

DESARROLLO EMBRIONARIO EN OVEJAS PELIBUEY Y SUFFOLK EN CONDICIONES DE ESTRÉS CALÓRICO

EMBRYONIC DEVELOPMENT IN PELIBUEY AND SUFFOLK EWES UNDER HEAT STRESS CONDITIONS

Abigail Tabarez-Rojas¹, Antonio Porras-Almeraya¹, Humberto Vaquera-Huerta², Javier Hernández-Ignacio¹,
Javier Valencia¹, Susana Rojas-Maya¹, Joel Hernández-Cerón^{1*}

¹Departamento de Reproducción. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México, D. F. (jhc@servidor.unam.mx).

²Estadística. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230, Montecillo, Estado de México.

RESUMEN

El estrés calórico antes y después de la ovulación afecta el desarrollo embrionario en la oveja y se han observado diferencias genéticas en termotolerancia. En el presente trabajo se evaluó si el estrés calórico durante el periodo posovulatorio reduce la proporción de embriones transferibles y de blastocistos en ovejas, y si el efecto es menor en ovejas adaptadas a climas cálidos (Pelibuey) que en las no adaptadas (Suffolk). Se superovularon 32 ovejas. El día 2 del ciclo (estro=día 0), las ovejas se asignaron aleatoriamente a dos tratamientos: 1) estrés calórico (n=16; 8 Pelibuey y 8 Suffolk), del día 2 al 6 permanecieron 6 h al día en una cámara climática a 37 ± 2.5 °C y 25 % de humedad relativa (HR); 2) testigo (n=16; 8 Pelibuey y 8 Suffolk), se alojaron a temperatura ambiente (18 ± 3 °C y 50 % de HR). Se determinaron las concentraciones de progesterona diariamente del día 0 al 7. Los embriones se recolectaron el día 7. No se encontró diferencia ($p > 0.05$) entre el grupo de estrés calórico y el testigo en la proporción de embriones transferibles (55 vs 69 %), ni en la proporción de blastocistos (34 vs 42 %). Tampoco hubo diferencias entre razas ($p > 0.05$). Una mayor proporción ($p \leq 0.05$) de las ovejas del grupo de estrés calórico (26.7 %) tuvo regresión lútea prematura, pero ninguna en el grupo testigo. Se concluye que la exposición de ovejas Pelibuey y Suffolk a estrés calórico por 6 h diarias del día 2 al 6 después del estro no afecta el porcentaje de embriones transferibles ni de embriones que llegaron a la etapa de blastocisto, y no se observaron diferencias entre razas. El estrés calórico aumentó la proporción de ovejas con regresión prematura del cuerpo lúteo.

Palabras clave: Cuerpo lúteo, embriones, estrés calórico, ovejas.

ABSTRACT

Heat stress before and after ovulation affects embryonic development in sheep, and genetic differences in heat tolerance have been observed. In the present study, it has been assessed whether heat stress during the postovulatory period may reduce the proportion of transferable embryos and blastocysts in ewes, and if the effect on sheep adapted to warm climates (Pelibuey) is lower than that on unadapted ones (Suffolk). Thirty-two ewes were superovulated. On day 2 of the cycle (estrus=day 0), the ewes were randomly assigned to two treatments: 1) heat stress (n=16, 8 Pelibuey and 8 Suffolk), from day 2 to 6 they stayed in a climatic chamber 6 h a day, at 37 ± 2.5 °C and 25 % relative humidity (HR); 2) control (n=16; 8 Pelibuey and 8 Suffolk sheep), kept at environmental temperature (18 ± 3 °C and 50 % HR). Progesterone concentrations were determined daily from day 0 to 7. The embryos were collected on day 7. There was no difference ($p > 0.05$) between the group exposed to heat stress and the control with respect to the proportion of transferable embryos (55 vs 69 %), nor to the blastocyst proportion (34 vs 42 %); between breeds there were no differences either ($p > 0.05$). A larger proportion ($p \leq 0.05$) of ewes having been under thermal stress (26.7 %) had premature luteal regression, but none of the control group. It is concluded that Pelibuey and Suffolk ewes, exposed to heat stress for 6 h daily from day 2 to 6 after estrus, are not affected in their percentage of transferable embryos, nor of embryos having reached the blastocyst stage, and no difference between breeds was observed. Heat stress increased the proportion of ewes with premature luteal regression.

