

Cambios en la temperatura vaginal asociados a la actividad física, al estrés por calor y a la humedad en vacas lecheras

Por

Gerardo I. Rivera Collazo

Tesis sometida en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de

Maestro en ciencias

en el

Departamento de Industria Pecuaria

**Universidad de Puerto Rico
Recinto de Mayagüez**

2011

Aprobado por:

Dr. Esbal Jiménez Cabán
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Dra. Enid Arcelay Ruiz
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Dr. John Fernández Van Cleve
Presidente del Comité Graduado

Fecha

Dr. Jaime Ramírez Vick
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Dr. José R. Latorre
Director de Departamento de Industria Pecuaria

Fecha

Abstract

Heat stress greatly affects the dairy industry especially when the facilities are established in tropical and subtropical environments. The poor design of cattle facilities could provoke that animals have to walk long distances for daily management and thus increase the internal temperature of cows that are already under the effect of heat stress. This is especially important in pregnant cows that carry more weight and have additional metabolic requirements. This study was designed as a 2 x 2 factorial (level exercise X reproductive state) with two switchback repetitions of 12 Holstein cows. Pregnant and no pregnant cows were either exercised or not exercised for 18 days walking an approximate distance of 3.11 km / day. There was no significant effect of exercise ($P = 0.2773$) on the cow's internal temperature but the effect of exercise was related to several significant interactions with environmental factors. Highly significant differences were found between levels of treatment as cows that were exposed to long walks had lesser and more stable internal temperatures whereas bigger increases in temperature were related to the environmental temperature and humidity index (THI). On the other hand, there was a highly significant effect of reproductive state ($P = 0.002$). Even though there were no significant differences between pregnant or not pregnant when using THI as covariant, the results suggest a positive effect of cow walking and pregnancy on vaginal temperature. Therefore it would be apparent that the design of dairy facilities that expose the animals to long walks does not have an adverse effect on the animal, and it can even be beneficial from the point of view of animal welfare.

Resumen

El estrés por calor afecta grandemente la industria lechera especialmente cuando las vaquerías están establecidas en ambientes tropicales y subtropicales. Un mal diseño de las instalaciones en una vaquería podría causar que las vacas tengan que caminar largas distancias y, por ende, aumentar la temperatura interna de las vacas que ya se encuentran bajo el efecto del estrés por calor. Este es especialmente importante en vacas preñadas que cargan un peso mayor y tienen una carga metabólica adicional. El diseño experimental de este estudio fue de un factorial 2 x 2 (ejercicio x estado reproductivo) con dos repeticiones de reversión simple en 12 vacas de la raza Holstein. Las mismas se ejercitaron durante 18 días en caminatas de aproximadamente 3.11 km de distancia por día. No hubo un efecto significativo de la caminata ($P=0.2773$) pero la actividad física se vio envuelta en varias interacciones significativas con los factores ambientales, que causó que se encontraran diferencias altamente significativas entre los niveles de actividad física a ITH específicos, lo que hace que las vacas que caminaron tuvieron temperatura más bajas y estables que las vacas que no caminaron. Por otro lado, la preñez tuvo un efecto altamente significativo ($P=0.002$), aunque no se encontraron diferencias significativas entre las vacas preñadas y las no preñadas cuando se compararon a ITH específicos. Los resultados obtenidos de esta investigación sugieren que hubo un efecto positivo sobre la temperatura vaginal de la vaca como resultado de la caminata, siendo mayor en las preñadas. Por lo tanto, se infiere que el diseño de una vaquería que exponga los animales a caminar más de lo que la vaca caminaría normalmente no tiene un efecto

adverso sobre el animal, y que por el contrario podría ser beneficioso desde el punto de vista del bienestar del animal.

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado primeramente a mi esposa Kathy, ya que por su apoyo y amor es que yo he podido completar este trabajo. Por correr conmigo este camino largo en paso firme y sin mirar atrás. Por escucharme con paciencia y comprensión cuando estaba tratando de razonar las posibles implicaciones de este trabajo. Y por último, por siempre estar al lado mío para que pudiera terminar este trabajo. Por eso te dedico con mucho amor este trabajo.

También quisiera dedicar este trabajo a mis padres Jorge y Myrna, ya que ellos me dieron la oportunidad de vivir sin importar las consecuencias que eso trajera. No conformes con eso me dieron la oportunidad de hacer de mí un hombre de trabajo que actualmente está saliendo adelante por lo que ellos inculcaron en mí. Y ellos al igual que mis dos hermanos Jorge y Alexandra por creer en mí cada vez que me propongo algo y darme la mano de una forma u otra para poder lograr las metas que me propongo. Por ultimo pero no menos importante quisiera dedicarles este trabajo a mis suegros Javier y Mayra, primeramente por permitirme pertenecer a su familia y aceptarme como si fuera su hijo. Por siempre escucharme y aconsejarme cada vez que tengo una duda o inquietud y por compartir sus experiencias en la agricultura y en la vida conmigo. De igual manera quiero dedicar este trabajo a todos mis abuelos, los de sangre y los que no son de sangre, ya que de ellos he aprendido a valorar a los ancianos ya que en ellos hay un recurso de mucha sabiduría.

En fin a todos los aquí mencionados los quiero mucho y gracias por su apoyo por creer que yo podía lograr finalizar con este trabajo.

Agradecimientos

Primeramente y antes que todo tengo que agradecer a Dios todo poderoso por darme el aliento de vida y cuidar mis espaldas cada paso que doy en este mundo, por siempre guardar mi corazón y no permitir que me aparte de Él y cuando lo he hecho le agradezco por siempre traerme de vuelta al camino que El a trazado para mí. Sin su ayuda nunca estaría en donde estoy hoy día y no temo por lo que pueda pasar en el futuro ya que tengo la confianza de que en sus manos siempre estaré.

Quisiera agradecer emotivamente al Dr. John Fernández por creer en mí y permitirme ser su estudiante aun cuando no me conocía como estudiante. Gracias por siempre tener paciencia con migo cuando no entendía lo que usted me explicaba de primera mano, y por siempre estar encima de mí para que avanzara a terminar. También quiero agradecer a los Drs. Esbal Jimenez y Enid Arcelay por aceptar pertenecer a mi comité y estar disponible para ayudar en cualquier momento que hubiese sido necesario.

Quisiera también agradecer a todos mis profesores ya que de una forma u otra siempre inculcaron algo bueno en mí y despertaron en mí el interés por la investigación científica en las ciencias agrícolas. En especial a los Drs. Ángel Custodio y Bernardo Vallejo ya que ellos fueron personas que influyeron mucho a la hora de yo tomar la decisión de comenzar los estudios graduados. También quiero hacer un reconocimiento a los Drs. Raúl Macchiavelli, Ernesto Riquelme y Paul Randel por siempre estar disponibles cada vez que tenía dudas al momento de escribir y analizar los datos de este trabajo.

También quiero hacer un agradecimiento muy especial a otros estudiantes graduados que siempre han estado dispuestos a ayudar con mi trabajo muy en especial a Héctor Sánchez, Alexander Martínez, Javier Rivera (plataforma) y José Delgado (chonchy) que cada vez que me trancaba con alguna parte de este trabajo siempre me daban la mano ya fuese con los procedimientos como con las estadísticas.

Por ultimo y no menos importantes quisiera agradecer a los muchachos de la vaquería ya que sin la ayuda y cooperación de ellos, este experimento no se hubiese podido completar. Especialmente Ricky que era el que siempre me ayudaba a caminar las vacas.

Índice

Abstract	I
Resumen	ii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Índice	vii
Lista de Cuadros	viii
Lista de Graficas	ix
Lista de anejos	x
Introducción	1
Objetivos	3
Revisión de Literatura	4
Características climáticas del estrés por calor	4
Índice de temperatura y humedad	6
Medidas de temperatura interna	7
Actividad física	9
La reproducción y el estrés por calor	13
Materiales y Métodos	19
Localización geográfica	19
Descripción	19
Actividad física	20
Datos ambientales	20
Temperatura vaginal	21
Diseño experimental y análisis estadístico	22
Resultados y Discusión	23
Conclusión	37
Literatura Citada	38
Anejos	42

Listado de Cuadros

Cuadro 1: Medias de temperatura interna en animales bajo sombra versus no sombra	14
Cuadro 2: Medias de las concentración de hormonas en vacas expuestas a sombra versus no sombra	14
Cuadro 3: Medias de la temperatura vaginal para las vacas en los cuatro tratamientos a lo largo del día	28
Cuadro 4: Máximas de la temperatura vaginal para los animales en los cuatro tratamientos a lo largo del día	30
Cuadro 5: Máximas de temperatura vaginal para los cuatro tratamientos e ITH parametrizada por periodos del día	31
Cuadro 6: Diferencia de medias cuadradas mínimas de los animales preñados vs. los no preñados a ITH específicos	33
Cuadro 7: Diferencia de medias cuadradas mínimas de los animales que caminaron vs. los que estaban estabulados a ITH específicos	35

Listado de Graficas

Gráfica 1: Media de la temperatura vaginal de los animales expuestos a caminata forzada vs. estabulación a lo largo del día	24
Gráfica 2: Máximas de la temperatura vaginal de los animales expuestos a caminata forzada vs. estabulación a lo largo del día	24
Gráfica 3: Medias de la temperatura vaginal de los animales preñados vs. no preñados a lo largo del día	25
Gráfica 4: Máximas de la temperatura vaginal para los animale preñados vs. no preñados a lo largo del día	25
Gráfica 5: Medias de la temperatura vaginal para los animales en los cuatro tratamientos a lo largo del día	29
Gráfica 6: Máximas de la temperatura vaginal de los animales en los cuatro tratamientos a lo largo del día	31
Gráfica 7: Máximas de temperatura vaginal para los cuatro tratamientos e ITH parametrizada por periodos del día	32
Gráfica 8: Diferencia de medias cuadradas minimas de los animales preñados vs. los no preñados a ITH especificos	34
Gráfica 9: Diferencia de medias cuadradas mínimas de los animales que caminaron vs. los que estaban estabulados a ITH específicos	36

Listado de anejos

Anejo 1: Gráfica de medias de temperatura vaginal generales de la investigación de los cuatro tratamientos	42
Anejo 2A: Gráfica de medias de temperatura vaginal e ITH desde el 24 de febrero hasta el 12 de marzo	43
Anejo 2B: Gráfica de medias de temperatura vaginal e ITH desde el 23 de marzo hasta el 8 de abril	43
Anejo 2C: Gráfica de medias de temperatura vaginal e ITH desde el 14 de agosto hasta el 30 de agosto	44
Anejo 2D: Gráfica de medias de temperatura vaginal e ITH desde el 9 de septiembre hasta el 25 de septiembre	44
Anejo 3: Prueba de efectos fijos tipo 3	45

Introducción

El estrés por calor es un factor que afecta grandemente la economía de las vaquerías en Puerto Rico y los Estados Unidos. En Estados Unidos se estima que las pérdidas económicas causadas por el estrés por calor en la industria lechera podrían ascender a cerca de 900 millones de dólares (Collier et al. 2006). Estas pérdidas económicas se deben a que la vaca tiende a producir menos leche debido a que necesita más energía para mantener una homeostasis térmica que de otra manera utilizaba para la producción. La reducción en producción de leche por parte de las vacas generalmente también se debe a una disminución en el consumo de materia seca como mecanismo que utiliza el animal para reducir el calor metabólico y así poder disminuir el calor concentrado dentro de su sistema (West, 2003).

La reproducción de la vaca también se ve afectada por el estrés de calor, especialmente en el establecimiento y el mantenimiento de la preñez (Hansen y Arechiga, 1999). Por su parte Jordan en el 2003, menciona que el estrés por calor afecta diversos factores reproductivos tales como la duración del celo, el por ciento de concepción, la función uterina, el balance endocrino, el crecimiento y desarrollo folicular, el mecanismo luteolítico, la implantación, el desarrollo temprano del embrión y el crecimiento del feto (Gangwar et al., 1965; Nardone et al., 1997; Ingraham et al., 1976; Collier et al., 1982; Wolfenson et al., 1988b; Wise et al., 1988; Howell et al., 1994; Wilson et al., 1998; Biggers et al., 1987; Wolfenson et al., 1988a).

Se ha encontrado que la mayoría de los efectos negativos del estrés por calor en la concepción se debe al cambio en temperatura ambiental que ocurre entre 42 días antes de la inseminación y 40 días después de la misma (Jordan, 2003). Por otro lado,

Collier y colaboradores (1982b) reportaron que las vacas gestantes que se expusieron a un estrés de calor en el último trimestre, demostraron reducciones en el peso de la cría al nacer y en la producción de leche en dicha lactación indicativo que la vaca preñada se ve muy afectada por el estrés por calor.

El mal diseño de una vaquería puede resultar en prácticas que aumenten la necesidad de que la vaca aumente su actividad física y así aumentar la temperatura interna, incrementando la carga de calor que induce al estrés. Para aminorar el efecto adverso del estrés por calor, hay que buscar métodos de manejo que ayuden a reducir la temperatura interna en las vacas o, al menos, que logren ser más eficientes en disipar el calor. Para lograr esto hay que encontrar los factores que contribuyen al aumento en temperatura interna de la vaca.

Objetivos

Los objetivos de investigación fueron evaluar el efecto de la actividad física sobre la temperatura interna de la vaca, investigando como un mal diseño de las instalaciones de la vaquería puede afectar la homeostasis del animal. Además, se evaluó como la actividad física puede afectar a vacas preñadas ya que la distribución energética, sanguínea y de nutrientes son distintas durante la gestación.

Revisión de Literatura

Características climáticas del estrés por calor

El clima está compuesto por una combinación de elementos tales como: temperatura, humedad, precipitación, movimiento de aire, radiación solar, presión barométrica e ionización (Johnson, 1987). Existen variaciones climáticas alrededor del mundo debido a la latitud, los vientos prevalecientes, la capacidad de evaporación, la disponibilidad de agua, la elevación, y la proximidad a montañas, entre otros factores (West, 2003). Puerto Rico se encuentra en una zona climática conocida como trópico húmedo, la cual se caracteriza por una intensa radiación solar, altas temperaturas y una humedad relativa alta (West, 2003) que no permite un intercambio de calor eficiente entre el animal y su medio ambiente. Existen dos mecanismos principales de intercambio de calor que la vaca puede utilizar para liberar su carga térmica, evaporativos y no evaporativos. Los no evaporativos están compuestos por los mecanismos de radiación, convección y conducción, mientras que, los evaporativos son la sudoración y el jadeo.

