

**EFFECTO DE LA ADICION DE ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS
SOBRE LA DINAMICA FOLICULAR, TASA DE GESTACIÓN Y
RESPUESTA OVÁRICA EN OVEJAS PELIBUEY**

**[EFFECT OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS ON FOLLICULAR
DYNAMICS, PREGNANCY RATE AND OVARIC RESPONSE OF PELIBUEY
SHEEP]**

*Tesis Doctorado en Ciencias Agropecuarias, FMVZ-UADY, Septiembre 2002
[Ph.D. Thesis (Agriculture), FMVZ-UADY, September 2002]*

J. Herrera Camacho (*Alumno-Student*)

J.A. Quintal Franco, J.C. Kú Vera, G.L. Williams (*Asesores-Supervisors*)
*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán,
Apdo. 4-116 Itzinná, Mérida, Yucatán, 97100, México*

RESUMEN

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar el efecto de la adición de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta sobre la dinámica folicular, la tasa de fertilidad, prolificidad y respuesta superovulatoria en ovejas Pelibuey. Se realizaron tres experimentos.

El **experimento uno**, se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia durante el período julio-septiembre del año 2000. Se utilizaron 30 ovejas Pelibuey de condición corporal similar con el objeto de evaluar el efecto de la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados sobre la dinámica folicular, los perfiles séricos de lípidos y la concentración hormonal. El ciclo estral de las ovejas fue sincronizado con implantes de norgestomet antes de iniciar la prueba. Las ovejas que manifestaron estro fueron distribuidas en dos grupos para su alimentación, Grupo Control (SA; n=15); alimentado con pasto estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*) picado más un suplemento al cual no se adicionó aceite y Grupo experimental (AM; n=15), alimentado con el mismo forraje más un suplemento con 4% del total de la MS de la dieta de aceite de maíz (rico en ácidos grasos poliinsaturados), ambas dietas fueron isoenergéticas. El suplemento fue proporcionado diariamente durante 21 días, iniciando el día 7 después colocados los implantes. El día 21 de suplementación las ovejas fueron sometidas a una laparoscopia exploratoria para evaluar la dinámica folicular. La determinación de metabolitos de lípidos [Lipoproteínas de baja densidad (LBD), lipoproteínas de alta densidad (LAD), colesterol (COL), triglicéridos (TRIG) y lípidos totales (LIPTOT)] fue realizada en muestras de sangre (5-7 ml) colectadas de la vena yugular a intervalos de tres días, iniciando el día previo a la suplementación grasa. La determinación de la concentración hormonal fue realizada en dos muestras sanguíneas colectadas diariamente a intervalos de 12 horas. La hormona foliculo estimulante (FSH), la hormona del crecimiento (GH), la insulina (Ins) y los factores de

crecimiento similares a la insulina-1 (IGF-1) fueron determinadas por radioinmunoanálisis. La determinación de la concentración de FSH, se realizó con las muestras obtenidas de todas las ovejas de la prueba, mientras que la GH, Ins e IGF-1, fueron determinados en 8 ovejas por tratamiento. Los resultados de la dinámica folicular, (número y diámetro folicular) fueron analizados mediante un ANOVA en un diseño completamente al azar, y los folículos fueron clasificados en pequeños (2-3 mm), medianos (4-5 mm) y grandes o preovulatorios (≥ 6 mm). La población media ($\pm$ ee) de folículos fue mayor ($P=0.09$) en el grupo AM con respecto al grupo SA (11.28 ± 1.12 vs 8.80 ± 0.93 folículos por oveja, respectivamente). Así mismo, aunque sin diferencias significativas ($P>0.05$), el número de folículos por diámetro folicular de manera general fue mayor en el grupo AM, excepto en los folículos de 4 mm que fue ligeramente superior ($P<0.05$) en el grupo de ovejas SA (16 vs 13 folículos, respectivamente). Un mayor número de folículos pequeños ($P>0.05$) fue observado en el grupo AM (7.5 ± 1.02) que en el grupo SA (6.13 ± 0.80). El promedio de folículos de tamaño mediano, fue ligeramente mayor ($P>0.05$) en el grupo AC que en el grupo control. En los folículos grandes o preovulatorios, se observó un promedio superior ($P<0.05$) en el grupo AM que en las ovejas que no recibieron suplementación grasa (2.28 ± 0.22 vs 1.0 ± 0.13 , respectivamente). El diámetro folicular máximo fue superior ($P<0.05$) en el grupo suplementado AM (7.12 ± 0.22 mm) que en el grupo control (5.56 ± 0.25 mm). La concentración media (mg/dl) de metabolitos de lípidos fue superior en el grupo de ovejas que fueron suplementadas con aceite de maíz, no obstante, solo se observaron diferencias significativas ($P<0.01$) en la concentración sérica de LAD; COL y LIPTOT entre el grupo AM y SA (55.07 ± 3.07 vs 37.3 ± 3.10 ; 81.9 ± 3.48 vs 56.7 ± 3.52 ; 268.4 ± 17.4 vs 171.9 ± 18.6 , respectivamente). En la concentración hormonal, no se observó un efecto significativo ($P>0.05$) de la adición de aceite de maíz