Key words: Corpus luteum, embryos, heat stress, ewes.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Abril, 2008. Aprobado: Junio, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 43: 671-680. 2009.

INTRODUCCIÓN

En la vaca, la exposición a estrés calórico provoca alta incidencia de mortalidad embrionaria (Hansen *et al.*, 2001), reduce la expresión de la conducta estral (De Rensis y Scaramuzzi, 2003), afecta la esteroidogénesis en las células foliculares (Roth *et al.*, 2001b; Bridges *et al.*, 2005) y disminuye el potencial de los ovocitos para desarrollar un embrión viable (Al-Katanani *et al.*, 2002; Roth y Hansen, 2004). Además hay diferencias raciales en la resistencia de los embriones al estrés calórico; así, los embriones de bovinos de razas adaptadas a los climas cálidos (Brahman y Romosinuano) son más resistentes al estrés calórico que los embriones de las no adaptadas (Holstein y Angus) (Paula-Lopes *et al.*, 2003; Hernández-Cerón *et al.*, 2004).

En la oveja, los estudios del efecto del estrés calórico en la función reproductiva son limitados. La exposición a una temperatura ambiental mayor de 32 °C disminuye la fertilidad (Kleeman y Walter, 2005), y la exposición a estrés calórico por 6 h al día antes y después de la ovulación disminuye la proporción de embriones transferibles (Naqvi *et al.*, 2004). En la oveja se han observado diferencias genéticas en la tolerancia al estrés calórico; las razas que evolucionaron en climas cálidos (Pelibuey) regulan mejor su temperatura corporal en condiciones de estrés calórico que las razas que lo hicieron en climas templados o fríos (Suffolk). Además, los linfocitos de ovejas Pelibuey producen mayores concentraciones de la proteína de choque térmico 70 (HSP-70) que los de ovejas Suffolk en condiciones de estrés calórico *in vitro* (Montero *et al.*, 2006).

De acuerdo con lo anterior, es importante determinar si la exposición a temperaturas ambientales altas durante el periodo posovulatorio afecta el desarrollo embrionario en la oveja y conocer si hay diferencias genéticas en la susceptibilidad a dicho efecto. El objetivo del presente estudio fue evaluar si la exposición a estrés calórico durante el periodo posovulatorio reduce la proporción de embriones transferibles y de embriones que llegan a la etapa de blastocisto en la oveja y si este efecto es menor en las ovejas adaptadas al clima cálido (Pelibuey) que en las no adaptadas (Suffolk).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en una estación experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional

INTRODUCTION

In cows, the exposure to heat stress provokes high incidence of embryo mortality (Hansen *et al.*, 2001), reduces the expression of estrus (De Rensis and Scaramuzzi, 2003), affects steroidogenesis in follicular cells (Roth *et al.*, 2001b; Bridges *et al.*, 2005), and diminishes oocyte potential to develop a viable embryo (Al-Katanani *et al.*, 2002; Roth and Hansen, 2004). Furthermore, there are breed differences in embryo resistance to thermal stress; thus, bovine embryos of breeds adapted to hot climates (Brahman and Romosinuano) are more heat-tolerant than those of unadapted breeds (Holstein and Angus) (Paula-Lopes *et al.*, 2003; Hernández-Cerón *et al.*, 2004).

In sheep, the studies of heat stress effect on reproductive function are limited. Exposure to environmental temperature above 32 °C diminishes fertility (Kleeman and Walter, 2005), and the exposure to thermal stress for 6 h a day before and after ovulation reduces the proportion of transferable embryos (Naqvi *et al.*, 2004). In ewes, genetic differences in heat tolerance have been observed; the breeds developed in hot climates (Pelibuey) adjust their body temperature to heat stress conditions better than the breeds accustomed to temperate or cold climate do (Suffolk). Furthermore, Pelibuey ewe lymphocytes produce higher protein concentrations of heat shock protein70 (HSP-70) than those of Suffolk ewes under *in vitro* heat stress conditions (Montero *et al.*, 2006).