Los mecanismos de enfriamiento no evaporativos dependen del gradiente de temperatura lo cual es complicado en ambientes tropicales debido a temperaturas del aire por encima de la temperatura crítica (25.6 °C) y una intensa radiación solar que le añade a la carga de calor a la vaca. Por tal razón, en ambientes tropicales se le da mayor importancia a los sistemas de liberación de calor evaporativos aunque también se ven comprometidos debido a la alta humedad relativa. La liberación de calor por evaporación en la vaca aumenta en un ambiente de alta temperatura pero baja humedad relativa. Por el contrario, ambientes de alta temperatura y alta humedad

relativa, resultan en una disminución en la habilidad de evaporación ya que el aire no cuenta con suficiente capacidad de absorción de agua (West, 2003; Kibler y Brody, 1950).

El estrés por calor y la humedad relativa es un fenómeno que afecta en gran manera a las vacas lecheras, especialmente en los climas tropicales. Yousef (1984), definió el estrés por calor como la suma de fuerzas sobre un animal homeotérmico que desplazan su temperatura del estado de descanso. La homeostasis térmica en vacas Holstein tiene una variación de temperatura óptima que fluctúa entre -0.5°C y 20°C (Johnson, 1987). Por otro lado, se ha determinado que la temperatura del aire crítica en las vacas es entre 25°C y 26°C (Berman et al., 1985). Lefcourt y Adams (1996) encontraron que hay muy poca variación en la temperatura corporal interna mientras la vaca se encuentra en ambientes por debajo de la temperatura crítica de 25.6°C . Sin embargo, una vez se sobrepasa los 25.6°C , la temperatura rectal interna de la vaca aumenta de forma lineal a razón de 0.42°C por cada 5°C que aumente la temperatura del aire. En otro experimento, Wilson y colaboradores (1998) expusieron dos grupos de animales a dos tratamientos de temperatura distintos, termoneutral (21°C) y estrés por calor ($31-33.5^{\circ}\text{C}$) y encontraron que los animales que estaban sometidos a ambientes termoneutrales tuvieron una temperatura rectal promedio de 38.63°C mientras que los que estuvieron en temperaturas de estrés por calor, demostraron temperaturas internas promedio de 39.26°C ; una diferencia de 0.63°C .

Índice de Temperatura y Humedad (ITH)

Durante los últimos años se han tratado de generar distintas medidas que agrupen los factores climáticos para poder determinar el efecto combinado de estos factores sobre los animales. La disponibilidad de datos para calcular estos índices los hace difícil de calcular. Por tal razón, la mayoría de los índices utilizados en la actualidad utilizan la temperatura del aire y la humedad relativa como factores en el cálculo de la medida (Igono et al., 1985; Igono y Johnson, 1990; Ravagnolo y Misztal, 2000; Bouraoui et al., 2002; St-Pierre et al., 2003; West, 2003; Correa-Calderón et al., 2004).

Los índices de temperatura y humedad (ITH) expresan el efecto combinado de la temperatura del aire y la humedad relativa sobre el nivel de estrés por calor. Este índice es un indicador para determinar la sensibilidad de algunas especies al estrés por calor. Por ejemplo, las vacas pueden tolerar temperaturas más altas con baja humedad relativa mucho mejor que los cerdos debido a su gran habilidad de disipar calor por medio de la sudoración (Bohmanova et al, 2007). La liberación de calor por medio de la sudoración es más difícil en medio ambientes con alta humedad relativa. Es por esto que en los climas húmedos el cerdo tiene mejor disipación de calor que las vacas (Yousef, 1985).

Bohmanova y colaboradores (2007) analizaron siete fórmulas de ITH para ver cuales se ajustan mejor a dos climas distintos en los Estados Unidos un clima caliente y seco (Arizona) y un clima caliente y húmedo (Georgia). Estos encontraron que el ITH que mejor se ajusta a los climas calientes y húmedos son aquellas fórmulas que le den una mayor relevancia a la humedad relativa. Por otro lado, indicaron que las diferentes

fórmulas de ITH son efectivas para varias situaciones donde existe diferente información relacionada al ambiente.

Dikmen y Hansen (2009), estudiaron distintas fórmulas de ITH comparándolas con la temperatura de bulbo seco y encontraron que la temperatura de bulbo seco es tan buen predictor del nivel de estrés por calor como lo es el ITH. Ellos lograron asociar que cuando la temperatura es de 29.7°C , el animal tendrá una temperatura rectal de 39°C mientras que si la temperatura del aire es 31.4°C , la temperatura rectal del animal será de 39.5°C . Esto indica que la temperatura del aire por si sola está altamente correlacionada con la temperatura interna de la vaca, sugiriendo que la temperatura del aire es un buen indicativo del nivel de estrés por calor que siente la vaca para así poder cuantificar el mismo.

Medidas de temperatura interna

Para poder cuantificar como los cambios ambientales afectan a la vaca, se debe conocer las alternativas de medidas de temperatura corporal de la vaca como principal indicador del bienestar de la vaca. Cualquier variante en la temperatura interna puede indicar enfermedad o el grado de estrés por calor en el cual el animal se encuentra. Existe una gran variedad de estudios donde se utilizan los distintos puntos del cuerpo de la vaca para tomar los datos de temperatura más fácilmente y con mayor precisión.

Kriss (1920), estudió las posibles diferencias entre la temperatura rectal y la temperatura vaginal para determinar el mejor indicador de un cambio en el bienestar de la vaca. En dicho experimento utilizó dos termómetros iguales y con la misma calibración, insertados uno en el recto y otro en la vagina por un periodo de tiempo aproximado de tres minutos a una profundidad de siete pulgadas en cada órgano.

Estos a su vez fueron intercambiados cada día para corregir el posible error por los termómetros. Ellos encontraron una diferencia de 0.3°C entre ambas temperaturas siendo mayor la temperatura rectal. Por otro lado, Bergen y Kennedy (2000), realizaron estudios para evaluar la correlación que existe entre la temperatura vaginal y la temperatura timpánica. Estos utilizaron radio telemetría para la toma de la temperatura vaginal y *data loggers* para la toma de temperatura timpánica. Ellos encontraron una diferencia media de 0.35°C y una correlación de 0.77, siendo mayor la temperatura timpánica. En este estudio se infiere que la toma de temperatura timpánica es mejor cuando se quieren detectar cambios rápidos en temperatura pero que la temperatura vaginal permite la toma de datos de temperatura por periodos de tiempo más prolongado.

Recientemente, Bewley y colaboradores (2008) estudiaron un nuevo sistema de toma de datos de temperatura interna de la vaca. El mismo consiste en la introducción de un bolo que se aloja en el retículo y utiliza sensores externos (ubicados en la sala de ordeño) para determinar la temperatura reticular. Ellos compararon la temperatura obtenida por medio de este bolo reticular con la temperatura rectal y encontraron que existía una diferencia de 0.45°C siendo mayor la reticular. Además, encontraron una correlación de 0.645 entre la temperatura rectal y la temperatura reticular por lo que aparenta ser una buena técnica para obtener datos de temperatura interna. Por otro lado, los autores tuvieron que ajustar las temperaturas obtenidas por el bolo reticular ya que la medida se ve afectada por el consumo de agua. Aún así, ellos infieren que esta sería una excelente herramienta en la finca para detectar enfermedades o estrés por calor en la vaca, con la limitante que requiere ajuste por medio de una fórmula para

poder expresarla como un valor equivalente a la temperatura rectal ya que es la que se acostumbra a utilizar.

En otro trabajo, Bewley y colaboradores (2008), estudiaron el impacto que tiene el consumo de agua sobre la temperatura reticular a través de dos experimentos con cuadrados latinos de 3x3 replicados. En el primero, los animales fueron divididos para consumir 25.9 Kg de agua a 34.3°C (caliente), 18.2°C (tibia) y 7.6 °C (fría) y en el segundo se agruparon para proporcionarles 18.9 Kg de agua a 38.9°C (temperatura corporal) y 5.1°C (fría) y un tercer grupo sin agua. En el primer experimento se tomaron datos de temperatura reticular por 3 horas consecutivas resultando en una disminución en la temperatura reticular de 8.5°C, 6.9°C y 2.2°C para el agua caliente, tibia y fría, respectivamente. En el segundo experimento, las vacas a las cuales no se les suministró agua no tuvieron cambios en la temperatura mientras que las vacas que recibieron agua a temperatura ambiente demostraron una reducción de 0.4°C en la temperatura reticular, pero regresaron a la temperatura normal del cuerpo luego de aproximadamente 15 minutos. Por otro lado, las vacas que recibieron agua fría tuvieron una reducción en temperatura reticular de 9.2°C que tiende a indicar que ésta es afectada significativamente por la ingesta de agua y puede dar lecturas falsas o imprecisas.

Actividad física

El efecto que tiene la actividad física sobre el bienestar de las vacas lecheras ha sido ampliamente evaluado en la literatura científica debido a la importancia que tiene para los distintos rasgos económicos de la producción de leche. Lamb y colaboradores (1981), estudiaron el efecto de una caminata forzada en 53 novillas Holstein y 63 vacas

Holstein, sobre varios rasgos reproductivos tales como, días al primer servicio, número de servicios por concepción y días abiertas, así como rasgos de producción tales como producción de leche diaria, composición de la leche, ganancia en peso y consumo de alimento. Los animales fueron divididos aleatoriamente en tres grupos: cero caminata, caminata de 1.6 km/d, y una caminata de 8 km/d; estos últimos dos a una velocidad de 4.0 km/h y 5 días por semana. Los resultados fueron una reducción en la ganancia de peso diaria para las que caminaron, pero no hubo beneficio de la caminata en la producción de leche ni en la eficiencia de conversión del alimento. El contenido de proteína y de sólidos no grasos en la leche fue mayor para los grupos que caminaron, con un mejor desempeño para las que caminaron distancias más cortas, mientras que no se observó un efecto en el contenido de grasa en la leche. Por otro lado, las vacas que estuvieron expuestas a caminata en general promediaron menos servicios por concepción y menos días vacías, lo que sugiere que la actividad física mejora el desempeño reproductivo de las mismas.

Coulon y colaboradores (1998), estudiaron el efecto que puede tener caminatas repetidas a las vacas sobre la producción de leche, composición química de la misma y el conteo de células somáticas en una finca experimental en Marcenat, Francia utilizando 32 animales (16 Montbeliardenes y 16 Tarentaises) en un diseño factorial 2X2. Uno de los grupos caminó 9.6 km/d por un periodo de 23 días, mientras que el otro grupo permaneció en el establo. Ambos grupos fueron alimentados con heno *ad libitum* y concentrado dependiendo del tratamiento al cual fue asignada cada vaca y su producción de leche. En este experimento encontraron que la caminata extensa por periodo de tiempo prolongado reduce la producción de leche y altera la composición

química de la misma, se reduce el largo de la pezuña y causa un aumento en el contaje de células somática, en el contenido de grasa y en la proteína de la leche lo que concuerda con los estudios hechos por Lamb y colaboradores (1981). También encontraron un aumento de 1°C en la temperatura corporal.

Berka y colaboradores (2004), analizaron el aumento en actividad física en vacas *Czech Pied* y Holstein que promediaban periodos de anestro largo, caracterizados por un intervalo entre partos de aproximadamente 400 días. Estos encontraron que las vacas de primer parto caminaban más que las adultas y que las vacas de la raza *Czech Pied* tuvieron mayor actividad física que las vacas de la raza Holstein. Por otro lado, el por ciento de concepción de las vacas con mayor actividad física fue significativamente mayor, hecho que concuerda con lo encontrado por Lamb y colaboradores (1981).

Por otro lado, las vacas que padecen de estrés por calor tienden a disminuir la actividad física (según citado por Avendaño et al., 2004). No obstante, según los trabajos citados anteriormente la actividad física en las vacas resulta en efectos muy positivos y se debe promover. Viessier y colaboradores (2008), estudiaron la diferencia en actividad física en vacas, dos grupos de 15 vacas estabuladas en (A) establos de camas amarradas o (B) establos de camas libres. En la primera prueba las vacas se mantuvieron amarradas por 27 días en establos A versus B, y en el día 28 se llevaron a una arena para hacer ejercicio por 10 minutos. En el segundo experimento los grupos de 15 vacas también estuvieron encerradas en establos A versus B a diferencia de que algunas de las vacas tuvieron acceso a ejercitarse por 1 hora diaria. Se midieron las concentraciones de ACTH y cortisol, en sangre y leche, para evaluar el

nivel de estrés en las vacas y, al igual que en el experimento 1, las vacas fueron evaluadas para determinar la actividad física en el día 28 en una arena de ejercicio donde la vaca podía caminar por 10 minutos. Las dimensiones de esta arena eran 8 X 10 metros y en una esquina colocaron un cono de tráfico para poder determinar el tiempo que la vaca utilizaba en curiosear en el área y cuanto tiempo lo utilizaba caminando realmente. Este estudio demostró que el caminar o, por el contrario, frustrarle el deseo de caminar a las vacas, no produce una respuesta de estrés crónico ni afecta la producción ni la composición de la leche. Sin embargo, los autores recomiendan que se les permita a las vacas al menos caminar una hora por día ya que encontraron que las vacas que estaban amarradas tendían a caminar más en el día 28, situación que se repitió en los dos ensayos.

Davidson y Beede (2003) estudiaron los beneficios del forzamiento de actividad física en las vacas, en un experimento con 19 Holstein no preñadas, no lactantes y multíparas, asignadas a uno de tres tratamientos: no caminata, caminata por una hora y caminata por dos horas, a una velocidad de 3 km/h. En los últimos dos tratamientos la inclinación de la caminata fue aumentando a razón de 1.6% cada 3 minutos o hasta que los latidos del corazón alcanzaron 180 palpitations por minuto. Se demostró que las vacas que estaban expuestas a la caminata tuvieron una mayor reducción en los latidos del corazón y en la concentración de ácido láctico en el plasma de la sangre, lo que sugiere que las vacas logran adaptarse a un patrón de ejercicio y mejora sus condición física lo que por consecuencia mejora su calidad de vida.

La reproducción y el estrés por calor

Una de las consecuencias serias que resulta del estrés por calor es sobre la reproducción de los animales. Jordan (2003) reportó que la mayoría de los efectos adversos del estrés por calor ocurren antes de los 42 días y después de los 40 días de la inseminación debido al efecto del estrés de calor sobre el perfil hormonal de la vaca. La utilización de tecnología reproductiva moderna como sincronización de estros y la transferencia de embriones han sido estudiados para mejorar el porcentaje de preñez durante estas épocas de estrés por calor. Dicha tecnología ha logrado aumentar en significativamente el porcentaje de preñez, sin embargo todavía no se ha logrado llegar a la eficiencia deseada en animales expuestos a los efectos adversos del estrés por calor. Por otro lado, diversos trabajos sobre el efecto del estrés por calor se han realizado para lograr métodos de manejo tales como sincronización de celo, sincronización de ovulación y transferencia de embriones durante los meses de calor, que ayuden a aumentar la eficiencia reproductiva de la vaca (Jordan, 2003).