sobre la concentración media de FSH, GH, IGF-1 e Ins, no obstante se observó una concentración plasmática de la FSH ligeramente superior en el grupo SA (3.34 ± 0.44 ng/ml) con respecto al grupo AM (2.89 ± 0.46 ng/ml). La concentración media de GH y de IGF, aunque sin diferencias significativas ($P > 0.05$) fue ligeramente superior en el grupo AM que en el grupo SA (5.59 ± 2.71 vs 1.54 ± 0.21 y 108 ± 3.17 vs 97.9 ± 2.9 ng/ml, respectivamente). La concentración media de insulina fue similar para ambos grupos. En conclusión la suplementación con aceite de maíz ejerce un efecto positivo sobre la población folicular y el diámetro folicular máximo, así como en la concentración sérica de LAD, COL y LIPTOT, pero no modificó de manera significativa las concentraciones plasmáticas de FSH, GH, Ins e IGF-1.

En el **experimento dos** el objetivo fue evaluar el efecto de la adición de ácidos grasos poliinsaturados sobre la tasa de fertilidad y prolificidad en ovejas Pelibuey. El estudio fue realizado en el Campo Experimental Mochochá (INIFAP) durante el período Febrero-Julio del 2000. Se utilizaron 91 ovejas de buena condición corporal (35-40 kg p.v.) en las cuales el ciclo estral fue sincronizado con un progestágeno sintético. Las ovejas que manifestaron estro se distribuyeron en dos grupos para su alimentación, grupo control que recibió un concentrado que contenía 2.7% de aceite de pollo (AP; $n=46$) y grupo experimental que recibió un concentrado con 4% del total de la materia seca de la dieta con aceite de maíz a razón de (AM; $n=45$). El concentrado fue proporcionado diariamente (08:00) por espacio de 21 días, iniciando con el suministro el día siete después de colocado el implante. Durante el período de prueba las ovejas se mantuvieron en potreros de vegetación nativa (07:00 a 13:00 h). La detección del estro para el servicio, se realizó entre los días 16 a 19 del ciclo estral (estro=día 0) y las ovejas que manifestaron estro fueron servidas por monta natural. El diagnóstico de gestación de las ovejas se realizó a través de la tasa de no retorno al estro, observando a las ovejas dos veces al día (07:00 y 18:00 h), a partir del día 14 y hasta el día 24 post-servicio. Se registró el comportamiento reproductivo (número de ovejas expuestas, servidas y paridas), tipo de parto (simple o gemelar) de las ovejas en ambos tratamientos y se estimaron los parámetros de fertilidad y prolificidad. El número de hembras que manifestaron estro y fueron servidas fue mayor ($P > 0.05$; $X^2=0.37$) en el grupo AP que en el grupo AM (36 vs 30 ovejas, respectivamente), mientras que el número de ovejas paridas fue similar en ambos grupos de ovejas. La tasa de fertilidad no difirió entre ambos grupos ($P > 0.05$); sin embargo, esta fue alrededor de 8% superior en el grupo de ovejas AM comparada con fertilidad del grupo AP (63.3 % y 55.6 %, respectivamente). En cuanto al tipo de parto, se observó una mayor proporción ($X^2=0.098$; $P=0.32$) de

partos simples en el grupo AP con respecto al grupo AM (90% vs 73.7%, respectivamente), mientras que la proporción de partos dobles fue superior ($X^2=6.05$; $P=0.01$) en el grupo AM que en el grupo AP (26.3 % vs 10%, respectivamente). La tasa de prolificidad fue 26% superior en el grupo AM con respecto al grupo AP (1.26 ± 0.1 vs 1.1 ± 0.07 corderos nacidos por oveja, respectivamente).