According to the aforementioned, it is important to determine if exposure to high environmental temperatures during postovulatory period affects embryo development in the ewe, and to recognize if there are genetic differences in susceptibility to such effect. The objective of the present study was evaluating whether the exposure to heat stress during postovulatory period diminishes the proportion of transferable embryos and of embryos reaching the blastocystic phase in the ewe, and whether this effect is lower in sheep adapted to hot climate (Pelibuey) than in the unadapted ones (Suffolk).

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out at an experimental station of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, located on the federal highway México-Cuernavaca. The climate of the region is semi cold-semi

Autónoma de México, localizada en la carretera federal México-Cuernavaca. El clima de la región es semifrío-semihúmedo, con lluvias de mayo a octubre (precipitación anual de 800 a 1200 mm) (García, 1981).

Animales experimentales y tratamientos

Se utilizaron 32 ovejas ciclando (16 Pelibuey y 16 Suffolk), multíparas y con condición corporal 3 en una escala de 1 a 5 (Russel *et al.*, 1969). Las ovejas fueron alimentadas con una dieta a base de heno de avena con melaza, ensilado de maíz y concentrado comercial. El estudio se realizó en septiembre y octubre de 2007, que corresponden a la plena época reproductiva de esta especie en México (Arroyo *et al.*, 2007).

En las ovejas se insertó una esponja intravaginal con 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA) (ChronoGest, Intervet), la cual permaneció *in situ* 10 d. Dos días antes de retirar la esponja inició el tratamiento superovulatorio, para lo cual se usó la hormona folículo estimulante (FSH) de origen porcino (Folltropin-V, Bioniche): 180 mg im para las ovejas Pelibuey y 200 mg para las Suffolk, cada 12 h durante 4 d en un esquema decreciente. Al momento de retirar la esponja se aplicaron 0.075 mg de Cloprostenol (Prosolvlin C, Intervet) y 24 h después inició la detección de estros dos veces al día, usando un carnero provisto con un mandil. En las hembras que presentaron estro se hizo monta dirigida con un semental de la misma raza cada 8 h, mientras permanecieron receptivas. Se colocó una esponja intravaginal con FGA en todas las ovejas 8 h después de la última monta (Mejía *et al.*, 2000).

El día 2 del ciclo estral (estro = día 0), las ovejas se asignaron aleatoriamente a dos tratamientos: 1) estrés calórico (n=16; 8 Pelibuey y 8 Suffolk), del día 2 al 6 del ciclo permanecieron 6 h al día en una cámara climática a 37 ± 2.5 °C y 25 % de humedad relativa (HR) [índice temperatura humedad (THI)=82]; 2) testigo (n=16; 8 Pelibuey y 8 Suffolk), se alojaron a temperatura ambiente (18 ± 3 °C y 50 % de HR; THI=63). Se registraron la temperatura rectal y la frecuencia respiratoria durante el periodo de exposición.

Toma de muestras y medición de progesterona

En las ovejas se tomó una muestra de sangre diariamente del día 0 al 7 después del estro. Las muestras se recolectaron mediante punción en la vena yugular en tubos al vacío con anticoagulante (heparina) y se centrifugaron 15 min a 1500 x g. El plasma fue separado y conservado a -20 °C hasta su análisis. Se determinaron las concentraciones de progesterona mediante radioinmunoanálisis en fase sólida (Coat-A-Count, DPC, USA), con una sensibilidad del ensayo de 0.1 ng mL⁻¹ y un coeficiente de variación intra-ensayo de 13.6 %.

humid with rainfalls from May to October (annual precipitation 800-1200 mm) (García, 1980).

Experimental animals and treatments

Thirty-two cycling multiparous ewes (16 Pelibuey and 16 Suffolk) were utilized with body condition 3 on a scale from 1 to 5 (Russel *et al.*, 1969). The ewes were fed on a diet based on oat hay with molasses, corn silage, and concentrate. The experiment was carried out in September and October 2007, which correspond to the breeding season of this species in Mexico (Arroyo *et al.*, 2007).

