

# Respuesta ovulatoria, estado de desarrollo y calidad de embriones de ovejas Pelibuey superovuladas suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados

## Ovulatory response and embryo quality and development in superovulated Pelibuey ewes supplemented with polyunsaturated fatty acids in the diet

José Herrera-Camacho<sup>a</sup>, J. Ricardo Aké-López<sup>b</sup>, Juan Carlos Ku-Vera<sup>b</sup>, Gary L. Williams<sup>c</sup>, Jorge Alfredo Quintal-Franco<sup>d</sup>

### RESUMEN

Se evaluó el efecto de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta, sobre número de cuerpos lúteos, células y embriones totales, estado de desarrollo y calidad morfológica de embriones recuperados de ovejas superovuladas. Veintiséis (26) ovejas Pelibuey se distribuyeron aleatoriamente en un grupo testigo que recibió una dieta a base de pasto y concentrado (SA; n=13) y un grupo experimental al que se le adicionó, en el concentrado, 4 % de aceite de maíz (AM; n=13) del total de la materia seca de la dieta. El ciclo estral se sincronizó con dos inyecciones de PGF2a. Las ovejas fueron superovuladas el día 10 del ciclo estral, con 200 mg oveja<sup>-1</sup> de FSHp, en dosis decrecientes, por cuatro días; al tercer día, se aplicaron 15 mg de PGF2a. Las hembras fueron servidas por monta natural. Los embriones se colectaron seis después del servicio. El número de cuerpos lúteos, células colectadas totales y embriones fueron superiores ( $P < 0.05$ ) en el grupo AM ( $14.73 \pm 1.87$ ;  $9.18 \pm 2.16$  y  $6.72 \pm 1.78$ , respectivamente) respecto al grupo SA ( $10.73 \pm 1.42$ ,  $4.18 \pm 1.36$  y  $3.09 \pm 1.36$ , respectivamente). Hubo un efecto positivo ( $P < 0.05$ ) de la adición de grasa sobre el número de embriones en estado de mórula colectados del grupo AM ( $5.90 \pm 1.59$ ) respecto al grupo SA ( $2.18 \pm 1.30$ ). No se encontró un efecto positivo de la suplementación grasa ( $P > 0.05$ ) sobre la calidad morfológica embrionaria. La adición de aceite de maíz, rico en ácidos grasos poli insaturados, favorece el número de cuerpos lúteos, células colectadas totales y embriones, además incrementa el número de embriones en estado de mórula.

**PALABRAS CLAVE:** Ácidos grasos poli insaturados, Oveja, Embriones, Aceite de maíz, Respuesta superovulatoria.

### ABSTRACT

This study evaluated the effect of adding polyunsaturated fatty acids (PUFAs) to the diet on the number of corpora lutea, total cells and embryos collected; development and morphological quality of embryos recovered from superovulated Pelibuey ewes. Twenty-six (26) Pelibuey ewes were randomly distributed into two groups: 1) (control) Diet based on grass and a supplement without fatty acids (WFA) and group 2) Same diet as WFA plus 4 % of total dry matter of the diet as corn oil as a source of PUFAs. The estrous cycle was synchronized with two injections of PGF2a. The superovulation (SO) treatment began on d 10 of the estrous cycle with 200 mg of FSHp, in decreasing doses for 4 d. On the third day of SO treatment, 15 mg of PGF2a were administered, and ewes were mated to a fertile ram. Embryos were collected on d 6 after mating. Numbers of CL ( $14.73 \pm 1.87$  vs  $10.73 \pm 1.42$ ); total cells collected ( $9.18 \pm 2.16$  vs  $4.18 \pm 1.36$ ) and EMB ( $6.72 \pm 1.78$  vs  $3.09 \pm 1.36$ ) were higher ( $P < 0.05$ ) in the PUFAs group than in the WFA group, respectively. Adding polyunsaturated fatty acids had a positive effect ( $P < 0.05$ ) on number of embryos in morula stage ( $5.90 \pm 1.59$ ), in comparison to the WFA group ( $2.18 \pm 1.30$ ). No effect of PUFAs' addition was observed on embryo morphologic quality ( $P > 0.05$ ). Addition of polyunsaturated fatty acids has a positive effect on superovulatory response, as observed in the number of corpora lutea, total cells and embryos collected, and also in an increase of the number of embryos in morula stage.

**KEY WORDS:** Polyunsaturated fatty acids, Sheep, Embryos, Corn oil, Superovulatory response.

Recibido el 25 de septiembre de 2006. Aceptado para su publicación el 30 de octubre de 2007.

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

<sup>b</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán.

<sup>c</sup> Texas Agricultural Experiment Station (TAES). Texas A & M University.

<sup>d</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Sureste, Km.24.5 Antigua Carretera Mérida-Motul; Mocochá Yucatán. Tel (+52) 991-916-2215/18. quintal.jorge@inifap.gob.mx. Correspondencia al quinto autor.

## INTRODUCCIÓN

La variación en la respuesta ovulatoria con la aplicación de hormonas exógenas es hasta la fecha una de las principales limitaciones en la eficiencia de los programas de ovulación múltiple y transferencia de embriones. Estudios recientes indican que la suplementación con aceite vegetal, rico en ácidos grasos poliinsaturados (oleico, linoleico y linolenico), puede ser utilizada para modificar algunos procesos fisiológicos ováricos en vacas<sup>(1)</sup> y ovejas<sup>(2)</sup>, independientemente del consumo de energía y de las variaciones de peso.