Collier y colaboradores (1982b), estudiaron el efecto del estrés por calor en vacas preñadas en su último trimestre sobre el peso del becerro y la producción de leche. En el estudio se utilizaron 21 vacas y 10 novillas, asignadas aleatoriamente a dos grupos experimentales: sombra o no sombra. Luego del parto, estas fueron manejadas con el resto de grupo de vacas lactantes y manejadas de manera uniforme. Se tomaron datos de la tasa respiratoria, la temperatura rectal, el ritmo cardiaco y la temperatura de bulbo negro cada 4 días desde el día 199 antes del parto hasta el parto. Las vacas que no tuvieron sombra tuvieron una menor producción de leche posparto, una mayor tasa respiratoria, una mayor temperatura rectal y una mayor temperatura de

bulbo negro, utilizada como índice del efecto de la radiación solar sobre el animal, que las que estuvieron en sombra (Cuadro 1). De la misma manera, los becerros de las vacas sin sombra promediaron menos peso al nacimiento que los becerros de aquellas que si estuvieron en sombra. Este estudio también midió el perfil hormonal en las vacas midiendo los niveles de progestinas, estrona, estradiol, sulfato de estrona, tiroxina, triiodotironina, e insulina y encontraron que los perfiles hormonales de las vacas que estuvieron expuestas a sombra fueron más cerca del normal que las vacas que estuvieron al sol (Cuadro 2).

Cuadro 1: Medias de temperatura interna en animales bajo sombra versus no sombra.

	Sombra	No sombra
Tasa respiratoria resp/min	63.3±1.2	87.4±1.2
Temperatura rectal °C	39.2±0.05	40.0±0.05
Temperatura bulbo negro °C	29.8±0.25	37.5±0.25

Collier y colaboradores (1982b)

Cuadro 2: Medias de las concentración de hormonas en vacas expuestas a sombra versus no sombra.

Hormona	Sombra	No sombra
Progestinas ng/ml	5.1±1.1	6.0±1.1
Estrona pg/ml	739.3±41	859.7±41
Estradiol pg/ml	344.4±50	303.5±50
Sulfato de estrona pg/ml	4,433±150	2505±150
Tiroxina ng/ml	66.4±4.2	51.2±4.2
Triiodotironina ng/ml	1.5±0.13	1.8±0.13
Insulina unidades/ml	27.8±4	27.7±4

(Collier y colaboradores 1982b)

Lewis y colaboradores (1984), realizaron un experimento muy similar al anterior (Collier et. al, 1982) con la diferencia del perfil de las hormonas estudiadas: 13,14-dihydro-15-keto PGF₂α y progesterona y de los parámetros reproductivos estudiados:

diámetro de la cervix, ubicación del útero en el canal pélvico, días al primer celo, días a la concepción y servicios por concepción. El procedimiento experimental incluyó la toma de muestras de sangre el día del parto y luego cada lunes, miércoles y viernes hasta el día 50 postparto y un monitoreo del proceso de involución uterina mediante palpación rectal desde el séptimo día posparto. Además, establecieron un protocolo de detección de celo riguroso basado en observaciones dos veces al día. Los días abiertos, los días al primer servicio y los servicios por concepción no se vieron afectados por el estrés por calor en el periodo preparto, pero si hubo un aumento en el nivel de prostaglandinas lo que ayudó al proceso de involución uterina. En cambio, este aumento en prostaglandinas tuvo un efecto adverso en los niveles de progesterona causando periodos de celo más cortos que pueden afectar el establecimiento de una nueva preñez en el primer servicio.

Dreiling y colaboradores (1991), estudiaron los efectos del estrés por calor sobre la gestación de cabras encontrando fetos con crecimiento retardado en aquellas que estuvieron bajo los efectos del estrés por calor. Se observó además, que cuando la cabra se encuentra bajo los efectos de estrés por calor se reduce el flujo sanguíneo uterino entre un 20 y un 30% y aumenta la temperatura corporal en 1°C. Esta reducción en el flujo sanguíneo fue acompañada de un aumento significativo en los niveles de oxitocina y de la hormona antidiurética vasopresina en un 60 y un 100%, respectivamente. Esto podría indicar que el aumento en temperatura corporal conduce a un aumento en los niveles de oxitocina y de la hormona antidiurética, causando una reducción en el flujo sanguíneo intrauterino, y como consecuencia, un cambio en el metabolismo del feto de anabólico a catabólico reduciendo así el crecimiento del feto

en las cabras. Estos cambios son más notables en gemelos donde uno de ellos se ve significativamente más afectado que el otro.

Lammoglia y colaboradores (1997), estudiaron el cambio en temperatura corporal, utilizando sensores de temperatura electrónicos implantados por medio de cirugía debajo del músculo abdominal oblicuo interno, ocurrido durante el periodo periparto utilizando 7 vacas cruzas de carne inseminadas con un toro Hereford. Las variables estudiadas fueron la temperatura corporal, el perfil de las hormonas progesterona (P4), Estradiol-17 β (E2), triiodotironina (T3), Cortisol, Tirosina (T4), y 13,14-dihidro-15-keto-prostaglandina F2 α (PGFM), y la temperatura ambiental. El cambio en temperatura corporal en los periodos desde 144 hasta 56 horas antes del parto y 8 hasta 48 horas después del parto se asoció a los cambios en temperatura del ambiente y al sexo de la cría ya que encontraron que las vacas que gestaban una hembra tenían temperaturas más bajas que las vacas que gestaban un macho. Sin embargo, la reducción en la temperatura corporal durante las 48 horas antes y las 8 horas después del parto se asoció al cambio hormonal que trae consigo el proceso del parto.

Según Hansen y Arechiga (1999), el proceso de establecimiento y mantenimiento de la preñez se dificulta en vacas bajo los efectos del estrés por calor principalmente debido a la reducción en la expresión del celo y a la reducción en el porcentaje de preñez luego de la inseminación. La utilización de nuevas estrategias para reducir los efectos adversos del estrés por calor en vacas lecheras como por ejemplo la inseminación artificial a tiempo fijo y la transferencia de embriones permiten que el embrión se desarrolle bajo un ambiente artificial controlado, precisamente durante el

periodo donde se encuentra más susceptible a los efectos del estrés por calor, mejorando así el proceso de la implantación embrionaria. Otras estrategias que están siendo estudiadas para mejorar el proceso de implantación bajo condiciones de estrés por calor son la inducción de la síntesis de proteínas de trauma térmico a nivel embrionario y el uso de antioxidantes para disminuir el daño asociado al estrés por calor. Por otro lado, se ha tratado de reducir los efectos del estrés por calor por medio de la selección genética a través de vacas con el gen de pelo corto, y de la creación de nuevas razas como la Mambí y la Siboney de Cuba y la Jamaica Hope. También, se está utilizando un programa de alimentación que no genere un alto contenido de calor metabólico.

Block y colaboradores (2003), desarrollaron embriones in vitro en un medio de cultivo tratado con el Factor de Crecimiento Tipo-Insulina 1 (IGF1 por sus siglas en inglés), que luego se implantaron en vacas subrogadas tratadas con GnRH. Las vacas que recibieron embriones tratados con IGF1 promediaron un por ciento de preñez significativamente mayor, mientras que el tratamiento de las vacas con GnRH no tuvo efecto. Por otro lado Huang y colaboradores (2008) estudiaron la relación que hay entre la época del año y la tasa de concepción en vacas lecheras en Nueva York y Georgia. Estos encontraron que, por lo general, al haber un aumento en la producción de leche la tasa de concepción se reduce. Además, entre diciembre y abril la tasa de concepción fue aproximadamente un 55%, pero en mayo hubo una reducción de un 10 % en Nueva York que comenzó a recuperarse en julio. En Georgia este descenso comenzó en mayo y llegó a su mínimo en septiembre donde promedió un 31 % y no se recuperó hasta diciembre. Estos trabajos indican que la transferencia de embriones

tratados con IGF1 es recomendable especialmente en las épocas donde encontramos un mayor efecto del estrés por calor. Esto con el objetivo de poder aumentar el porcentaje de concepción mientras el animal este bajo los efectos del estrés por calor.

Materiales y Métodos:

Localización Geográfica

Este estudio fue llevado a cabo en la Vaquería de la Estación Experimental de Lajas del Recinto Universitario de Mayagüez, que se encuentra en el Valle de Lajas al suroeste de la isla a unos 27 metros sobre el nivel del mar. Donde la temperatura histórica máxima es de 31.7 °C y una precipitación anual de 1143.3 mm donde la mayoría de la lluvia cae en los meses de agosto, septiembre y octubre.

Descripción

En este experimento se utilizaron doce vacas (N=12), seis de ellas preñadas (N1=6) y seis vacías (N2=6) que se dividieron en dos tratamientos: Testigo (T0) al cual no se le indujo actividad física y Experimental (T1) el cual se le indujo actividad física mediante caminata forzada. Se hicieron dos repeticiones del experimento en dos épocas del año, en los meses de primavera (febrero y marzo) y luego en los meses de verano (agosto y septiembre). Cada repetición estuvo compuesta de un grupo nuevo de vacas y fueron sometidas a una reversión simple para un total de 24 vacas en estudio.

El primer periodo comenzó el día 15 de febrero de 2010, se tomaron datos desde las 12:00 de la media noche hasta la media noche del día 5 de marzo de 2010 finalizando el día 6 de marzo de 2010. Luego de esto el grupo de vacas tuvo un descanso de siete días y se comenzó la reversión simple, del 13 al 31 de marzo de 2010. El segundo periodo comenzó el día 14 de agosto de 2010 y culminó el 31 de agosto de 2010 para dar seis días de descanso a las vacas y se comenzó *la segunda reversión simple* que corrió del día 7 de septiembre al 24 de septiembre de 2010.

Actividad física

Las vacas fueron manejadas por estabulación parcial en un establo de camas libres donde tenían agua disponible ad libitum y heno de gramíneas tropicales. Se les proporcionó 10.9 kg de alimento concentrado dividido en dos raciones previo a cada ordeño. Luego del ordeño de la mañana, las vacas eran alojadas en el establo, y a las 10:00 horas se dividían por grupos. El grupo sujeto a caminata se ejercitó en un camino vecinal de la vaquería por una distancia total de 3.108 Km, por dos personas. Luego de la caminata las vacas regresaban al establo de camas libres y luego del ordeño de la tarde se soltaban a un predio de pastoreo cercano al establo.

Para corroborar la actividad física de las vacas en tratamiento, se utilizó el equipo Affimilk de identificación y medición que se basa en un sistema podómetros para determinar el número de pasos por día que da la vaca, utilizando una línea base individual para cada vaca. La actividad física de las vacas que se tomó utilizando este sistema no fue utilizado numéricamente en el análisis estadístico ya que la misma funciona como una variable de tipo categórica en el modelo.

Datos ambientales

Los datos de temperatura y humedad relativa se obtuvieron utilizando instrumentos electrónicos de medición de la compañía Onset Computer que registra medidas de temperaturas a intervalos definidos según la necesidad del estudio. Durante el experimento se utilizaron dos de estos instrumentos para tomar los datos y se instalaron en dos puntos dentro del área donde estuvieron alojadas las vacas del experimento y se programaron para tomar lecturas cada 5 minutos, por la duración del periodo experimental.

Las medidas de temperatura ambiental (T_{amb}) y humedad relativa (HR) obtenidas de las lecturas se ajustaron para poder determinar un índice de temperatura y humedad (ITH), utilizando la siguiente fórmula:

$$ITH = (1.8 \times T_{amb} + 32) - [(0.55 - 0.0055 \times HR) \times (1.8 \times T_{amb} - 26.8)] \text{ (NRC, 1971).}$$

Temperatura vaginal

La temperatura vaginal es un índice de la temperatura corporal, que permite la toma de datos de temperatura interna por periodos prolongados de tiempo. A diferencia de la temperatura rectal, la temperatura vaginal permite tomar los datos de manera consecutiva por varios días y, dependiendo del método de anclaje, se puede tomar hasta por varias semanas consecutivas.

Se utilizaron termómetros electrónicos (HOBO water temp pro) de la compañía Onset, colocados profundo en la vagina con un sistema de anclaje tipo pulpo de látex desarrollado por Hillman y colaboradores (2005). Estos fueron implantados en el grupo de vacas seleccionadas previamente (N=12) en los periodos anteriormente indicados.

Los termómetros fueron programados para tomar lecturas de temperatura cada 5 minutos por un periodo de 18 días consecutivos.

Antes de colocar los termómetros estos se desinfectaron en una solución de Norvasan a temperatura ambiente. Luego del periodo de toma de datos, los mismos se removieron y enjuagaron en agua clara, para remover los excesos de la mucosidad vaginal. Luego de hacer esta limpieza los datos se colectaron electrónicamente a través del módulo de interface (HOBO waterproof shuttle) diseñado para programar los termómetros y extraer los datos de los mismos.