An intravaginal sponge with 40 mg of fluorogestone acetate (FGA) (ChronoGest, Intervet) was introduced to the ewes remaining *in situ* for 10 d. Two days before removing the sponge, the superovulatory treatment began, for which the follicle stimulating hormone (FSH) of porcine origin (Folltropin-V, Bioniche) was used: 180 mg im for Pelibuey, and 200 mg for Suffolk sheep, every 12 h during 4 d following a decreasing scheme. At the moment of removing the sponge, 0.075 mg of Cloprostenol (Prosolvlin C, Intervet) were applied, and 24 h afterwards estrus detection began twice a day using a ram provided with an apron. In females presenting estrus, mating was directed using a ram of the same breed, every 8 hours, while the ewes were in estrus. An intravaginal sponge with FGA was placed into all the ewes 8 h after the last mating (Mejía *et al.*, 2000).

On the 2nd day of the estrus cycle (estrus = 0), the sheep were assigned at random to two treatments: 1) heat stress (n = 16; 8 Pelibuey and 8 Suffolk ewes), from day 2 to 6 of the cycle they remained in a climate chamber during 6 h a day, at 37 ± 2.5 °C and 25% relative humidity (HR) [temperature humidity index (THI)=82]; 2) control (n=16; 8 Pelibuey and 8 Suffolk) were kept at environmental temperature (18 ± 3 °C and 50 % HR; THI=63). Rectal temperature and respiration rate were recorded during the period of exposure.

Sampling and progesterone measurement

Daily, a blood sample was taken from the ewes, from day 0 to 7 after estrus. The samples were collected through jugular vein puncture in vacuum tubes with anticoagulant (heparina) and centrifuged for 15 min at 1500 x g. The plasma was separated and kept at -20 °C until its analysis. Progesterone concentrations were determined by radioimmunoassay in solid phase (Coat-A-Count, DPC, USA.) with assay sensitivity of 0.1 ng mL⁻¹ and an interassay variation coefficient of 13.6 %.

It was considered that premature luteal regression occurred when progesterone concentrations increased to more than 1 ng mL⁻¹ after estrus and returned to basic levels on day 7 (Mejía *et*

Se consideró que ocurrió regresión prematura del cuerpo lúteo cuando las concentraciones de progesterona se elevaron más de 1 ng mL^{-1} después del estro y regresaron a niveles basales el día 7 (Mejía *et al.*, 2000). Al momento de la recolección embrionaria se evaluaron visualmente los cuerpos lúteos: <5 mm de diámetro y blanquecinos fueron clasificados como cuerpos lúteos en regresión, mientras que los cuerpos lúteos > 5 mm de diámetro y rojizos se clasificaron como normales (Schiewe *et al.*, 1991).

Recolección embrionaria

Los embriones se recolectaron mediante laparotomía media ventral 7 d después del estro. Las estructuras recuperadas fueron clasificadas con base en su morfología (Lindner y Wright, 1983). Después de la recolección, los embriones se procesaron para determinar el número de células, de acuerdo con la técnica descrita por Hernández-Cerón *et al.* (2004).

Análisis estadístico

El diseño estadístico fue completamente al azar. Se compararon la temperatura rectal y la frecuencia respiratoria entre tratamientos y entre razas mediante análisis de varianza para mediciones repetidas y el modelo de análisis mixto (Proc MIXED) usando SAS (2003). El porcentaje de ovejas con regresión prematura del cuerpo lúteo, de acuerdo con los niveles de progesterona plasmática, se comparó con una prueba de dos proporciones binomiales (Montgomery and Hines, 1993). Las proporciones de cuerpos lúteos con regresión prematura, de embriones transferibles y de blastocistos, se analizaron mediante una comparación de medias de dos poblaciones Poisson independientes, usando el paquete estadístico MINITAB (Minitab, 2006). El número de células embrionarias se comparó mediante análisis de varianza por el procedimiento GLM (SAS, 2003), previa transformación de los datos (raíz cuadrada) para satisfacer el supuesto de normalidad (Federer, 1955).