Algunos trabajos realizados en ganado bovino<sup>(3,4)</sup> y ovino<sup>(2)</sup> sugieren que con la suplementación grasa, rica en ácidos grasos poliinsaturados, se presentan en forma paralela cambios metabólicos, morfológicos y hormonales que pueden incrementar el número y el diámetro de los folículos ováricos. El mejoramiento en el estado nutricional puede incrementar el reclutamiento de los folículos en las novillas<sup>(5)</sup> y mejorar la tasa de ovulación en las ovejas<sup>(6)</sup>. La adición de lípidos en la dieta de los rumiantes ha sido una estrategia para mejorar la reproducción, con el estímulo en la dinámica folicular, tasa de ovulación y sobrevivencia embrionaria<sup>(7)</sup>. Con base en estas observaciones, existen evidencias que indican que la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados en la dieta puede incrementar el número de folículos disponibles que responden al tratamiento con gonadotropinas en esquemas de ovulación múltiple, de tal forma que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la adición de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta sobre la respuesta ovárica, estado de desarrollo y calidad morfológica de embriones recuperados de ovejas Pelibuey superovuladas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Área de estudio*

El presente estudio se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, a 21° 06' N y 89° 27' O. La zona se caracteriza por presentar clima cálido subhúmedo (Aw0) y lluvias en verano. La temperatura promedio anual es de 25.8 °C, la

## INTRODUCTION

Change in ovulation response to exogenous hormones is currently one of the main limitations for efficiency of multiple ovulation and embryo transfer programs. Recent studies show that supplementing diets with vegetable oils rich in polyunsaturated fatty acids (oleic, linoleic and linolenic) could be useful for modifying some ovarian physiological functions in both cows<sup>(1)</sup> and ewes<sup>(2)</sup>, with independence of energy intake and changes in weight.

Some studies carried out in cattle<sup>(3,4)</sup> and sheep<sup>(2)</sup> suggest that when feeding dietary fat supplements rich in polyunsaturated fatty acids, metabolic, morphologic and hormonal changes take place simultaneously which could increase diameter and number of ovarian follicles. An improvement in the nutritional state could increase ovarian follicle recruitment in heifers<sup>(5)</sup> and ovulation rate in ewes<sup>(6)</sup>. Adding fats to ruminants' diets has been a strategy followed to increase the reproduction rate by stimulating follicle dynamics, ovulation rate and embryo survival<sup>(7)</sup>. Based on these observations, enough evidence is available to indicate that dietary fat supplements rich in polyunsaturated fatty acids can increase the amount of available follicles able to respond to gonadotrophin treatments in multiple ovulation protocols, in such ways that the objective of the present study was to assess the effect of dietary fat supplements rich in polyunsaturated fatty acids on ovarian response, and development and morphologic quality of embryos recuperated from superovulated Pelibuey ewes.

## MATERIALS AND METHODS

### *Location*

The present study was carried out at the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of Universidad Autónoma de Yucatán, 21° 06' N, 89° 27' W, sub-humid tropical climate (Aw0) with 983.8 mm annual, predominantly summer rainfall, 25.8°C average annual temperature, 10.5 °C average low annual temperature and 39.4 °C average high annual temperature<sup>(8)</sup>.

temperatura mínima promedio es de 10.5 °C y la máxima promedio es de 39.4 °C, la precipitación pluvial media en la zona es de 983.8 mm<sup>(8)</sup>.

#### Selección de animales

Se utilizaron 26 ovejas Pelibuey de 35 a 40 kg de peso vivo, con una buena condición corporal, es decir, de 2.5 ó 3 en la escala de 1 a 5 donde 1=emaciada y 5=obesa<sup>(9)</sup>; multíparas (dos o tres partos), ninguna de las ovejas estaba amamantando y no presentaron problemas reproductivos al menos en el último parto.

#### Alimentación

Las ovejas se mantuvieron estabuladas en corrales con sombra (8 x 4 m) durante el período de prueba, y fueron alimentadas con dietas, isoenergéticas (6.37 MJ<sup>-1</sup>oveja<sup>-1</sup>día<sup>-1</sup> EM) e isoproteicas (72.9 g de proteína<sup>-1</sup>oveja<sup>-1</sup>día<sup>-1</sup>) formuladas para cubrir los requerimientos de mantenimiento<sup>(10)</sup>.

Los animales fueron distribuidos al azar en dos grupos: un grupo control que no recibió aceite adicional en el suplemento (SA; n=13) y un grupo experimental al cual se le proporcionó aceite de maíz (AM; n=13), rico en ácidos grasos poliinsaturados, a razón de 4 % del total de la MS de la dieta (Cuadro 1). Las ovejas recibieron una dieta a base de pasto estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*). La suplementación con AM, se ofreció por 23 días, iniciando la suplementación grasa al tercer día de la primera inyección de PGF2a, de tal forma que el término la suplementación con aceite de maíz coincidiera con el último día del tratamiento superovulatorio.

#### Tratamiento hormonal

El ciclo estral de las ovejas fue sincronizado antes de iniciar el tratamiento superovulatorio, utilizando por vía intramuscular 15 mg de prostaglandina F2a (PGF2a; Lutalyse, Pharmacia&Upjohn, Kamalazoo, Mich; USA) distribuida en dos aplicaciones en 24 h. Todas las ovejas recibieron una segunda aplicación de la hormona 9 días después de la primera. La detección de estros se realizó dos veces

#### Animal selection

A total of 26 Pelibuey ewes, 35 to 40 kg liveweight, in good body condition, 2.5-3 score in a 1 (emaciated) to 5 (obese) scale, multiparous (2 to 3 births), were chosen. None of them was nursing or shown previous reproduction problems (at least in the last delivery).

