cattle. *Reprod Domest Anim* 2004;39:429-433.
27. García-Ispuerto I, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Nogareda C, Lopez-Bejar M, De Rensis F. Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology* 2006;65:799-807.
28. Malayer JR, Hansen PJ, Buhi WC. Effect of day of the oestrous cycle, side of the reproductive tract and heat shock on in-vitro protein secretion by bovine endometrium. *J Reprod Fertil* 1988;84:567-578.
29. Malayer JR, Hansen PJ. Differences between Brahman and Holstein cows in heat-shock induced alterations of protein synthesis and secretion by oviducts and uterine endometrium. *J Anim Sci* 1990;68:266-280.
30. Putney DJ, Malayer JM, Gross TS, Hansen PJ. Heat-stress induced alterations in the synthesis and secretion of protein and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. *Biol Reprod* 1988;39:717-728.
31. Whates DC, Reynolds TS, Robinson RS, Stevenson KR. Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *J Dairy Sci* 1998;81:1778-1789.
32. De Rensis F, Marconi P, Capelli T, Gatti F, Facciolongo F, Franzì S, Scaramuzzi RJ. Fertility in postpartum dairy cows in winter or summer following estrus synchronization and fixed time AI after the induction of an LH surge with GnRH or hCG. *Theriogenology* 2002;58:1675-1687.
33. Butler WR. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci* 2003;83:211-208.
34. Rhoads ML, Rhoads RP, Sanders SR, Carroll SH, Weber WJ, Crooker BA, Collier RJ, VanBaale MJ, Baumgard LH. Effects of heat stress on production, lipid metabolism and somatotropin variables in lactating cows. *J Dairy Sci* 2007;90(Suppl 1):230.
35. Wheelock JB, Sanders SR, Shwartz G, Hernandez LL, Baker SH, McFadden JW, et al. Effects of heat stress and rbST on production parameters and glucose homeostasis. *J Dairy Sci* 2006;89(Suppl 1):290-291.
36. Jousan DF, Hansen PJ. Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. *Mol Reprod Develop* 2006;74:189-196.
37. Block J. Use of insulin-like growth factor-1 to improve post-transfer survival of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 2007;68:49-55.
38. Bilby TR, Sozzi A, Lopez MM, Silvestre F, Ealy AD, Staples CR, Thatcher WW. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus and growth hormone – Insulin-like growth factor system responses. *J Dairy Sci* 2006;89:3375-3385.
39. Chagas e Silva J, Lopes da Costa L., Robaldo-Silva J. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology* 2002;58:51-59.
40. Al-Katanani MY, Weeb DW, Hansen PJ. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J Dairy Sci* 1999;82:2611-2616.
41. Lozano DR, Vásquez PC, González-Padilla E. Efecto del estrés calórico y la producción de leche sobre la tasa de gestación de vacas lecheras en sistemas intensivos de producción. *Tec Pec Mex* 2005;43:197-210.
42. Lopez-Gatius F, Lopez-Bejar M, Fenech M, Hunter RH. Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects. *Theriogenology* 2005;63:1298-1307.
43. Beam SW, Butler WR. Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *J Dairy Sci* 1998;81:121-131.
44. Bernal A, De Moraes GV, Thrift TA, Willard CC, Randel RD. Effects of induced hypothyroidism on ovarian response to superovulation in Brahman (*Bos indicus*) cows. *J Anim Sci* 1999;77:2749-2756.
45. Rivera RM, Hansen PJ. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction* 2001;121:107-115.