Dos ovejas Pelibuey del tratamiento de estrés calórico no se sometieron a la técnica de recolección embrionaria; una no respondió al tratamiento superovulatorio y la otra presentó adherencias en el útero, por lo que no fueron consideradas en el análisis de la respuesta superovulatoria. Sin embargo, ambas ovejas fueron incluidas en el análisis de la temperatura rectal y la frecuencia respiratoria, y sólo una se consideró para analizar la función del cuerpo lúteo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las proporciones de embriones transferibles y de embriones que llegaron a la etapa de blastocisto fueron

al., 2000). At the moment of embryo collection, corpora lutea were visually assessed: <5 mm diameter and whitish, they were classified as corpora lutea in regression, whereas reddish corpora lutea, >5mm diameter, were categorized as normal (Schiewe *et al.*, 1991).

Embryo collection

Seven days after estrus, embryos were collected by midventral laparotomy. The recovered structures were classified based on their morphology (Lindner and Wright, 1983). After collection, the embryos were processed to determine the number of cells according to the technique described by Hernández-Cerón *et al.* (2004).

Statistical analysis

The statistical design was completely randomized design. Rectal temperature and respiration rate between treatments and breeds were compared by variance analysis for repeated measurements and the mixed analysis model (Proc MIXED), using SAS (2003). The percentage of ewes with premature luteal regression, according to the levels of plasmatic progesterone, was compared by a test of two binomial proportions (Montgomery and Hines, 1993). The proportions of corpora lutea with premature regression, of transferable embryos and blastocysts were analyzed by comparison of means of two independent Poisson populations, using the MINITAB statistical package (Minitab, 2006). The number of embryo cells was compared by analysis of variance by GLM procedure (SAS, 2003), previous data transformation (square root), in order to satisfy assumed normality (Federer, 1955).

Two Pelibuey ewes of the heat stress treatment were not submitted to the embryo collection technique; one did not respond to the superovulatory treatment, and the other presented adherences in the uterus; therefore, they were not considered in the analysis of superovulatory response. Both ewes, however, were included in rectal temperature and respiration rate analyses, and only one was considered for analyzing corpus luteum function.

RESULTS AND DISCUSSION

The proportion of transferable embryos and of those having reached blastocyst phase were similar among treatments ($p>0.05$), and there were no differences between breeds ($p>0.05$; Table 1). These results are different from the ones obtained by Naqvi *et al.* (2004), where the exposure to thermal stress during pre- and postovulatory period reduced the proportion of

similares entre tratamientos ($p>0.05$) y no hubo diferencias entre razas ($p>0.05$; Cuadro 1). Estos resultados son diferentes a los obtenidos por Naqvi *et al.* (2004), donde la exposición a estrés calórico durante el periodo pre y posovulatorio redujo la proporción de embriones transferibles en ovejas Merino. La diferencia de los resultados entre ambos estudios probablemente obedece al grado del estrés calórico y al periodo de exposición. En el presente trabajo las ovejas fueron sometidas a una temperatura de 37 °C y 25 % de HR por 6 h diarias del día 2 hasta el día 6 postestro, mientras que en el estudio de Naqvi *et al.* (2004) las ovejas fueron expuestas a 40 °C y 58 % de HR por 6 h al día durante 4 semanas (antes y después de la ovulación). Así, la combinación de mayor temperatura y humedad en el estudio de Naqvi *et al.* (2004) pudo provocar un grado mayor de estrés calórico en las ovejas que en el presente estudio. Además, la exposición antes de la ovulación pudo influir en la respuesta, ya que hay evidencia de que el estrés calórico afecta el desarrollo folicular y, en particular, a los ovocitos (Roth y Hansen, 2005). Según Roth *et al.* (2001a), la exposición de vacas lecheras a estrés calórico durante el verano afecta la fertilidad en el otoño. Asimismo, los ovocitos recolectados de vacas expuestas a estrés calórico tienen menor potencial para desarrollar embriones viables en condiciones *in vitro* (Al-Katanani *et al.*, 2002). Los resultados del presente trabajo también difieren de los encontrados en estudios *in vitro* con embriones bovinos; Rivera y Hansen (2001) y Paula-Lopes y Hansen (2002) observaron que 6 h de estrés térmico en cualquiera de los días 2 a 4 posfertilización afecta negativamente el desarrollo embrionario.