#### Feeding

Ewes were kept in 8 x 4 m shaded pens for the length of the study and fed isoenergetic (6.37 MJ<sup>-1</sup>, ewe<sup>-1</sup>, d<sup>-1</sup>), isoproteic (72.9 g crude protein<sup>-1</sup>, ewe<sup>-1</sup>, d<sup>-1</sup>) diets, formulated to cover maintenance needs<sup>(10)</sup>.

Cuadro 1. Ingredientes utilizados, concentración de ácidos grasos y aporte nutricional de las dietas suplementadas (PUFAs) y sin aceite de maíz (WFA) ofrecidas a ovejas Pelibuey

Table 1. Ingredients used, fatty acid concentration and nutrient contribution in diets added (PUFAs) and not added (WFA) with corn oil fed to Pelibuey ewes

Ingredient (g)	Treatments	
	WFA (n=13)	PUFAs (n=13)
<i>Cynodon nlemfuensis</i>	664	470
Soybean husks	---	200
Soybean meal 44 % CP	50	30
Sorghum	65	---
Corn oil	---	28
Fatty acid profiles (%)		
Palmitic	34.68	9.32
Stearic	---	2.53
Oleic	45.28	20.62
Linoleic	20.04	65.96
Linolenic	---	1.14
Arachidic	---	0.42
Saturated fatty acids	34.68	12.27
Polyunsaturated fatty acids	65.32	87.72
Nutrient supply		
Proteins, g <sup>-1</sup> ewe <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	72.8	72.9
Energy, MJ ewe <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	6.37	6.37

al día (AM-PM) a partir de las 24 h de la última inyección de PGF2a, utilizando un macho entero con delantal. Las hembras que manifestaron celo fueron incluidas en el esquema de superovulación.

El tratamiento superovulatorio (SO) se inició el día 10 del ciclo estral (estro=día 0). Se utilizaron 200 mg (10 mg/ml de solución salina) por oveja de hormona folículo estimulante porcina (FSHp; NIH-FSH-P1, Folltropin-V, Ontario, Canadá) aplicado dos veces por día (intervalos de 12 h) durante cuatro días y en dosis decrecientes (40-40, 30-30, 20-20 y 10-10 mg). Con la finalidad de inducir y sincronizar la presentación del estro, al tercer día de iniciado el tratamiento SO, se aplicaron 7.5 mg de un análogo de PGF2a (Lutalyse, Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, Mich; USA) tanto en la mañana como en la tarde.

La detección del estro se realizó 24 h después de aplicada la PGF2a, con la ayuda de un macho entero con delantal. Todas las hembras que manifestaron estro fueron servidas por monta natural a las 0, 12 y 24 h utilizando dos sementales evaluados previamente en cuanto a su calidad seminal.

#### *Técnica quirúrgica y recolección de embriones*

La recolección de los embriones se llevó a cabo por el método quirúrgico, por laparotomía media ventral el día seis después del primer servicio. Como tranquilizante se utilizaron 0.3 a 0.4 mg de clorhidrato de propiopromacina (Combelen; Bayer, México), más ketamina (Ketalar, Pfizer, 2.5 mg/kg de peso vivo) diluidos en 2 ml de solución salina fisiológica, y aplicados por vía intravenosa. Como anestésico local se aplicaron de 10 a 15 ml de clorhidrato de lidocaína al 2% (Pisocaína 2%, Laboratorios Pisa; México), por vía subcutánea, alrededor de la zona de incisión.

Una vez expuesto el útero y los ovarios, se procedió a evaluar el número de cuerpos lúteos y solamente las hembras con un mínimo de tres cuerpos lúteos se sometieron al lavado de los cuernos uterinos para la recolección de los embriones.

El lavado de los cuernos uterinos se realizó por separado en forma gravitacional y de manera

Animals were randomly placed in two groups: 1) control (n=13), which was not fed any dietary fatty acid supplement (WFA), and 2) experimental group (n=13) fed with corn oil rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs), at 4% of dry matter (Table 1). Both groups were fed African stargrass (*Cynodon nlemfuensis*). Corn oil was fed for 23 d, beginning on d 3 after the first PGF2a injection, in such a way that the last day of supplementation coincided with the end of the superovulation treatment.

#### *Hormonal treatment*

Ewes' estrous cycle was synchronized before beginning the superovulation treatment, which was performed through two 15 mg F2a prostaglandin intramuscular injections (PGF2a; Lutalyse, Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, MI, USA), 24 h apart. All ewes received a second hormone dose 9 d after. Estrus' detection was performed twice daily, starting 24 h after the second PGF2a injection. Detection was carried out using an aproned ram. Ewes which showed estrus were included in the superovulation program.

SO treatment began on 10 of the estrus cycle (estrus = day 0). To this end, 200 mg (10 mg/ml saline solution) of porcine follicle stimulant hormone was administered to each ewe (FSHp; NIH-FSH-P1, Folltropin-V, Ontario, Canada) twice daily 12 h apart for 4 d and in decreasing doses (40-40, 30-30, 20-20 and 10-10 mg). On the third day, 7.5 mg of a PGF2a analog (Lutalyse, Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, MI, USA) were applied in the morning and in the afternoon.

Estrus detection began 24 h after applying PGF2a by means of an aproned ram. All ewes showing estrus were mated at 0, 12 and 24 h with two rams previously evaluated for semen quality.