Diseño Experimental y análisis estadístico

Se hizo un diseño factorial 2 x 2 donde se toma en cuenta actividad física (camina y no camina) y estado reproductivo (preñada y no preñada). Los datos fueron evaluados utilizando el programa SAS 9.1, utilizando un PROC MIXED donde se utilizó la temperatura vaginal como variable dependiente, y como variables independientes se utilizaron el día, la vaca, el tratamiento y el estado de gestación. La variable de ITH fue utilizada como una covariable. Luego de esto se hizo una diferencia de medias a distintos ITH y se ajustaron con una prueba de Tukey-Kramer. El modelo estadístico a seguir es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + P_j + T_k + CP_{ij} + CT_{ik} + PT_{jk} + CPT_{ijk} + E_{ijk}, \text{ donde:}$$

Y_{ijk} = Temperatura vaginal

μ = Media de la población

C_i = Efecto de la actividad física

P_j = Efecto del estado reproductivo

T_k = Efecto del ITH

CP_{ij} = Efecto interacción entre actividad física y estado reproductivo

CT_{ik} = Efecto interacción entre actividad física e ITH

PT_{jk} = Efecto interacción entre estado reproductivo ITH

CPT_{ijk} = Efecto interacción entre la actividad física, estado reproductivo e ITH

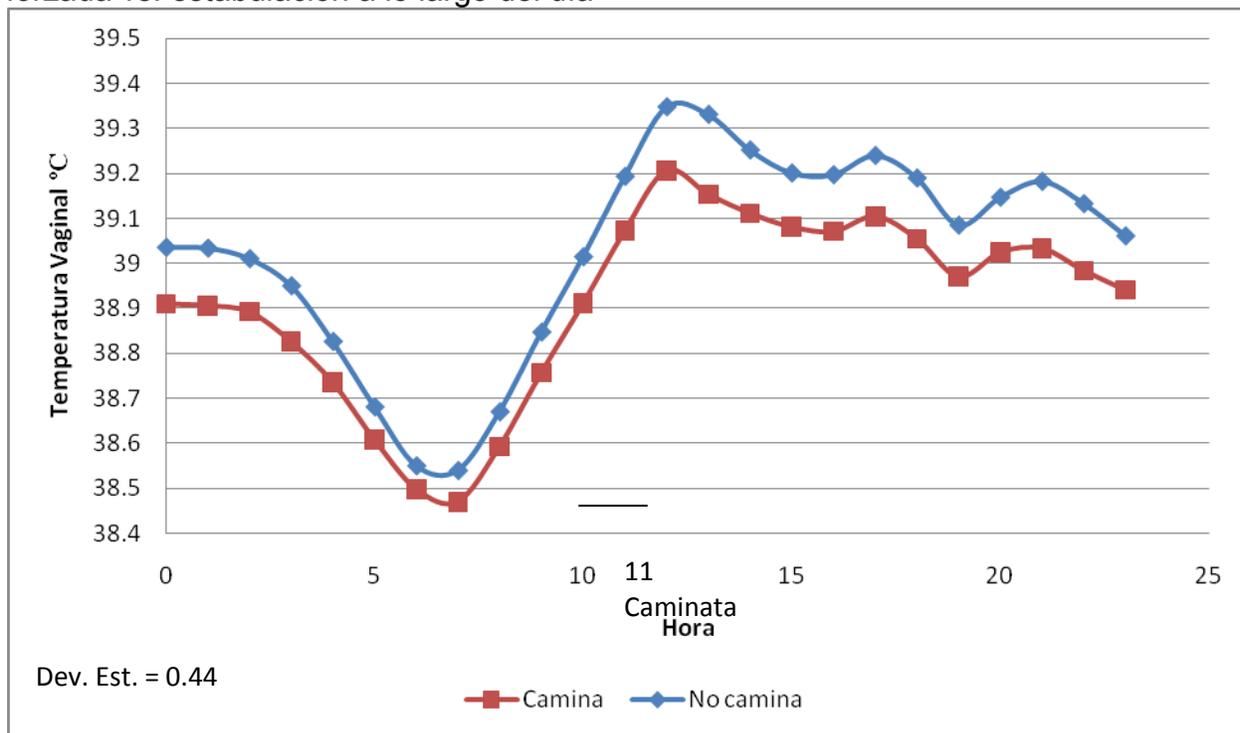
E_{ijk} = Efecto del error experimental

Resultados y Discusión

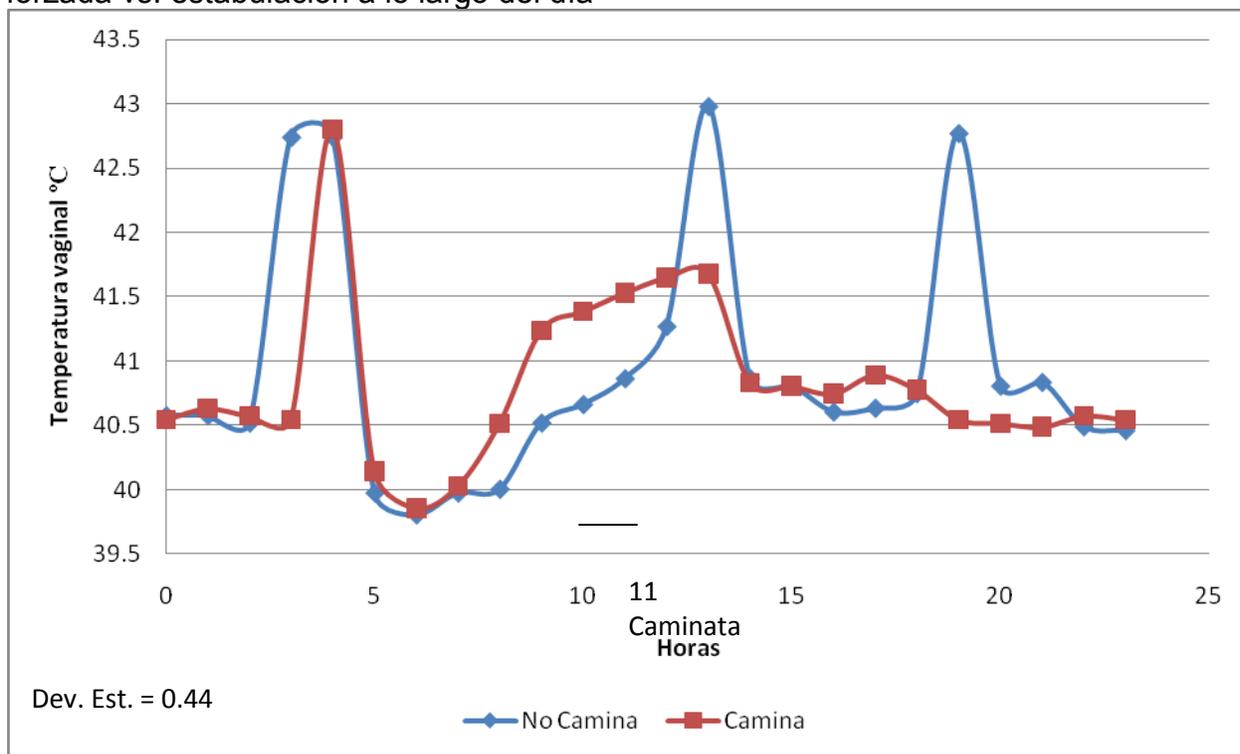
En esta investigación se evaluaron distintos parámetros de temperatura como lo fueron la media de la temperatura vaginal y de los distintos grupos parametrizada por hora, periodo o día. Similarmente se trabajó con las temperaturas máximas y el ITH. La temperatura vaginal media de todos los animales fue 39.0 ± 0.4 °C mientras que la temperatura máxima alcanzada por los animales fue 43.0 °C. El promedio de ITH fue 77.4 ± 4.4 . Durante la primera prueba se obtuvo una temperatura vaginal media de 38.7 ± 0.2 °C mientras que la temperatura máxima fue 42.7 °C y el ITH promedio fue de 75.9 ± 4.1 . En la segunda prueba la temperatura vaginal media fue de 39.2 ± 0.3 °C mientras que la temperatura máxima fue de 43.0 °C ITH promedio fue de 78.9 ± 4.1 .

En este experimento se evaluó el efecto que tenía la actividad física sobre vacas lecheras preñadas y no preñadas, bajo condiciones de estrés por calor. En el mismo se encontraron efectos no significativos a que las vacas que se expusieron a caminatas diarias por 18 días lograron tener temperaturas vaginales por debajo de las que no fueron expuestas a caminata aún tomando en cuenta las variaciones causadas por los ritmos circadianos normales de la vaca ($p= 0.2773$) (gráficas 1 y 2). De igual manera se evaluaron las tendencias del efecto del estado reproductivo y se encontró tendencias a que las vacas preñadas tuvieron temperaturas máximas por debajo de las vacas que no estaban preñadas en sus variaciones causadas por los ritmos circadianos normales aunque no se vieran diferencias en las medias de la temperatura vaginal (gráficas 3 y 4).

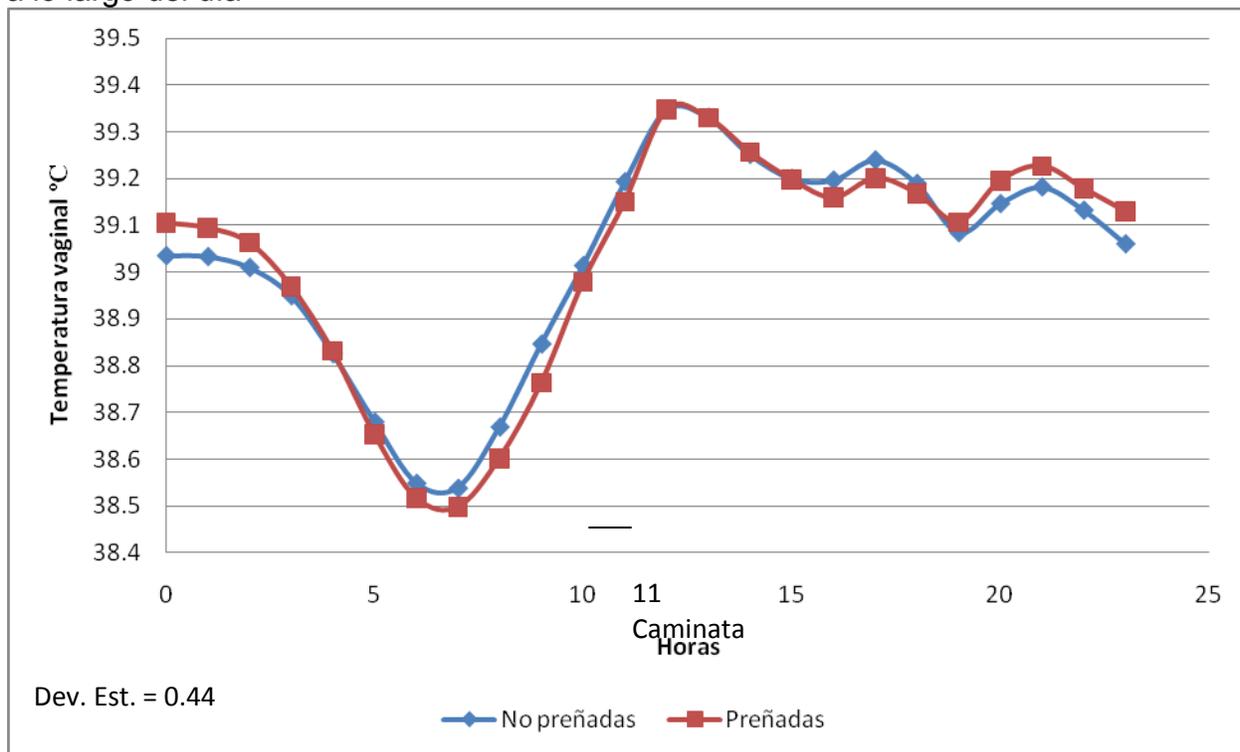
Gráfica 1: Media de la temperatura vaginal de los animales expuestos a caminata forzada vs. estabulación a lo largo del día



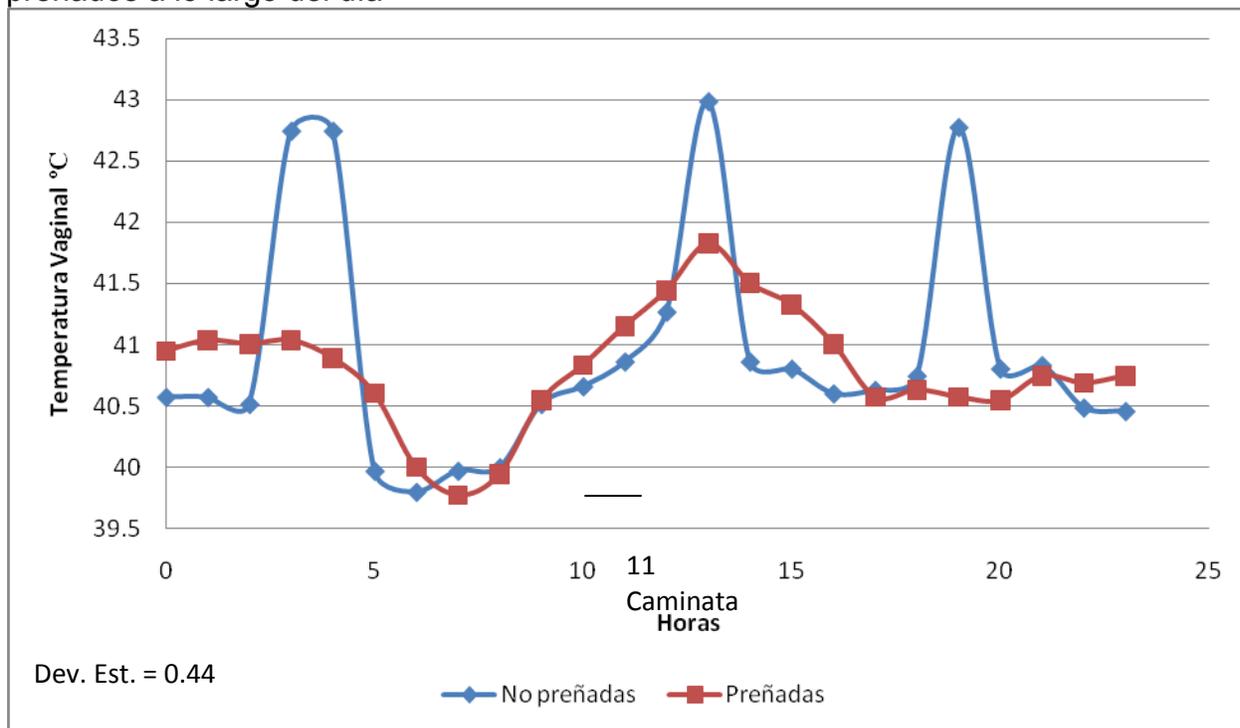
Gráfica 2: Máximas de la temperatura vaginal de los animales expuestos a caminata forzada vs. estabulación a lo largo del día



Gráfica 3: Medias de la temperatura vaginal de los animales preñados vs. no preñados a lo largo del día



Gráfica 4: Máximas de la temperatura vaginal para los animale preñados vs. no preñados a lo largo del día



Se encontró que las vacas que estuvieron expuestas a caminata tanto preñadas como no preñadas tuvieron una media de temperatura vaginal igual (38.9 ± 0.2 °C ambos grupos) mientras que entre las que no caminaban hubo una diferencia entre las preñadas y las no preñadas (39.0 ± 0.3 °C y 39.1 ± 0.2 °C, respectivamente) (gráfica presentada en el anejo 1A). Se debe tomar en cuenta que se están tomando todos los periodos de tiempo que cubrió el experimento especialmente las diferencias en clima. Por tal razón, se realizó un análisis más profundo, ya que se sabe que existe una diferencia entre las características ambientales entre los meses de primavera y verano, generando así diferencias marcadas entre los resultados de un grupo y el otro (efecto presentado en gráficas en los anejos 2A, 2B, 2C y 2D).

Durante este periodo también se analizó el efecto combinado del tratamiento y el estado de gestación. Aquí se encontró que las vacas preñadas que fueron expuestas a caminata tuvieron temperaturas medias más bajas, seguidas por las preñadas no ejercitadas, las no preñadas ejercitadas y las no preñadas no ejercitadas (datos presentados en el cuadro 3 y en la gráfica 5).