El objetivo del **experimento tres** evaluar el efecto de la adición de ácidos grasos poliinsaturados sobre la respuesta ovárica, estado de desarrollo y calidad morfológica de embriones recuperados de ovejas Pelibuey superovuladas. El estudio se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia durante los meses de enero y febrero del 2001. Se utilizaron 26 ovejas de la raza Pelibuey (35-40 kg de peso vivo) de buena condición corporal. El ciclo estral fue sincronizado antes de iniciar la suplementación grasa con dos inyecciones (i.m.) de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (15 mg). Las ovejas del estudio recibieron una dieta base compuesta pasto estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*) y fueron distribuidas en dos grupos, un grupo control (SA), que no recibió aceite adicional en el suplemento y un grupo experimental (AM) que recibió 4% del total de la MS de la dieta de aceite de maíz. El suplemento fue proporcionado por espacio de 23 días iniciando al tercer día de aplicada la primera inyección de $\text{PGF}_{2\alpha}$ de tal forma que el término la suplementación con aceite de maíz coincidiera con el último día del tratamiento superovulatorio (TSO). El TSO inició el día 10 del ciclo estral (estro=día 0), utilizando FSHp (200 mg/oveja) aplicado en dosis decrecientes, dos veces por día, durante cuatro días. Al tercer día de iniciado el TSO, se aplicaron 15 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en dos aplicaciones. La detección del estro se realizó 24 h después de aplicada la primera dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y las hembras que manifestaron estro fueron servidas por monta natural a las 0, 12 y 24 h. La recolección de los embriones se realizó el día siete después del primer servicio a través de una laparotomía media ventral y el lavado de los cuernos uterinos fue realizado en forma gravitacional e intermitente. La búsqueda y evaluación de los embriones se realizó bajo microscopio estereoscópico (40X). La respuesta ovárica [número de cuerpos lúteos (CL), Total de células colectadas (TCC) y embriones colectados (EC)] fue analizada en un diseño completamente al azar y la comparación de medias mediante la prueba de "t" de Student. El estado de desarrollo [mórulas (Mor) y blastocistos (Bla)] y la calidad morfológica [excelente (E), buena (B); regular (R) y mala (M)] de los embriones recuperados fueron analizados mediante la prueba de Wilcoxon. El promedio (media $\pm$ ee) de CL (14.73 ± 1.87 vs 10.73 ± 1.42), TCC (9.18 ± 2.16 vs 4.18 ± 1.36) y EC (6.72 ± 1.78 vs 3.09 ± 1.36) fue superior ($P < 0.05$) en el grupo AM con respecto al grupo SA, respectivamente. Así mismo en el estado de desarrollo la adición de

aceite de maíz ejerció un efecto positivo ($P < 0.05$), observando un mayor número de embriones en estado de mórula en el grupo AM (5.90 ± 1.59) que en el grupo SA (2.18 ± 1.30), mientras que el promedio de embriones en estado de blastocito fue similar en ambos grupos de ovejas. En la calidad embrionaria no se encontró un efecto de la suplementación grasa ($P > 0.05$) sobre ninguna de las categorías consideradas; sin embargo, en el grupo AM se observó una mayor proporción de embriones de calidad E, B y R que en el grupo SA, mientras que en el grupo SA se observó una mayor proporción de embriones calidad M. La adición de aceite de maíz en la dieta de ovejas Pelibuey provocó un efecto positivo sobre la respuesta ovulatoria, número total de células y embriones colectadas, así como en el estado de desarrollo y calidad morfológica de los embriones colectados.

Palabras clave: ácidos grasos poliinsaturados, ovejas, reproducción

SUMMARY

The objective of the present work was to evaluate the effect of the addition of polyunsaturated fatty acids in the diet on the follicular dynamic, fertility and prolificacy rate and superovulatory response in Pelibuey sheep under tropical conditions.

The **experiment one** was carried out in the Faculty of Veterinary Medicine from July to September 2000. Thirty Pelibuey sheep in similar body condition was used to evaluate the effect of the supplementation with polyunsaturated fatty acids on the follicular dynamic, serum concentration of lipid metabolites and plasmatic hormonal concentration. The estrous cycle was synchronized with implant of norgestomet before beginning the experiment. The sheep that showed estrous behavior were distributed in two groups for their feeding. Control group (CG; $n=15$); was fed with grass and African star (*Cynodon nlemfuensis*) more a supplement to which was not added oil and Experimental group (AM; $n=15$), fed with the same forage more a supplement with 4% of corn oil of total DM of the diet, both diets were isoenergetic. The supplement was provided daily during 21 days, beginning on day 7 after put the implant. On day 21 of supplementation the sheep were subjected to exploratory laparotomy to evaluate the follicular dynamic. The determination of lipid metabolites [Low-density lipoproteins (LDL), high-density lipoproteins (HDL), cholesterol (CHOL), triglycerides (TRIG) and total lipids (TOTLIP)] was carried in blood samples (5-7 ml) collected of the jugular vein to intervals of three days, beginning the day previous to the fat supplementation. The determination of the hormonal concentration was carried in two samples collected daily to intervals of 12 hours of the jugular vein. The follicle stimulating hormone (FSH), growth hormone