#### *Surgical procedure and embryo collection*

Embryo collection was carried out through surgery, by ventral laparoscopy on day six after the first service. Intravenous propyromazine chlorhydrate (Combelen, Bayer, Mexico) at 0.3 to 0.4 mg plus ketamine (Ketalar, Pfizer, Mexico) at 2.5 mg/kg,

intermitente, utilizando como medio de lavado solución fosfatada buferada (PBS; Dulbecco, GIBCO) suplementada con 1% de suero fetal bovino. El medio de lavado (40 a 60 ml por cuerno uterino) se introdujo a través de un catéter intravenoso de teflón (calibre 1.6 y 540 mm de longitud; Johnson-Johnson, México), insertado en la pared uterina, cerca de la base del cuerno y en dirección útero-tubárica. El medio de lavado se recuperó a través de una aguja metálica (calibre 16) de punta roma y con perforaciones múltiples (aguja de recolección), colocada inmediatamente por arriba del catéter intravenoso y se colectó en frascos de cristal estériles y siliconizados.

Terminado el lavado, ambos cuernos fueron recubiertos con un antibiótico de amplio espectro (Furacin, Norwich Eaton, México) y se colocaron nuevamente en la cavidad abdominal previa aplicación de EDTA al 10% (ácido etilendiaminotetraacético) en los puntos de inserción de las agujas. Posteriormente se procedió a la sutura de la cavidad abdominal y la aplicación, por vía intramuscular de 3 ml de oxitetraciclina al 10% (Intervet SA, México) para prevenir infecciones post-operatorias y 1 ml de un análogo de PGF<sub>2a</sub> para causar la lisis de los cuerpos lúteos existentes y evitar una posible gestación.

#### *Búsqueda y evaluación de embriones*

Una vez obtenido el medio de lavado se dejó en reposo por espacio de 30 min con la finalidad de que los embriones por su mayor peso específico sedimentaran al fondo del recipiente, posteriormente, utilizando un sifón se procedió a su decantación, dejando de 20 a 30 ml de medio en el frasco. El medio se vertió en cajas de Petri (90 x 15 mm) previamente identificadas con el número de la donadora. La búsqueda se realizó por duplicado, por una misma persona, bajo un microscopio estereoscópico a 10-15X, cubriendo toda la superficie en forma de zig-zag. Los embriones localizados durante la búsqueda se trasladaron a cajas de Petri pequeñas (30 x 10 mm) que contenían una fracción de medio de cultivo (PBS Dulbecco y 10% de suero fetal bovino) y fueron evaluados con base en su estado de desarrollo

diluted in 2 ml physiological saline solution was used as tranquilizer. Subcutaneous 2% lidocaine chlorhydrate at 10 to 15 ml was used as local anesthetic, applied around the incision area.

Once the uterus and ovaries were exposed, corpora lutea number was assessed and ewes showing three or more CL were subject to a washing of the uterine horn for embryo collection.

Washing of the horn of uterus was performed intermittently and separately by gravitation, with a buffered phosphate solution (PBS; Dulbecco, GIBCO) supplemented with 1% bovine fetus serum. Washing medium (40 to 60 ml by horn) was introduced through a Teflon<sup>®</sup> intravenous catheter (1.6 caliber; 540 mm long, Johnson & Johnson, Mexico), inserted in the uterine wall near to the horn base and following a uterotubal direction. Washing medium was recovered through a blunt tip metal needle (16 caliber) with several holes, placed immediately above the intravenous catheter and collected in sterile glass, silicone covered containers.

After washing, both horns were covered with a wide spectrum antibiotic (Furacin, Norwich Eaton, Mexico) and reset in the abdominal cavity, and EDTA 10% was applied to the needles' insertion points. Later, the abdominal cavity was sutured and 3 ml intramuscular oxytetracycline 10 % (Intervet S.A., Mexico) were applied to prevent post-surgery infections and also 1 m of a PGF<sub>2a</sub> analog to foster lysis of corpora lutea in existence and to prevent possible pregnancies.

#### *Embryo search and evaluation*

The washing medium was left to stand for 30 min for embryo sedimentation due to their greater weight. Afterwards, with the aid of a siphon, the medium was decanted, leaving 20 to 30 ml in the flask, which was set in Petri dishes (90 \* 15 mm) previously identified with the donor's number. Embryo search was carried by duplicate by the same person, with a stereoscopic microscope at 10-15X, using a zigzag pattern across the whole surface. Found embryos were transferred to smaller Petri dishes (30 \* 10 mm) containing a fraction of

y calidad morfológica utilizando los criterios descritos por Lindner y Wright<sup>(11)</sup>.

### Análisis estadístico

Las variables de estudio fueron la respuesta ovárica (número de cuerpos lúteos, células totales y embriones) y el estado de desarrollo y la calidad morfológica de los embriones recuperados. La respuesta ovárica fue analizada en un diseño completamente al azar mediante un ANOVA de una vía<sup>(12)</sup>. La comparación de medias entre tratamientos se realizó mediante la prueba de “t” de Student<sup>(12)</sup>. La calidad y estado de desarrollo de los embriones recuperados fue analizada mediante la prueba de Wilcoxon<sup>(13)</sup>. En todos los casos se utilizó el paquete estadístico SAS<sup>(14)</sup>.

## RESULTADOS

En este estudio cuatro ovejas no respondieron al tratamiento de ovulación múltiple y fueron excluidas en el análisis de las variables de respuesta registradas. El promedio (media ± EE) de cuerpos lúteos por oveja (Figura 1), fue superior ( $P < 0.05$ ) en el grupo suplementado con aceite de maíz ( $14.73 \pm 1.87$ ) que en el grupo control ( $10.73 \pm 1.42$ ). En cuanto al promedio de las células colectadas totales, se observó un efecto positivo ( $P < 0.05$ ) a favor del grupo de ovejas suplementado con aceite de maíz ( $9.18 \pm 2.16$ ) comparado con el grupo que no recibió suplementación grasa ( $4.18 \pm 1.36$ ). Así mismo, la adición de aceite de maíz presentó una influencia significativa ( $P < 0.05$ ) sobre el promedio de embriones colectados, siendo éste superior en el grupo de ovejas suplementadas con aceite de maíz ( $6.72 \pm 1.78$ ), con respecto al grupo que no recibió suplementación grasa ( $3.09 \pm 1.36$ ).