Los cúspides de temperatura vaginal repetitivas a las mismas horas sugieren que las mismas se deben a los ritmos circadiánicos de los animales. Esto se debe a que los cúspides de la temperatura de la vagina de la vaca responden a las variaciones en ITH mostrando que la vaca responde de manera retrasada a la variación en los factores ambientales lo que concuerda con lo encontrado por Bitman y colaboradores (1984). En su experimento, ellos intentaron buscar el cambio en temperatura causado por los ritmos circadianos y ultradianos de las vacas. Estos encerraron 6 vacas Holstein en

cámaras experimentales con ambiente controlado y las vacas se ejercitaban dos veces al día en el exterior. Se encontró un patrón de temperatura ambiental parecido al que se encontró en este experimento especialmente el patrón de los cúspides en la temperatura interna del animal. Al analizar las gráficas de Bitman y colaboradores hay dos cúspides de temperatura interna que concuerdan con el presente trabajo, uno temprano en la mañana y otro en la tarde. Estos cúspides han sido asociados anteriormente con el calor metabólico por la digestión y la liberación de calor acumulada durante el día y liberada como método de recuperación.

Por otro lado, se hizo la misma evaluación utilizando las temperaturas máximas alcanzadas por los animales. Las vacas que demostraron temperaturas máximas más bajas fueron las preñadas que estuvieron expuestas a caminata (temperatura máxima 40.4 °C a las 12:00 horas), mientras que las vacas no preñadas que estaban en caminata demostraron temperaturas máximas de hasta 41.3 °C a las 04:00 horas. Por otro lado, las vacas preñadas que no caminaron tuvieron temperaturas máximas de 41.6 °C a las 13:00 horas y las vacas no preñadas que no caminaron mostraron temperaturas de 41.9 °C a las 13:00 horas. Estas cúspides de temperatura máxima concuerdan con los puntos máximos causados por el ritmo circadiano normal de las vacas, lo que podría ser indicativo de que la combinación de caminata y preñez ayuda a mantener temperaturas internas más bajas y reduce el impacto del estrés por calor de las vacas (resultados específicos en la cuadro 4 y en la gráfica 6).

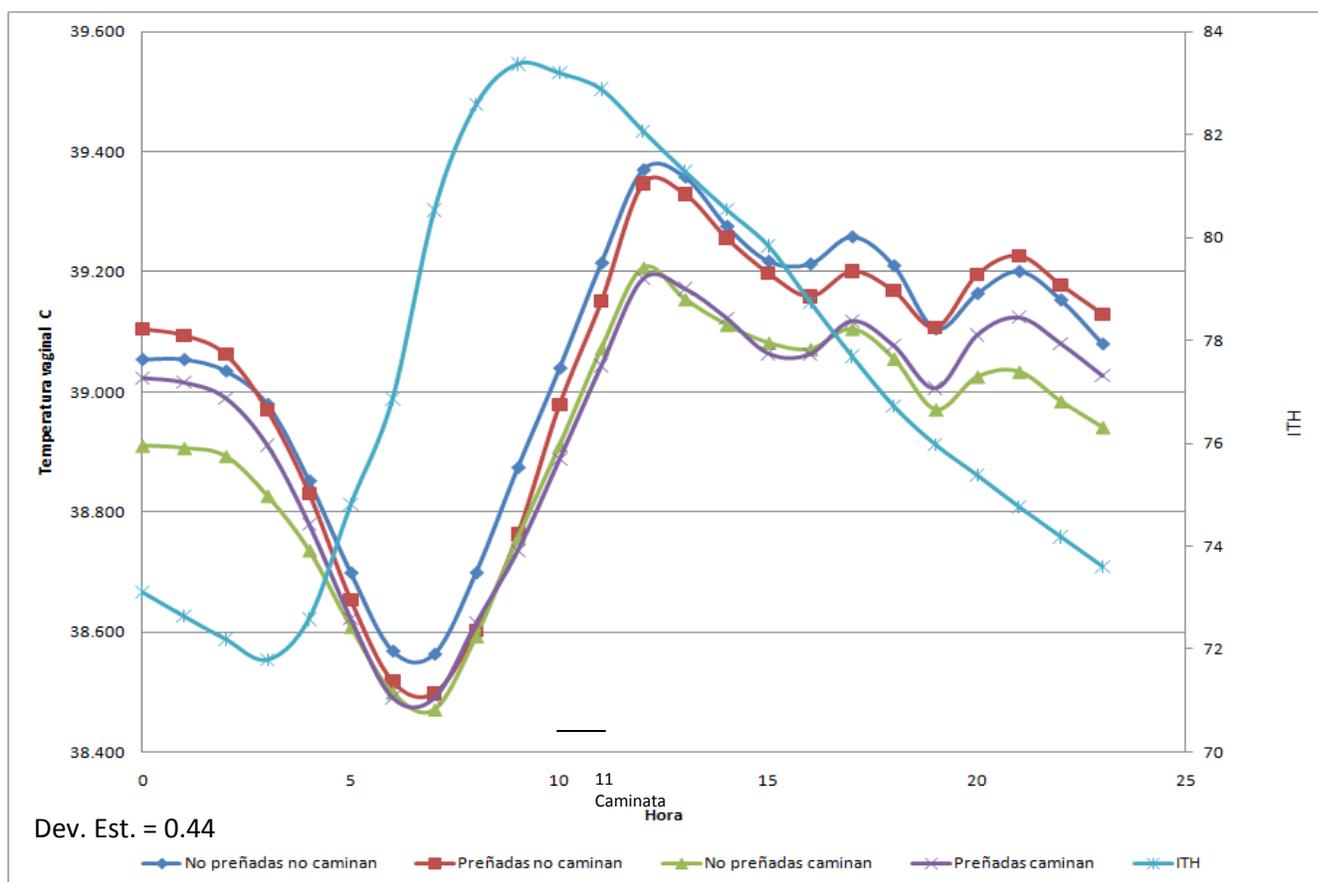
Cuadro 3: Medias de la temperatura vaginal para las vacas en los cuatro tratamientos a los largo del día.

Hora	Camina preñada	Camina no preñada	No camina preñada	No camina no preñada	Media ITH
0	39.024±0.37	38.910±0.52	39.105±0.48	39.053±0.45	73.109±1.30
1	39.016±0.37	38.906±0.49	39.094±0.47	39.053±0.43	72.638±1.31
2	38.990±0.35	38.892±0.47	39.063±0.46	39.034±0.41	72.19±1.32
3	38.911±0.37	38.826±0.45	38.970±0.47	38.979±0.42	71.789±1.49
4	38.780±0.34	38.736±0.43	38.831±0.43	38.851±0.39	72.584±3.08
5	38.622±0.31	38.608±0.34	38.653±0.37	38.698±0.34	74.807±6.10
6	38.490±0.31	38.499±0.36	38.517±0.34	38.567±0.35	76.868±6.28
7	38.490±0.30	38.470±0.39	38.497±0.34	38.562±0.34	80.53±4.20
8	38.615±0.29	38.592±0.41	38.602±0.36	38.698±0.35	82.584±2.45
9	38.736±0.38	38.757±0.45	38.763±0.41	38.873±0.39	83.377±1.97
10	38.888±0.36	38.911±0.51	38.978±0.47	39.039±0.44	83.2±2.09
11	39.044±0.39	39.072±0.57	39.151±0.54	39.214±0.49	82.882±1.87
12	39.189±0.42	39.206±0.61	39.347±0.65	39.369±0.54	82.07±1.41
13	39.172±0.38	39.154±0.54	39.330±0.55	39.357±0.53	81.285±0.78
14	39.123±0.39	39.111±0.52	39.256±0.50	39.275±0.52	80.54±0.45
15	39.064±0.42	39.081±0.54	39.198±0.54	39.217±0.56	79.838±0.51
16	39.063±0.41	39.071±0.52	39.159±0.46	39.212±0.52	78.745±0.36
17	39.118±0.41	39.104±0.57	39.201±0.45	39.258±0.54	77.695±0.49
18	39.077±0.40	39.055±0.56	39.168±0.46	39.210±0.53	76.72±0.72
19	39.006±0.37	38.970±0.53	39.107±0.44	39.104±0.51	75.974±0.71
20	39.095±0.36	39.025±0.51	39.196±0.44	39.163±0.48	75.377±0.70
21	39.124±0.37	39.033±0.52	39.227±0.45	39.200±0.45	74.764±0.89
22	39.080±0.35	38.984±0.52	39.178±0.46	39.152±0.45	74.181±1.18
23	39.027±0.35	38.941±0.50	39.130±0.47	39.079±0.45	73.603±1.42

Medias y desviación estandar

Al observar las gráficas 5 y 6 se encontró que el comportamiento de las distintas combinaciones de actividad física y estado reproductivo es parecido, ya que se encontró el mismo orden en los tratamientos. En ambas gráficas se encontró que la mayor parte de los efectos se deben a la variación del efecto ambiental (representado por la media de ITH), mientras que el efecto de la preñez y el efecto del tratamiento tiende a contrarrestar el efecto ambiental.

Gráfica 5: Medias de la temperatura vaginal para los animales en los cuatro tratamientos a lo largo del día



De igual manera se parametrizó utilizando distintos periodos del día tomando tres grupos de 8 horas cada uno, el primer periodo (mañana) se extiende desde la hora 0 hasta la hora 7, el segundo periodo (medio día) se extiende desde la hora 8 hasta la hora 15 y por último el tercer periodo (tarde) desde la hora 16 hasta la hora 23. Aquí se encontró un patrón similar en los dos extremos de los parámetros, o sea que las vacas que caminaron y estaban preñadas registraron temperaturas más bajas que las demás, mientras que las que no caminaron y no estaban preñadas registraron las temperaturas más altas. Las vacas no preñadas que caminaron registraron temperaturas tan altas

como las que que no caminaron y no estaban preñadas pero, en la tarde, éstas descendieron hasta llegar a la misma temperatura que las que caminaron y estaban

Cuadro 4: Máximas de la temperatura vaginal para los animales en los cuatro tratamientos a lo largo del día

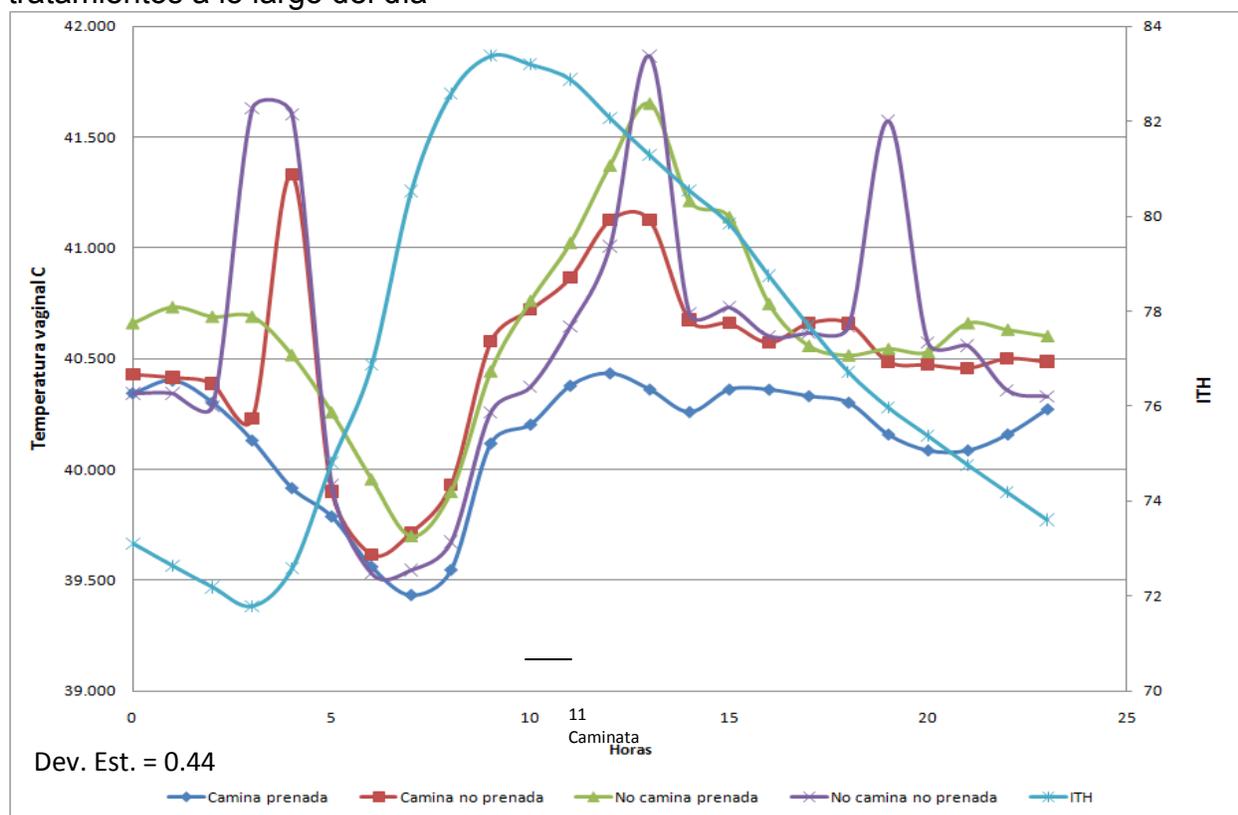
Hora	Camina preñada	Camina no preñada	No camina preñada	No camina no preñada	Media THI
0	40.344±0.37	40.429±0.52	40.661±0.48	40.344±0.45	73.109±1.30
1	40.401±0.37	40.416±0.49	40.733±0.47	40.344±0.43	72.638±1.31
2	40.301±0.35	40.387±0.47	40.690±0.46	40.287±0.41	72.19±1.32
3	40.131±0.37	40.229±0.45	40.690±0.47	41.630±0.42	71.789±1.49
4	39.916±0.34	41.330±0.43	40.517±0.43	41.601±0.39	72.584±3.08
5	39.788±0.31	39.900±0.34	40.258±0.37	39.929±0.34	74.807±6.10
6	39.562±0.31	39.616±0.36	39.957±0.34	39.531±0.35	76.868±6.28
7	39.433±0.30	39.716±0.39	39.701±0.34	39.546±0.34	80.53±4.20
8	39.547±0.29	39.931±0.41	39.900±0.36	39.673±0.35	82.584±2.45
9	40.117±0.38	40.577±0.45	40.444±0.41	40.258±0.39	83.377±1.97
10	40.202±0.36	40.721±0.51	40.761±0.47	40.373±0.44	83.2±2.09
11	40.378±0.39	40.866±0.57	41.022±0.54	40.646±0.49	82.882±1.87
12	40.434±0.42	41.125±0.61	41.371±0.65	41.007±0.54	82.07±1.41
13	40.361±0.38	41.126±0.54	41.649±0.55	41.865±0.53	81.285±0.78
14	40.259±0.39	40.675±0.52	41.211±0.50	40.703±0.52	80.54±0.45
15	40.361±0.42	40.660±0.54	41.138±0.54	40.732±0.56	79.838±0.51
16	40.360±0.41	40.573±0.52	40.747±0.46	40.602±0.52	78.745±0.36
17	40.331±0.41	40.660±0.57	40.559±0.45	40.617±0.54	77.695±0.49
18	40.301±0.40	40.660±0.56	40.516±0.46	40.645±0.53	76.72±0.72
19	40.158±0.37	40.487±0.53	40.545±0.44	41.573±0.51	75.974±0.71
20	40.086±0.36	40.473±0.51	40.530±0.44	40.574±0.48	75.377±0.70
21	40.086±0.37	40.458±0.52	40.660±0.45	40.560±0.45	74.764±0.89
22	40.158±0.35	40.501±0.52	40.631±0.46	40.358±0.45	74.181±1.18
23	40.272±0.35	40.487±0.50	40.602±0.47	40.329±0.45	73.603±1.42

Medias y desviación estandar

preñadas. Las vacas que no caminaron y estaban preñadas tuvieron temperaturas más elevadas que las que caminaron y estaban preñadas pero menor a las que no caminaron y no estaban preñadas (datos en cuadro 5 y gráfica 7). Cabe mencionar que el patrón de las distintos grupos, excepto por los animales que caminaron y no estaban preñadas, tienden a ser el mismo lo que sugiere que las vacas siguieron un mismo patrón de ritmos circadianos. Por otro lado, la línea que no sigue este patrón

pone en evidencia el efecto de la caminata ya que la misma comienza con una temperatura alta y disminuye durante el día lo que sugiere un posible efecto de la caminata en la regulación térmica ya que en esta no influye en la preñez.