(GH), insulin (Ins) and the like-insulin growth factors-1 (IGF-1) were determined by radioimmunoanalysis. The determination of the concentration of FSH, was carried with samples obtained of all the sheep, while the GH, Ins and IGF-1, were determined in 8 sheep by treatment. The results of the follicular dynamic, (number and diameter of follicles) were analyzed in ANOVA in randomly design, and the follicles were classified in small (2-3 mm), medium (4-5 mm) and big or preovulatory (≥ 6 mm). The comparison of means among treatments was with "t" Student test. The lipid metabolites (LDL, HDL, CHOL, TRIG and TOTLIP) and hormonal concentrations (FSH, GH, Ins and IGF-1) were analyzed by ANOVA for a mixed model with repeated measures. The means population ($\pm ee$) of follicles was bigger ($P=0.09$) in the AM group that the CG (11.28 ± 1.12 vs 8.80 ± 0.93 follicles for sheep, respectively). Likewise, although without significant differences ($P > 0.05$), the number of follicles for follicular diameter was higher in a general in the AM group, except in the follicles of 4 mm that was lightly superior ($P < 0.05$) in the CG (16 vs 13 follicles, respectively). A bigger number of small follicles ($P > 0.05$) was observed in AM group (7.5 ± 1.02) that in the CG (6.13 ± 0.80). The average of follicles of medium size, was lightly bigger ($P > 0.05$) in the AM group that in the CG. The big or preovulatory follicles or preovulatorios, was higher ($P < 0.05$) in AM group that in the CG (2.28 ± 0.22 vs 1.0 ± 0.13 , respectively). The maximum follicular diameter was superior ($P < 0.05$) in the Am group (7.12 ± 0.22 mm) that in the CG (5.56 ± 0.25 mm). The average concentration (mg/dl) of lipid metabolites was superior in the group of sheep that were supplemented with corn oil in the diet, nevertheless, alone significant differences were observed ($P < 0.01$) in the serum concentration of HDL, CHOL and TOTLIP among the AM and CG group (55.07 ± 3.07 vs 37.3 ± 3.10 ; 81.9 ± 3.48 vs 56.7 ± 3.52 ; 268.4 ± 17.4 vs 171.9 ± 18.6 , respectively). The effect of corn oil supplementation on FSH, GH, Ins and IGF-1, not was significant ($P > 0.05$), nevertheless, plasmatic concentration of the FSH was lightly superior in the CG (3.34 ± 0.44 ng/ml) with regard the CG (2.89 ± 0.46 ng/ml). The half concentration of GH and of IGF, although without significant differences ($P > 0.05$) was lightly superior in the AM group that the CG (5.59 ± 2.71 vs 1.54 ± 0.21 and 108 ± 3.17 vs 97.9 ± 2.9 ng/ml, respectively). The half concentration of insulin was similar for both groups. In conclusion the supplementation with corn oil exercises a positive effect on the follicular population and maximum follicular diameter, as well as in the serum concentration of HDL, CHOL and TOTLIP, but it didn't modify significant way the plasmatic concentrations of FSH, GH, Ins and IGF-1.

In the **experiment two** the objective was evaluate the effect of the addition of polyunsaturated fatty acids on