En el estado de desarrollo (Cuadro 2) se encontró un efecto positivo ( $P < 0.05$ ) de la adición de grasa sobre el número de embriones en estado de mórula, ( $5.90 \pm 1.59$ ) con respecto al grupo testigo ( $2.18 \pm 1.30$ ). El efecto positivo de la suplementación grasa no fue evidente sobre la producción de embriones en estado de blastocito para el grupo de ovejas que recibió suplementación grasa y el grupo

culture media (PBS Dulbecco plus 10 % bovine fetus serum), and evaluated for development and morphologic quality, using criteria described by Lindner and Wright<sup>(11)</sup>.

### Statistical analysis

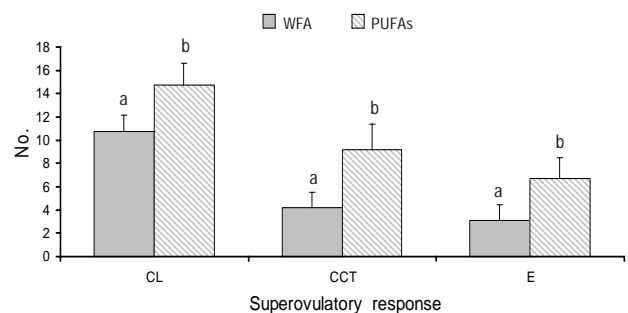
Variables in this study were ovarian response (corpora lutea, embryos and total cells) and recovered embryos’ development and morphologic quality. Ovarian response was analyzed through a completely randomized design through a one way ANOVA<sup>(12)</sup>. Average comparisons between treatments were performed through Student’s “t” test<sup>(12)</sup>. Embryo development and quality were analyzed by means of Wilcoxon’s test<sup>(13)</sup>. In all instances the SAS software was used<sup>(14)</sup>.

## RESULTS

In the present study four ewes did not show any response to the superovulation treatment and therefore were excluded from recorded response analyses. Average (average ± SE) CL per ewe (Figure 1) was higher ( $P < 0.05$ ) in the group supplemented with corn oil (PUFAs) ( $14.73 \pm$

Figura 1. Respuesta ovárica en ovejas Pelibuey que recibieron concentrado sin (WFA) y con aceite de maíz (PUFAs)

Figure 1. Ovarian response in Pelibuey ewes fed with concentrates without (WFA) and with corn oil (PUFAs)



CL=corpora lutea; CCT=total collected cells; E=collected embryos.

ab Show significant differences ( $P < 0.05$ ).

de ovejas mantenidas sin suplementar ( $0.82 \pm 0.32$  vs  $0.36 \pm 0.20$ , respectivamente).

En cuanto a la calidad embrionaria (Cuadro 2), no se encontró efecto de la suplementación grasa ( $P > 0.05$ ) sobre ninguna de las categorías consideradas en el presente trabajo. Sin embargo, en el grupo suplementado con aceite de maíz se encontró una mayor proporción de embriones de calidad excelente, regular y buena que en el grupo control; en este último la mayor proporción de embriones colectados (48.48 %) fueron de mala calidad.

## DISCUSIÓN

El número de cuerpos lúteos observados en ovejas suplementadas con aceite de maíz, y en el grupo control, difieren de los resultados previamente reportados por Thomas y Williams<sup>(4)</sup> quienes no encontraron diferencias en el número de cuerpos lúteos en novillas suplementadas con aceite de soya con respecto al grupo que recibió sebo animal o que fue mantenido sin suplementación grasa.

El incremento en el número de cuerpos lúteos en conjunto con la suplementación grasa, puede modificar la secreción total de progesterona por medio de una mayor disponibilidad de colesterol y otros precursores de hormonas esteroideas para el tejido lúteo, permitiendo un mejor desarrollo de los embriones durante los primeros días. Un estudio realizado por Cheng *et al*<sup>(26)</sup> demuestra que la adición de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta de rumiantes, puede inhibir la síntesis de prostaglandina endometrial, lo que puede retrasar la lisis del cuerpo lúteo extendiendo las posibilidades del desarrollo embrionario.

En muchas especies, el colesterol utilizado por las células lúteas para la esteroidogénesis es derivado de las lipoproteínas de baja o de alta densidad<sup>(15,16)</sup>. La suplementación con lípidos incrementa la concentración total de colesterol en vacas<sup>(17)</sup> y ovejas<sup>(2)</sup>, así mismo, estudios *in vivo* e *in vitro* realizados con células lúteas en ovejas<sup>(7)</sup> o vacas<sup>(18)</sup> han demostrado que la suplementación con grasas vegetales o sales de ácidos grasos poliinsaturados incrementan la secreción de progesterona.

Cuadro 2. Estado de desarrollo y calidad de embriones recuperados de ovejas Pelibuey que recibieron concentrado sin (WFA) y con aceite de maíz (PUFAs)

Table 2. Development stage and quality of recuperated embryos from Pelibuey ewes fed with concentrates without (WFA) or with (PUFAs) corn oil

Development stage	Treatment	
	WFA (n=11)	PUFAs (n=11)
Morula	2.18±1.30 <sup>a</sup>	5.90±1.59 <sup>b</sup>
Blastocyte	0.36±0.20 <sup>a</sup>	0.82±0.32 <sup>a</sup>
Embryo quality		
Excellent	3.03 (1)	9.46 (7)
Good	42.42 (14)	50.00 (37)
Fair	6.06 (2)	14.86 (11)
Bad	48.48 (16)	25.67 (19)

( ) Embryos collected in each quality category is shown inside parentheses.