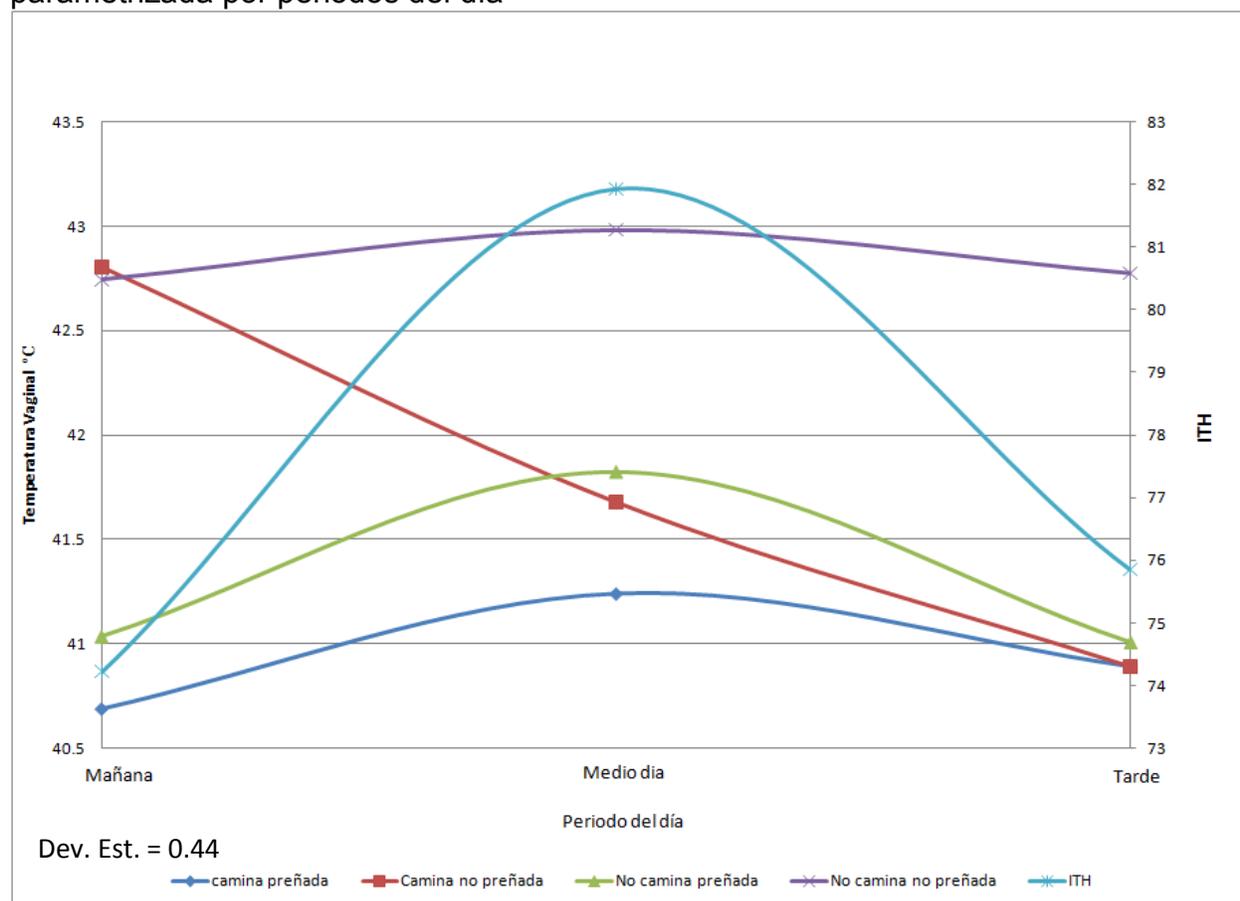
Gráfica 6: Máximas de la temperatura vaginal de los animales en los cuatro tratamientos a lo largo del día



Cuadro 5: Máximas de temperatura vaginal para los cuatro tratamientos e ITH parametrizada por periodos del día

Per_día	Camina		No camina		Media THI
	Preñada	No preñada	Preñada	No preñada	
Mañana	40.688	42.803	41.036	42.743	74.22321269
Mediodía	41.239	41.678	41.825	42.983	81.93444389
Tarde	40.891	40.891	41.007	42.773	75.8543921

Gráfica 7: Máximas de temperatura vaginal para los cuatro tratamientos e ITH parametrizada por periodos del día



El efecto fijo de la actividad física no fue significativo ($P=0.2773$), sin embargo, el efecto fijo del estado reproductivo fue altamente significativo ($P=0.0002$). Por otro lado, la actividad física se vio envuelta en varias interacciones, especialmente con los factores que tienen que ver con los efectos ambientales que afectan la temperatura vaginal de la vaca.

La alta significancia de la variable fecha puede indicar dos efectos, el primero es la variación ambiental diaria y el segundo efecto es un posible efecto de adaptación al tratamiento. La media ITH básicamente explica el efecto ambiental sobre la temperatura vaginal de la vaca. Según Lefcourt y Adams (1996), la temperatura interna de las vacas está altamente correlacionada con la temperatura del aire. Una vez

ésta sobrepasa los 25.6 °C, cada aumento de 5 °C que aumente la temperatura del aire por encima de la temperatura crítica resulta en un aumento de 0.4 °C por encima de 38.6 °C que es la temperatura de la vaca cuando se encuentra en el límite superior de su rango de confort (Wilson et al, 1998).

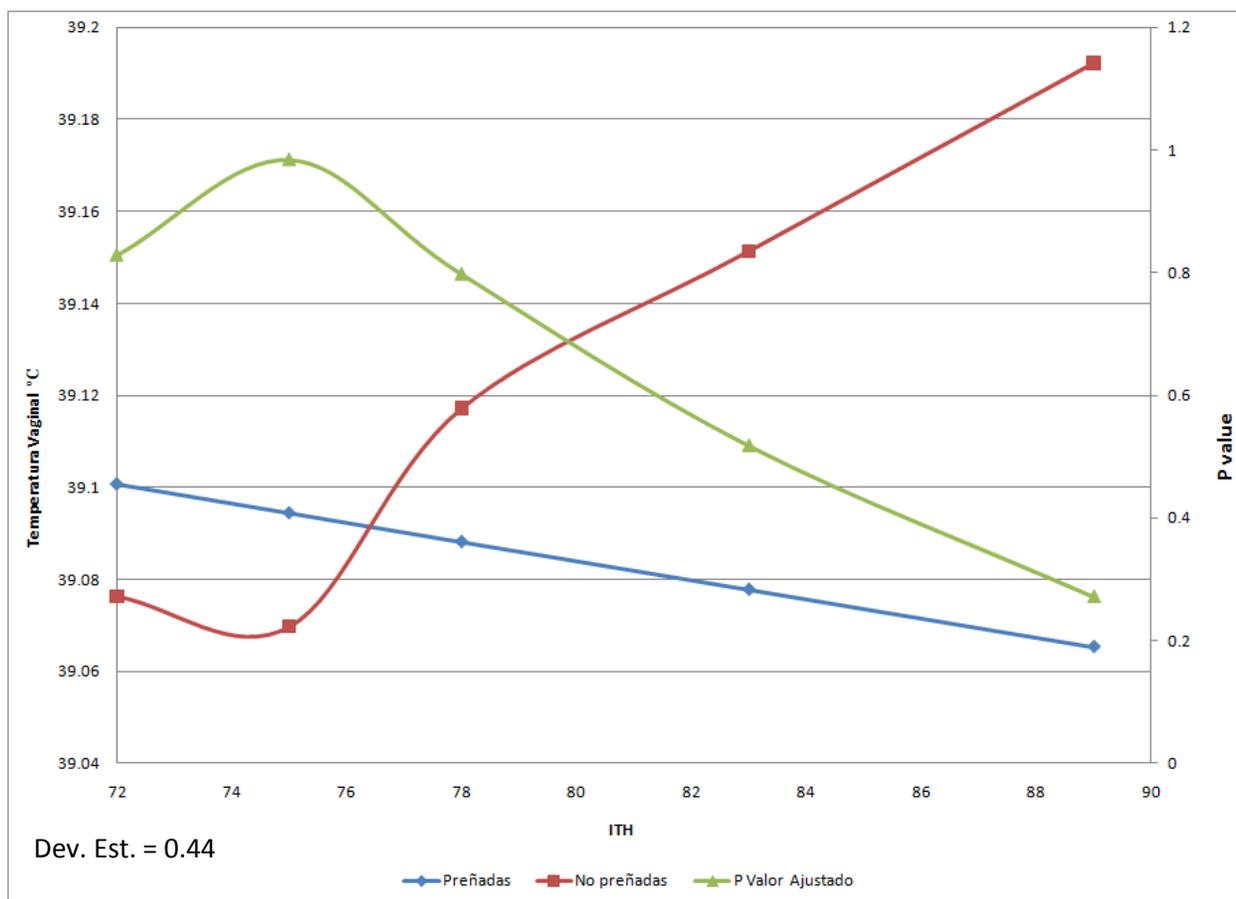
El efecto significativo de la preñez ($P=0.0002$), puede deberse a cambios en el flujo sanguíneo que requiere el animal cuando está en gestación. Esto concuerda con lo encontrado por Lublin y Wolfenson (1996), en este experimento ellos midieron el flujo sanguíneo de conejas lactando y preñadas bajo estrés calórico. El flujo sanguíneo de las conejas preñadas fue mayor especialmente en aquellas que se encontraban a mediana y tardía gestación. Esto se debe al aumento en el flujo de sangre que llega al útero. Esto evidencia que el efecto del aumento en el flujo sanguíneo aumenta la capacidad de intercambio de calor del animal lo cual le ayudará a poder reducir su temperatura interna. Este efecto es más visible en la medida en que la vaca está expuesta a condiciones ambientales más adversas. En la prueba de cuadrados medios mínimos efectuada en el presente estudio, se puede observar como el efecto de la preñez genera diferencias significativas mayores a medida aumenta el ITH, aunque no se haya encontrado una diferencia significativa entre las preñadas y las no preñadas (datos presentados en cuadro 6 y gráfica 8).

Cuadro 6: Diferencia de medias cuadradas minimas de los animales preñados vs. los no preñados a ITH especificos

ITH	Preñada	No preñada	Valor P
72	39.10±0.08	39.08±0.08	0.83
75	39.10±0.08	39.07±0.08	0.98
78	39.09±0.08	39.12±0.08	0.80
83	39.08±0.08	39.15±0.08	0.52
89	39.07±0.08	39.19±0.08	0.27

Medias y error estandar

Gráfica 8 : Diferencia de medias cuadradas minimas de los animales preñados vs. los no preñados a ITH especificos



Cuando se analiza el efecto de la actividad física, se observó un patrón en las vacas que caminaron a tener una menor temperatura vaginal. Esto es contrario a lo reportado por Mousel y colaboradores (2001), los cuales evaluaron la actividad física y la temperatura interna de ratones genéticamente seleccionados para eliminación efectiva de calor. Ellos encontraron que los animales que fueron seleccionados para una alta pérdida de calor tuvieron mayor actividad que los animales que fueron seleccionados para baja pérdida de calor y el grupo testigo, pero los que tuvieron mayor actividad física demostraron tener promedios de temperatura interna mayores que los otros.

Este experimento también contrasta con el trabajo hecho por Coulon y colaboradores (1998) en Marceant, Francia los cuales encontraron un aumento de 1 °C en los animales expuestos a caminatas extensas por largos periodos de tiempo. A diferencia del trabajo de Coulon y colaboradores (1998) las vacas del presente estudio caminaron una tercera parte de la distancia recorrida por los animales de dicho experimento, además del factor localización de clima templado versus clima tropical húmedo.