the fertility and prolificacy rate in sheep Pelibuey. The study was carried in the Campo Experimental Mococho (INIFAP) during the period February to Julio 2000, 91 Pelibuey sheep of good body condition (35-40 kg p.v.) were used. The estrous cycle was synchronized with norgestoment. The sheep that showed estrous were distributed in two groups, group control that received a concentrate that contained 2.7% of chicken oil (AP; n=46) and experimental group that received a concentrate with 4% of corn oil (AM; n=45) of total DM of the diet. The concentrate was provided daily (08:00) for 21 days, beginning with the supply the day seven after having keep the implants. During the experimental period the sheep grazed in native vegetation (07:00 to 13:00 h). Estrous detection for the service, was carried among the days 16 at 19 of the estrous cycle (estrous=day 0) and the sheep manifested estrous were breed for natural services. The gestation diagnosis of the sheep was carried through the rate of no return to estrous, observing the sheep twice a day (07:00 and 18:00 h), starting from the day 14 and until the day 24 post-service. In this study was registered the reproductive behavior (number of exposed, served and lambing), lambing type (simple or twice) of the sheep in both treatments and used for determination of fertility and prolificacy rate. The obtained results of fertility rate and lambing type were analyzed by Chi-square test. The prolificacy rate was analyzed by ANOVA randomly design and the comparison of among treatments was carried by Student "t" test. The number of sheep that manifested estrous and they were breed was bigger ($P>0.05$; $X^2=0.37$) in the AP group that the AM group (36 vs 30 sheep, respectively), while the number of lambing sheep was similar in both groups. The fertility rate didn't differ between both groups ($P>0.05$); however, it was around 8% superior in the AM group compared with the group AP (63.3% and 55.6%, respectively). A higher proportion was observed ($X^2=0.098$; $P=0.32$) of simple births in the AP group with regard to the AM group (90% vs 73.7%, respectively), while the proportion of twins was superior ($X^2=6.05$; $P=0.01$) in the AM that the AP (26.3% vs 10%, respectively). The prolificacy rate was 26% superior in AM that the AP group (1.26 ± 0.1 vs 1.1 ± 0.07 lambs born by sheep, respectively).

The objective of the **experiment three** was evaluate the effect of the addition of acids fatty polyunsaturated on the ovarian answer, development state and quality morphological of recovered embryos of superovulated Pelibuey sheep. The study was carried in the Faculty of Veterinary Medicine during January to February 2001. 26 Pelibuey sheep (35-40 kg of body weight) of good body condition. The estrous cycle was synchronized before beginning the fatty suplementación with two injections (i.m.) of $\text{PGF}_{2\alpha}$ (15 mg). The sheep received a basal diet compound by African start grass (*Cynodon nlemfuensis*) and they were distributed in two groups, control control (CG; n=13) that didn't receive additional

oil in the supplement and experimental group (AM; n=13) that received 4% of corn oil of total DM. The supplement was provided by 23 days beginning to the third day of the first injection of $\text{PGF}_{2\alpha}$ (in such a way the term the supplementation with corn oil coincided with the last day of the superovulatory treatment (TSO). The TSO began on the day 10 of the estrous cycle (estrous=day 0), using FSHp (200 mg/sheep) applied in decreased dose, twice per day, during four days. In third day of TSO, 15 mg of $\text{PGF}_{2\alpha}$ was applied (in two injections). The estrous detection was carried 24 h after applied the first dose of $\text{PGF}_{2\alpha}$ and the sheep that showed estrous behavior were mating for natural service to 0, 12 and 24 h. The embryo recovery was carries on day seven after the first service through a ventral laparotomy and the flushed of the uterine horns was carried in gravitational and intermittent form. The embryos search and evaluation was carries under microscope stereoscope (40X). The ovarian response [number of corpus luteum (CL), total collected cells (TCC) and collected embryos (EC)] was analyzed by ANOVA in a random design and the comparison of means was carrier by Student "t" test. The development state [morules (Mor) and blastocyst (Bla)] and the morphological quality [excellent (E), good (G); regular (R) and poor (P)] of the recovered embryos were analyzed by Wilcoxon test. The average (media $\pm$ ee) of CL (14.73 ± 1.87 vs 10.73 ± 1.42), TCC (9.18 ± 2.16 vs 4.18 ± 1.36) and EC (6.72 ± 1.78 vs 3.09 ± 1.36) was superior ($P<0.05$) in the AM group with regard CG, respectively. Likewise in the development state the addition of corn oil exercised a positive effect ($P<0.05$), observing a higher number of embryos in morule state in the AM group (5.90 ± 1.59) that in the CG (2.18 ± 1.30), while the average of embryos in blastocyst state was similar in both groups of sheep. The morphological embryonic quality of the embryos collected was not an effect of the fatty supplementation ($P>0.05$) was observed; however, in the AM group bigger proportion of embryos of quality E, G and R was observed that the CG, while in the CG was observe a higher proportion embryos of poor quality. In conclusion The corn oil in the diet of Pelibuey sheep have a positive effect on ovulatory response, total number of cells and embryos collected, as well as in the development stage and morphological quality of the collected embryos.

Key words: polyunsaturated fatty acids, sheep, reproduction