<sup>ab</sup> Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

1.87) than in control (WFA) ( $10.73 \pm 1.42$ ). As far as total cells collected, a positive effect ( $P < 0.05$ ) towards the group supplemented with corn oil was observed ( $9.18 \pm 2.16$ , PUFAs vs  $4.18 \pm 1.36$  WFA). Besides, supplementation with corn oil showed a significant positive influence ( $P < 0.05$ ) on collected embryo percentage ( $6.72 \pm 1.78$ , PUFAs vs  $3.09 \pm 1.36$ , WFA).

As regards embryo development (Table 2), adding polyunsaturated fatty acids had a positive effect ( $P < 0.05$ ) on embryos in morula stage collected from the group with supplementation ( $5.90 \pm 1.59$ , PUFAs vs  $2.18 \pm 1.30$ , WFA). The positive effect of fatty acid supplementation was not observed in embryos in blastocyte stage in PUFAs group compared to WFA ( $0.82 \pm 0.32$  vs  $0.36 \pm 0.20$ , respectively).

As for embryo quality (Table 2), no effect of fat supplementation ( $P > 0.05$ ) was found on any of the categories taken into account in the present study. However, PUFAs showed a greater percentage of excellent, good and fair quality embryos than in control. In this last group 48.48 % of collected embryos were of bad quality.

En cuanto al número de células colectadas y el número de embriones, en este estudio se observó un efecto favorable de la suplementación grasa sobre estas variables. No obstante, los resultados que soporten estas evidencias son escasos; sin embargo, haciendo referencia al efecto de las grasas sobre el desarrollo folicular, como un posible indicador de la respuesta ovárica, Zeron *et al*<sup>(19)</sup>, encontraron que las ovejas que fueron alimentadas con ácidos grasos poliinsaturados presentaron un mayor número de folículos y ovocitos que las ovejas que no recibieron suplementación. En el mismo sentido, otros autores<sup>(2,7)</sup> indican que la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados incrementa el número y diámetro de los folículos preovulatorios en ovejas ciclando normalmente, incremento que podría ser favorecido cuando los animales, además de ser suplementados con aceite vegetal, son sometidos a un tratamiento de ovulación múltiple<sup>(20)</sup>. Este efecto ha sido observado en el presente estudio al encontrar un mayor número de cuerpos lúteos, células totales y embriones recuperados en las ovejas Pelibuey que recibieron aceite de maíz en la dieta comparado con el grupo control.

Otros estudios<sup>(21)</sup> señalan que la nutrición puede jugar un papel de gran importancia sobre la respuesta al tratamiento superovulatorio, y estos autores encontraron que la suplementación de ovejas con 1 ó 2 veces el requerimiento de energía se incrementaba el número de folículos recuperados de ovejas sometidas a un tratamiento superovulatorio.

En el estado de desarrollo de los embriones recuperados, se encontró un efecto de la suplementación grasa a favor del grupo de ovejas que recibieron aceite de maíz en la dieta sobre el número de embriones en estado de mórula. Ryan *et al*<sup>(20)</sup> mencionan que la variación en la tasa de recuperación y la viabilidad de los embriones a los siete días de gestación continúa siendo una de las mayores limitaciones en los programas de ovulación múltiple y transferencia de embriones en los animales domésticos. Las condiciones que influyen esta variabilidad no son completamente claras; sin embargo, las características del ambiente intrafolicular durante el tratamiento superovulatorio

## DISCUSSION

Corpora lutea numbers observed in both groups differ from results reported by Thomas and Williams<sup>(4)</sup>, who did not find any differences between the number of corpora lutea found in heifers supplemented with soybean oil or with either animal fat or without any supplement.

Increase in the number of corpora lutea jointly with fat supplementation can modify total progesterone secretion through greater cholesterol availability and of other steroid hormone precursors for luteal tissue, allowing a better embryo development in the first days. A study carried out by Cheng *et al*<sup>(26)</sup> shows that adding polyunsaturated fatty acids to ruminant diets could inhibit endometrial prostaglandin synthesis, which in turn could delay corpus luteum lysis thus allowing greater possibilities for embryo growth.

In many species, cholesterol used by luteal cells for steroid genesis comes from low or high density lipoproteins<sup>(15,16)</sup>. Fat supplementation increases total cholesterol concentration in cows<sup>(17)</sup> and ewes<sup>(2)</sup>, furthermore, *in vivo* and *in vitro* studies performed with luteal cells in ewes<sup>(7)</sup> and cows<sup>(18)</sup> have shown that supplementation with polyunsaturated fatty acid salts or vegetable fats increase progesterone secretion.

As for collected cells and embryos, results in the present study show a favorable effect of fat supplementation for these variables. However, support for this evidence is scarce, but, Zeron *et al*<sup>(19)</sup> commenting on the effect of fats on follicle development as an indicator of ovarian response, found that ewes fed with polyunsaturated fatty acids showed a greater number of oocytes and follicles than those without supplementation. Moreover, other authors<sup>(2,7)</sup> mention that polyunsaturated fatty acid supplementation increases both pre-ovulatory follicle quantity and diameter in ewes cycling normally, effect which could be strengthened when animals, besides being supplemented with vegetable oils undergo superovulation treatments<sup>(20)</sup>. This effect was observed also in the present study as a greater number of corpora lutea, total cells and



puede ser uno de los principales factores que influyen dicha respuesta. Los mismos autores<sup>(20)</sup> encontraron en su estudio, que la suplementación grasa puede modificar los aspectos específicos de la esteroidogénesis ovárica, y puede incrementar el número de folículos y ovocitos disponibles para la fertilización. Al respecto, algunos estudios señalan que cuando el óvulo se desarrolla y madura en un ambiente endocrino adecuado, se favorece la ovulación y fertilización, dando lugar a un mayor número de embriones que pudieran ser colectados de hembras superovuladas<sup>(22)</sup>.