En este experimento se encontró que caminar no es significativo por sí solo. Sin embargo al considerar el ITH se encontraron diferencias altamente significativas entre caminar y no caminar. Las vacas de ese tratamiento mantuvieron una temperatura interna menor y más estable que las vacas que no estuvieron expuestas a caminata (datos presentados en la cuadro 7 y gráfica 9)

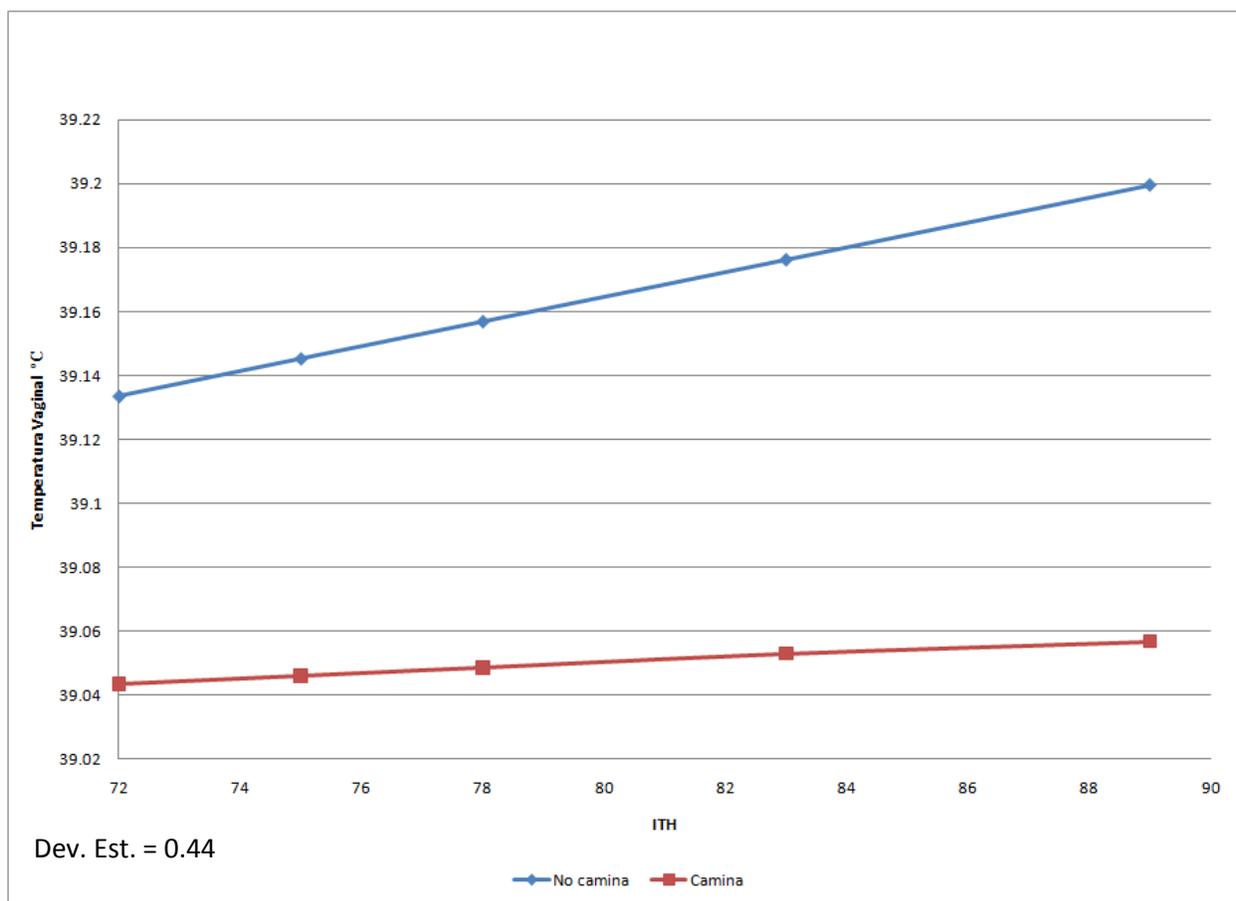
La gran mayoría de los efectos encontrados se podrían atribuir a las interacciones entre variables. Estas interacciones sugieren que hay una combinación de efectos que dejan espacio abierto para investigaciones futuras donde se pueda medir el cambio en flujo de sangre, especialmente hacia la superficie de la vaca generando que haya un mecanismo de enfriamiento mejor al animal ser expuestos a un clima caliente y húmedo pero con una corriente de aire natural casi constante.

Cuadro 7: Diferencia de medias cuadradas mínimas de los animales que caminaron vs. los que estaban estabulados a ITH específicos

ITH	Caminata	Estabulación	Valor P
72	39.04±0.54	39.13±0.54	<0.0001
75	39.05±0.54	39.15±0.54	<0.0001
78	39.05±0.54	39.16±0.54	<0.0001
83	39.05±0.54	39.18±0.54	<0.0001
89	39.06±0.56	39.20±0.56	<0.0001

Medias y error estandar

Gráfica 9: Diferencia de medias cuadradas mínimas de los animales que caminaron vs. los que estaban estabulados a ITH específicos



Conclusión

En esta investigación se encontró que los animales expuestos a caminatas lograron tener temperaturas internas menores que los animales que no fueron expuestos a caminata. De manera similar se observó el efecto del estado reproductivo; los animales que tuvieron menor temperatura fueron los que estaban preñados y caminaban. Este resultado es distinto a lo que se pensaba ya que los animales en estado de preñez tienden a tener un mayor peso por lo tanto se pensaría que generarían más calor al ser expuestos a caminatas largas.

Por lo tanto, el mal diseño de algunas vaquerías, que hacen que sus animales caminen en prácticas rutinarias más de lo necesario, no necesariamente afecta adversamente al animal, sino que podría beneficiarle desde el punto de vista reproductivo y de salud. Tanto es así que en los trabajos citados y descritos demuestran que es beneficioso proveer tiempo de ejercicio a las vacas ya que en sistemas de restricción de movimiento las vacas tienden a deprimirse y se alteran los patrones hormonales que conducen al estrés (Davidson y Beede 2003). En otro estudio se encontró que las vacas con largos periodos de anestro tendían a aumentar su actividad física como conducta natural (Berka et al., 2004) Esto deja la puerta abierta para seguir la investigación en esta área ya que hubo variables que no se pudieron medir en este experimento, tales como el movimiento de calor del interior de la vaca hacia su exterior y su comparación con el flujo de sangre y la producción de leche.

Literatura Citada

- Avendaño, L., F. D. Álvarez, A. Correa, J. S. Saucedo, F. Rivera, F. J. Verdugo, C. F. Arechiga and P. H. Robinson. 2007. Evaluación de un sistema de enfriamiento aplicado en el periodo seco de ganado lechero durante el verano. *Tec. Pecu. Mex.* 45(2):209-225.
- Bergen, R. D. and A. D. Kennedy. 2000. Relationship between vaginal and tympanic membrane temperature in beef heifers. *Can. J. Anim. Sci.* 80: 515–518.
- Berka, T., M. Stipkova, J. Volek, D. Rehak, G. Mateju and F. Jilek. 2004. Monitoring of physical activity for management of cow reproduction. *Czech J. Anim. Sci.*, 49(7): 281–288.
- Berman, A., Y. Folman, M. Kaim, M. Mamen, Z. Herz, D. Wolfenson, A. Arieli, and Y. Graber. 1985. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical climate. *J. Dairy Sci.* 68:1488–1495.
- Bewley, J. M., M. E. Einstein, M. W. Grott, and M. M. Schutz. 2008 A. Comparison of reticular and rectal core body temperatures in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:4661–4672.
- Bewley, J. M., M. W. Grott, M. E. Einstein and M. M. Schutz. 2008 B. Impact of intake water temperatures on reticular temperatures of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:3880–3887.
- Biggers, B. G., R. D. Geisert, R. P. Wetteman, and D. S. Buchanan. 1987. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. *J. Anim. Sci.* 64:1512–1518.
- Bitman, J., A. Lefcourt, D. L. Wood and B. Stroud. 1984. Circadian and ultradian temperature rhythms of lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 67:1014-1023.
- Block, J., M. Drost, R. L. Monson, J. J. Rutledge, R. M. Rivera, F. F. Paula-Lopes, O. M. Ocon, C. E. Krininger, III, J. Liu and P. J. Hansen. 2003. 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.* 81:1590-1602.
- Bohmanova, J., I. Misztal, and J. B. Cole. 2007. Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. *J. Dairy Sci.* 90:1947–1956.
- Bouraoui, R., M. Lahmar, A. Majdoub, M. Djemali, and R. Belyea. 2002. The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Anim. Res.* 51:479–491.

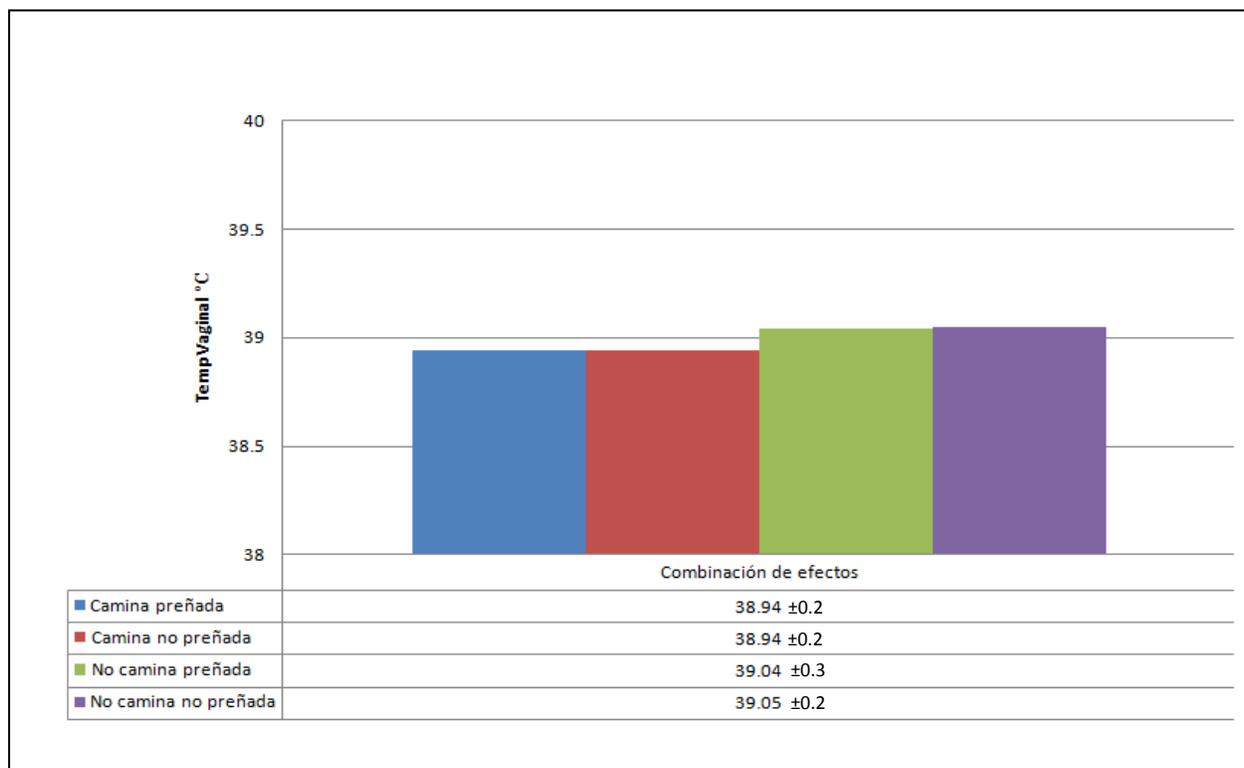
- Collier, R. J., D. K. Beede, W. W. Thatcher, L. A. Israel, and C. J. Wilcox. 1982a. Influences of environment and its modification on dairy animal health and production. *J. Dairy Sci.* 65:2213–2227.
- Collier, R. J., S. G. Dodger, H. H. Head, W. W. Thatcher, and C. J. Wilcox. 1982b. Effects of heat stress during pregnancy on maternal hormone concentrations, calf birth weight and postpartum milk yield of Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 54:309.
- Collier, R. J., G. E. Dahl and M. J. VanBaale. 2006. Major advances with environmental effects on dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89:1244-1253.
- Correa-Calderón, A., D. Armstrong, D. Ray, S. DeNise, M. Enns, and C. Howison. 2004. Thermoregulatory responses of Holstein and Brown Swiss heat-stressed dairy cows to two different cooling systems. *Int. J. Biometeorol.* 48:142–148.
- Coulon, J. B., P. Pradel, T. Cochard, and B. Poutrel. 1998. Effect of Extreme Walking Conditions for Dairy Cows on Milk Yield, Chemical Composition and Somatic Cell Count. *J Dairy Sci* 81:994–1003.
- Davidson, J. A. and D. K. Beede. 2003. A System to Assess Fitness of Dairy Cows Responding to Exercise Training. *J. Dairy Sci.* 86:2839–2851.
- Dikmen, S. and P. J. Hansen. 2009. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? *J. Dairy Sci.* 92:109–116.
- Drieling, C. E., F. S. Carman and D. E. Brown. 1991. Maternal Endocrine and Fetal Metabolic Responses to Heat Stress. *J. Dairy Sci.* 74:312-327.
- Gangwar, P. C., C. C. Branton, and D. L. Evans. 1965. Reproductive and physiological responses of Holstein heifers to controlled and natural climatic conditions. *J. Dairy Sci.* 48:222–227.
- Hansen, P. J. y C. F. Arechiga. 1999. Strategies for managing reproduction in the heat stressed dairy cow. *J. Anim. Sci.* 77:36-50.
- Hillman, P. E., K. G. Gebremedhin, S. T. Willard, C. N. Lee and A. D. Kennedy. 2005. Continuous measurements of vaginal temperature of female cattle using a data logger encased in a plastic anchor. *App. Eng. Ag.* 25(2): 291-296.
- Howell, J. L., J. W. Fuquay, and A. E. Smith. 1994. Corpus luteum growth and function in lactating Holstein cows during spring and summer. *J. Dairy Sci.* 77:735–739.

- Huang, C., S. Tsuruta, J. K. Bertrand, I. Misztal, T. J. Lawlor, and J. S. Clay. 2008. Environmental Effects on Conception Rates of Holsteins in New York and Georgia. *J. Dairy Sci.* 91:818–825.
- Igono, M. O., and H. D. Johnson. 1990. Physiological stress index of lactating dairy cows based on diurnal pattern of rectal temperature. *J. Interdiscip. Cycle Res.* 21:303–320.
- Igono, M. O., B. J. Steevens, M. D. Shanklin, and H. D. Johnson. 1985. Spray cooling effects on milk production, milk, and rectal temperatures of cows during a moderate temperate summer season. *J. Dairy Sci.* 68:979–985.
- Ingraham, R. H., R. W. Stanley, and W. C. Wagner. 1976. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in Hawaii. *J. Dairy Sci.* 59:2086–2090.
- Johnson, H. D. 1987. Bioclimates and livestock. *Bioclimatology and the Adaptation of Livestock*. World Animal Science. (H. D. Johnson, ed.) Elsevier Science Publ. Co., New York.
- Jordan, E.R. 2003. Effects of heat stress on reproduction. *J. Dairy Sci.* 86: E104-114.
- Kriss, M., Observations on the body temperature of dry cows proceedings of the national academy of sciences 6: 539-541.
- Lamb, R. C., M. J. Anderson, and J. L. Walters. 1981. Forced Walking Prepartum for Dairy Cows of Different Ages. *J. Dairy Sci.* 64:2017-2024.
- Lammoglia, M. A., R. A. Bellows, R. E. Short, S. E. Bellows, E. G. Bighorn, J. S. Stevenson and R. D. Randel. 1997. Body temperature and endocrine interactions before and after calving in beef cows. *J. Anim. Sci.* 75:2526-2534.
- Lefcourt, A. M., y W. R. Adams. 1996. Radiotelemetry measurement of body temperatures of feedlot steers during summer. *J. Anim. Sci.* 74: 2633-2640.
- Lewis, G. S., W. W. Thatcher, E. L. Bliss M. Drost and R. J. Collier. 1984. Effects of heat stress during pregnancy on postpartum reproductive changes in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 58:174-186.
- Lublin, A. and D. Wolfenson. 1996. Lactation and pregnancy effects on blood flow to mammary and reproductive system in heat-stressed rabbits. *Comp. Biochem. Physiol.* 115A, No. 4: 277-285.
- Mousel, M. R., W. W. Stroup and M. K. Nielsen. 2001. Locomotor activity, core body temperature and circadian rhythm in mice selected for high and low heat loss. *J. Anim. Sci.* 79:861-868.