Por otra parte, Ryan *et al.*<sup>(20)</sup>, al igual que en el presente estudio, no encontraron un efecto positivo de la suplementación grasa sobre la calidad de los embriones recuperados de novillas superovuladas con FSH, aunque también se ha mencionado que la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados puede alterar las propiedades físicas de la membrana plasmática del embrión permitiendo mejores condiciones para su desarrollo durante el periodo previo a la implantación<sup>(23)</sup>.

Algunos estudios<sup>(19)</sup> muestran que la calidad de los ovocitos ha sido superior cuando las hembras reciben ácidos grasos poliinsaturados en la dieta, con respecto al grupo control que no recibe suplementación grasa (74.3 vs 57 % respectivamente;  $P < 0.05$ ); aunque es preciso señalar, que la evaluación de la calidad morfológica fue realizada sobre ovocitos recuperados de ovejas suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados, mientras que en el presente trabajo, dicha evaluación fue realizada sobre embriones de siete días de edad; esta situación puede sugerir que el metabolismo del embrión durante estos primeros días puede modificar su calidad, no obstante que continúa con su desarrollo.

Se ha encontrado que el desarrollo *in vitro* de ovocitos colectados de ovejas que no recibieron suplementación grasa era superior en invierno cuando estos tenían 2.2 veces más ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática que en el verano<sup>(23)</sup>. Otros estudios sugieren que la presencia de un doble enlace en la cadena de carbonos que forma los ácidos grasos puede tener una influencia sobre las propiedades físicas de las membranas<sup>(24)</sup>. Otros investigadores<sup>(25)</sup> sugieren

embryos were recovered from Pelibuey ewes fed with corn oil than in the control group.

Other studies<sup>(20)</sup> point out that nutrition could be an important issue on superovulation treatment response and the same authors also found that supplementing ewes with 1 to 2 times their energy requirements increase the number of recovered follicles in superovulation treatments.

As for recovered embryo development stage, a favorable effect of fat supplementation on ewes fed with corn oil was found for embryos in morula stage. Ryan *et al.*<sup>(20)</sup> mention that changes in the recovery rate and embryo viability at seven days gestation continues being one of the greater limitations in superovulation and embryo transfer programs in domestic animals. Conditions influencing this variability are not fully clear, however, characteristics of the intrafollicular environment in superovulation treatments could be one of the main factors affecting response. The same authors<sup>(20)</sup> found that fat supplementation can affect specific aspects of ovarian steroid genesis and can increase both follicles and oocytes available for fertilization. On this matter some studies mention that when ovules develop and mature in an adequate endocrine environment, ovulation and fertilization are fostered, thus strengthening the possibility of recovering more embryos from superovulated females<sup>(22)</sup>.

On the other hand, Ryan *et al.*<sup>(20)</sup>, as in the present study, did not find a positive effect of fat supplementation on quality of embryos recovered from heifers superovulated with FSH, although it has been mentioned also that polyunsaturated fatty acid supplementation can alter physical properties of embryos' plasmatic membrane allowing better development conditions in the pre-implantation period<sup>(23)</sup>.

Some studies<sup>(19)</sup> show that oocytes' quality is enhanced when females are fed polyunsaturated fatty acids than in those not fed with these acids (74.3 vs 57 %, respectively;  $P < 0.05$ ), although it should be pointed out that, recuperated oocyte morphologic quality evaluation was performed in ewes fed with polyunsaturated fatty acids, while in the present study it was carried out in seven days

que un incremento en la insaturación de los ácidos grasos en las membranas plasmáticas, está asociado con una alta fluidez de las membranas, facilitando el intercambio de nutrientes y metabolitos necesarios para el desarrollo del ovocito y del mismo embrión<sup>(23)</sup>.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

La adición aceite de maíz, rico en ácidos grasos poli insaturados, favorece la respuesta superovulatoria en términos de número de cuerpos lúteos, células colectadas totales y embriones, además de incrementar el número de embriones en estado de mórula. No obstante los resultados obtenidos, se requiere de un mayor número de estudios que sustenten lo observado en el presente trabajo y pueda, la suplementación con ácidos grasos poli insaturados, implementarse como una estrategia dentro del manejo alimenticio en los rebaños ovinos, buscando una efecto positivo en los procesos reproductivos al estimular la actividad ovárica folicular, y en esquemas de monta controlada o libre para mejorar fertilidad o prolificidad, siendo posible implementar esta estrategia en esquemas aún más demandantes, como son la superovulación para el aprovechamiento de germoplasma valioso.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología la beca otorgada para realizar estudios de posgrado del primer autor (Reg. 72283). Al CONACyT (Reg. 29366-B) y a la International Foundation for Science (AB/11342R) por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo. Así mismo a la Academia Mexicana de Ciencias por el financiamiento otorgado para realizar visitas de trabajo durante el desarrollo del trabajo experimental.

## LITERATURA CITADA

1. Thomas MG. Dietary fat intake, metabolic hormone secretion and ovarian physiological function in cows [PhD dissertation]. USA: Texas A&M University; 1994.

embryos, which can suggest that metabolism in these first few days can modify quality, while still growing.

*In vitro* development of oocytes collected from ewes that were not fed with fats was greater in winter when polyunsaturated fatty acid content in plasmatic membrane was 2.2 times more than in the summer<sup>(23)</sup>. Other studies suggest that the presence of a double bond in the carbon chain of fatty acids could influence membrane properties<sup>(24)</sup>. Other authors<sup>(25)</sup> mention that an increase in fatty acid unsaturation in plasmatic membranes is associated to high membrane fluidity, smoothing the progress of nutrient and metabolite exchange necessary for oocyte and embryo development<sup>(23)</sup>.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Adding corn oil, rich in polyunsaturated fatty acids, fosters superovulatory response in terms of corpora lutea number, total collected cells and embryos, besides increasing the amount of embryos in morula stage. In spite of the results obtained, more studies are required to support what was observed in the present study, so polyunsaturated fatty acid supplementation can be put into practice as a strategy in flock management, in search of a positive effect in reproductive processes stimulating ovarian follicle activity and also in controlled or free mating programs to improve fertility and prolificacy. This strategy can be used also in more demanding production programs, as with superovulation, to make better use of valuable germplasm.

## ACKNOWLEDGMENTS

Most especially to CONACYT for the scholarship granted to the senior author for graduate studies (Reg. 72283) and for partially funding the present study. The International Foundation for Science partially funded this study and the Academia Mexicana de Ciencias supported field trips.

*End of english version*

---

## RESPUESTA OVULATORIA DE OVEJAS PELIBUEY CON ÁCIDOS GRASOS

2. Herrera CJ, Quintal FJA, Kú VJC, Aguayo AAM, Williams LG. Dinámica folicular y concentración sérica de lípidos en ovejas Pelibuey suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados en la dieta. Memorias del 2do. Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. XI Congreso Nacional de Ovinocultura. Mérida, Yucatán, México. 2001.
3. Williams GL. Influence of dietary fat intake and metabolism on follicular growth in cattle. In: Rath D, Zeick AJ editors. The Central European Conference on Animal Reproduction. *Reprod Domest Anim* 1996;31(Suppl):391-610.
4. Thomas MG, Williams GL. Metabolic hormone secretion and FSH induced superovulatory responses of beef heifers fed dietary fat supplements containing predominantly saturated or polyunsaturated fatty acids. *Theriogenology* 1996;45:451-458.
5. Gutierrez GC, Oldham J, Bramley AT, Gong GJ, Campbell KB, Webb R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *J Anim Sci* 1997;5:1876-1884.
6. Downing JA, Scaramuzzi JR. The effect of the infusion of the insulin during the luteal phase of the estrous cycle on the ovulation rate and on plasma concentrations of LH, FSH and glucose in ewes. *Theriogenology* 1997;47:747-759.
7. Kuran M, Onal AG, Robinson JJ, Mackie K, Speake BK, McEvoy TG. A dietary supplement of calcium soaps of fatty acids enhances luteal function in sheep. *J Anim Sci* 1999;69:385-393.
8. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Resultados definitivos VII Censo Agrícola-Ganadero. Tomo II. México DF. 1994.
9. Russell A. Body condition scoring of sheep. In practice. Mayo: 91-92. 1984.
10. Kearn LC. Nutrient Requirements of Ruminants in Developing Countries. International Feedstuffs Institute, Utah Agric Exp Sta. Utah State University, Logan, Utah, USA. 1982.
11. Lindner MG, Wright WR. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 1983;20:407-416.
12. Montgomery CD. Diseño y análisis de experimentos. México DF: Grupo Editorial Iberoamérica; 1991.
13. Daniels WW. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3<sup>ra</sup> ed. México: Ed. Limusa; 1996.
14. SAS. Statistical Analysis System Institute. SAS/STAT User's Guide: Version 6.0 Statistics SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina. 1996.
15. Chalupa W, Vecchiarelli B, Elser A, Kronfeld DS, Sklan D, Palmquist DL. Ruminant fermentation in vivo as influenced by long-chain fatty acids. *J Dairy Sci* 1986;69:1293-1301.
16. Azhar S, Khan I, Gibori G. The influence of estradiol on cholesterol processing by corpus luteum. *Biol Reprod* 1989;40:961-971.
17. Talavera F, Park CS, Williams GL. Relationships among dietary lipid intake, serum cholesterol and ovarian function in Holstein heifers. *J Anim Sci* 1985;60:1045-1051.
18. Bao B, Thomas MG, Williams GL. Regulatory of high-density and low-density lipoproteins in cellular proliferation and secretion of progesterone and insulin-like growth factor I enriched cultures of bovine small and large cells. *J Anim Sci* 1997;75:3235-3245.
19. Zeron Y, Sklan D, Arav A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol Reprod Dev* 2002;61:271-278.
20. Ryan DP, Spoon AR, Williams GL. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high-fat diets and treated with follicle stimulating hormone. *J Anim Sci* 1992;70:3505-3513.
21. O'Callaghan D, Yaakub H, Hyttel P, Spicer LJ, Boland MP. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J Reprod Fert* 2000;118:303-313.
22. Lackey RB, Gray LLS, Henricks MD. Physiological basis for use of insulin-like growth factors in reproductive applications: A review. *Theriogenology* 1999;53:1147-1156.
23. Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* 2001;121:447-454.
24. Stubbs CD, Smith AD. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim Biophys Acta* 1984;779:89-137.
25. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM, Anchoroguy TJ, Drobniš E. Lipid phase transitions measured in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology* 1989;26:76-84.
26. Cheng Z, Robinson SR, Pushpakumara PGA, Mansbridge RJ, Whates DC. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on uterine prostaglandin synthesis in cow. *J Endocrinol* 2001;171:463-473.