- Nardone, A., N. Lacetera, U. Bernabucci, and B. Ronchi. 1997. Composition of colostrum from dairy heifers exposed to high air temperatures during late pregnancy and the early postpartum period. *J. Dairy Sci.* 80:838–844.
- NRC. 1971. *A Guide to Environmental Research on Animals*. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
- Ravagnolo, O., and I. Misztal. 2000. Genetic component of heat stress in dairy cattle, parameter estimation. *J. Dairy Sci.* 83:2126–2130.
- St-Pierre, N. R., B. Cobanov, and G. Schnitkey. 2003. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *J. Dairy Sci.* 86(E Suppl.):E52–E77.
- Veissier, I., S. Andanson, H. Dubroeuq and D. Pomiès. 2008. The motivation of cows to walk as thwarted by tethering. *J. Anim. Sci.* 86:2723-2729.
- West, J. W. 2003. Effects of heat stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86: 2131-2144.
- Wilson, S. J., R. S. Marion, J. N. Spain, D. E. Spiers, D. H. Keisler, and M. C. Lucy. 1998. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81:2124–2131.
- Wise, M. E., D. V. Armstrong, J. T. Huber, R. Hunter, and F. Wiersma. 1988. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *J. Dairy Sci.* 71:2480–2485.
- Wolfenson, D., I. Flamenbaum, and A. Berman. 1988a. Dry period heat stress relief effects on prepartum progesterone, calf birth weight, and milk production. *J. Dairy Sci.* 71:809–818.
- Wolfenson, D., I. Flamenbaum, and A. Berman. 1988b. Hyperthermia and body energy store effects on estrous behavior, conception rate, and corpus luteum function in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71:3497–3504.
- Yousef, M. K. 1984. Stress physiology: definition and terminology. In: Yousef, M.K. (Ed.) *Stress Physiology in Livestock*. pp 3–7. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Yousef, M. K. 1985. *Stress physiology in livestock*. CRC Press, Boca Raton, FL.

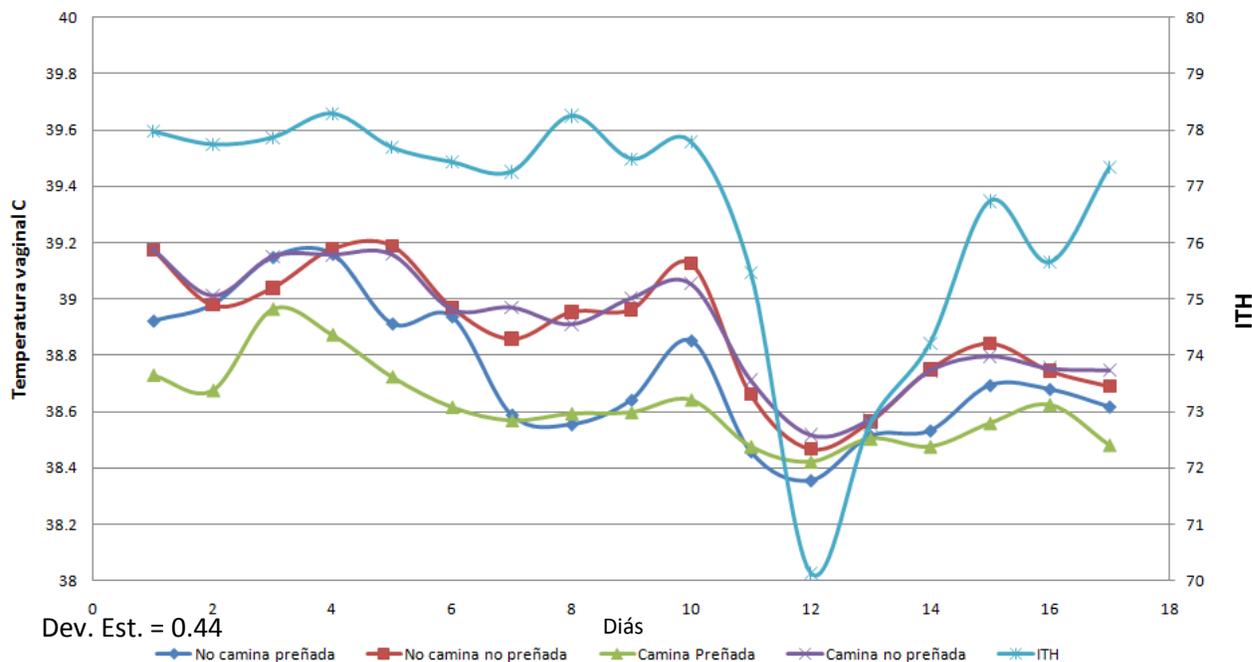
Anejo1

Gráfica de medias de temperatura vaginal generales de la investigación de los cuatro



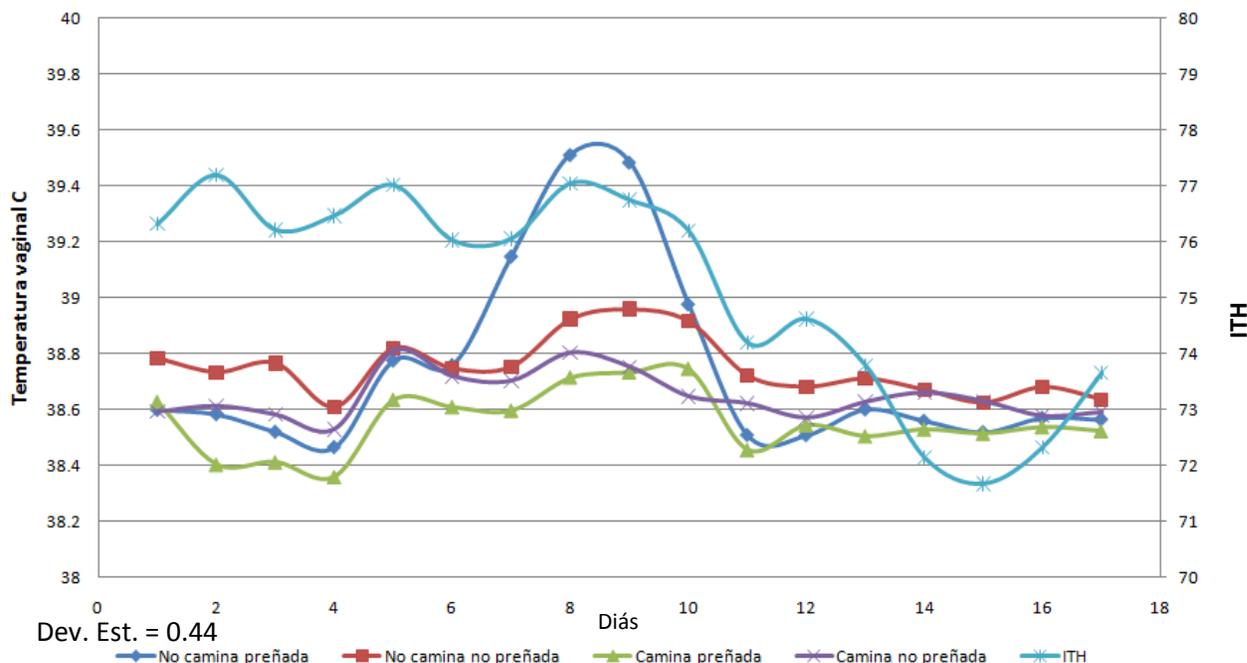
Anejo 2A

Gráfica de medias de temperatura vaginal e ITH desde el 24 de febrero hasta el 12 de marzo



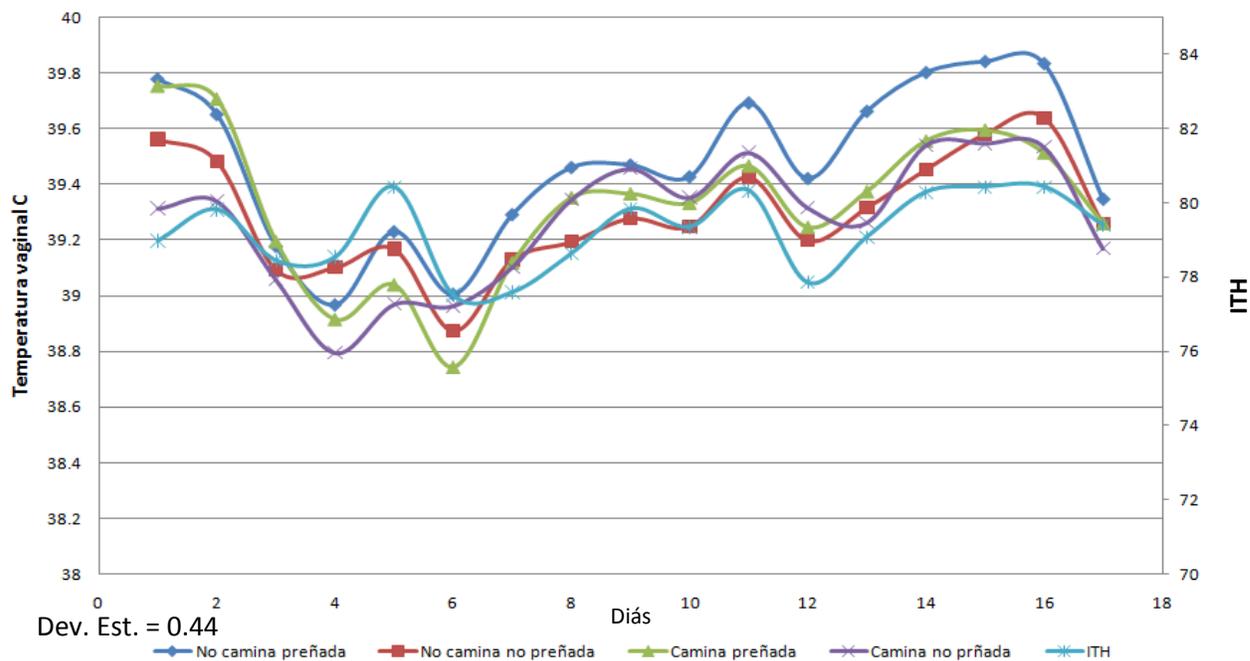
Anejo 2B

Gráfica de medias de temperatura vaginal e ITH desde el 23 de marzo hasta el 8 de abril



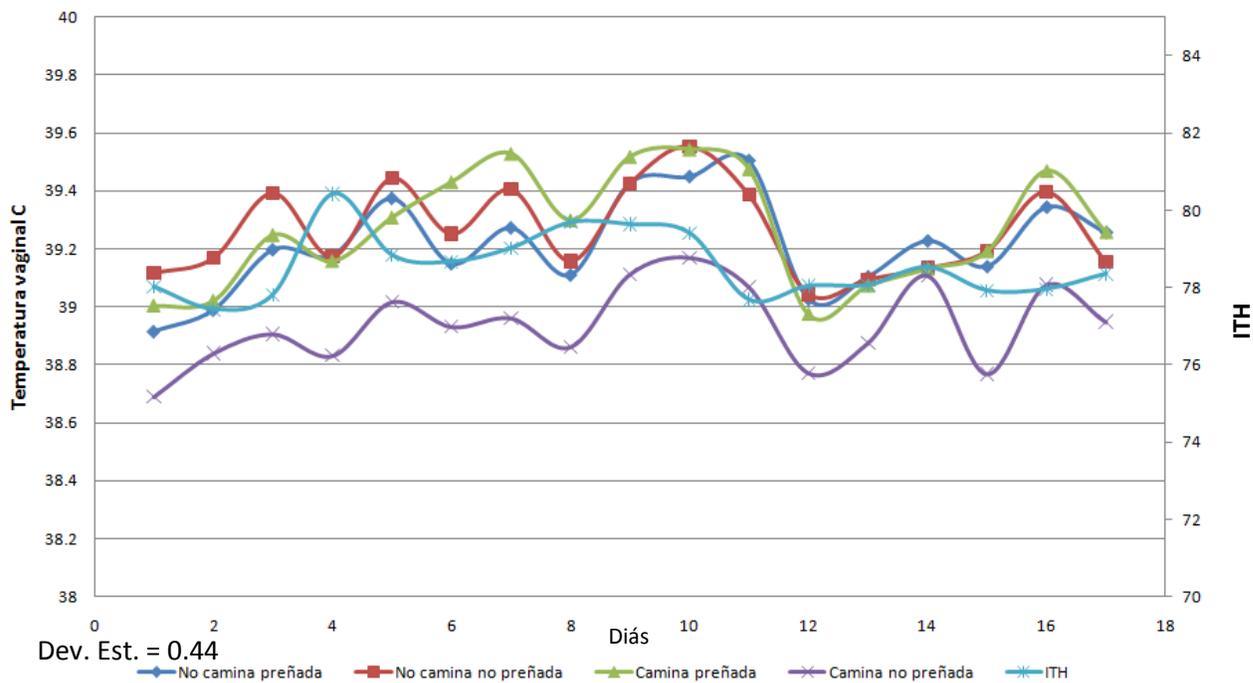
Anejo 2C

Gráfica de medias de temperatura vaginal e ITH desde el 14 de agosto hasta el 30 de agosto



Anejo 2D

Gráfica de medias de temperatura vaginal e ITH desde el 9 de septiembre hasta el 25 de septiembre



Anejo 3: Prueba de efectos fijos de tipo 3

Efecto	Grados de libertad del num	Grados de libertad del den	Valor F	Valor P
Actividad física	1	20	1.25	0.2773
Gestación	1	22	20.21	0.0002
Fecha	67	607	15.30	<0.0001
ITH	1	18E3	10.31	0.0013
Act Fis*Fecha	67	607	1.52	0.0063
ITH *Act Fis	1	18E3	4.15	0.0417
ITH*Gestación	1	18E3	49.96	<0.0001
ITH*fecha	67	18E3	16.08	<0.0001
ITH*Act Fis*fecha	67	18E3	1.64	0.0008