En la oveja la fertilidad está negativamente correlacionada con el número de días de la semana durante el empadre en que la temperatura ambiental es mayor de 32 °C (Kleemann y Walker, 2005), lo cual concuerda con los resultados de Naqvi *et al.* (2004) donde la exposición a 40 °C durante el periodo pre y posovulatorio

transferable embryos in Merino sheep. The difference of the results between both studies probably is due to the degree of heat stress and to the period of exposure. In the present research, the ewes were submitted to a temperature of 37 °C and 25 % HR for 6 h daily, starting from the 2nd to the 6th day post estrus, while Naqvi *et al.* (2004) in their study had the ewes exposed to 40 °C and 58 % HR for 6 h a day during 4 weeks (before and after ovulation). Thus, the combination of higher temperature and humidity in Naqvi's *et al.* work (2004), could provoke higher degree of heat stress in the sheep than the present study. Furthermore, the exposure previous to ovulation may have influenced the response, since there is evidence that heat stress affects follicle development, and particularly, oocytes (Roth and Hansen, 2005). According to Roth *et al.* (2001a), exposure of dairy cows to thermal stress during the summer has an impact on fertility in the fall. Likewise, the oocytes gathered from heat-stressed cows have less potential to develop viable embryos under *in vitro* conditions (Al-Katanani *et al.*, 2002). Results of the present experiment also differ from those found in studies *in vitro* with bovine embryos; Rivera and Hansen (2001) and Paula-Lopes and Hansen (2002) observed that 6 h of heat stress on any of post-fertilization days 2 to 4 has negative effect on embryo development.

Fertility in the ewe is correlated negatively to the number of days of the week during mating, when the environmental temperature is above 32 °C (Kleemann and Walker, 2005), which agrees with the results obtained by Naqvi *et al.* (2004), where exposure to 40 °C in the pre- and postovulatory period reduced the proportion of transferable embryos. The quoted studies and the results of the present work, where a negative effect of heat stress on embryo development during postovulatory period was not observed, allow suggesting that heat stress in the ewe affects fertility only after a long time of exposure, which may include

Cuadro 1. Estructuras totales, porcentajes de ovocitos fertilizados, embriones transferibles y blastocistos en ovejas en estrés calórico y testigos.

Table 1. Total structures, percentages of fertilized oocytes, transferable embryos, and blastocysts in ewes under heat stress, and control groups.

Tratamientos	n	Estructuras totales	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Blastocistos
Estrés calórico	14	150	88 % (132/150)	55 % (73/132)	34 % (45/132)
Testigo	16	163	87 % (142/163)	69 % (98/142)	42 % (60/142)

No hubo diferencias entre tratamientos ($p>0.05$) ♦ No differences among treatments ($p>0.05$).

redujo la proporción de embriones transferibles. Los estudios citados y los resultados del presente trabajo, donde no se observó un efecto negativo del estrés calórico durante el periodo posovulatorio en el desarrollo embrionario, permiten proponer que en la oveja el estrés calórico afecta la fertilidad sólo después de un periodo largo de exposición que incluya los periodos pre y posovulatorio y que posiblemente se requiere mayor grado de estrés calórico para afectar el desarrollo temprano del embrión.

La ausencia de diferencias genéticas en la susceptibilidad de los embriones al estrés calórico contrasta con lo observado en estudios con bovinos, donde los embriones de vacas de razas adaptadas a climas cálidos (Brahman y Romosinuano) son más resistentes al estrés calórico que los embriones de vacas no adaptadas (Holstein y Angus) (Paula-Lopes *et al.*, 2003; Hernández-Cerón *et al.*, 2004).

El número de células embrionarias fue similar entre tratamientos y no se observó efecto de la raza, ni de la interacción tratamiento $\times$ raza ($p > 0.05$; Cuadro 2). Estos resultados son diferentes a los obtenidos en otros trabajos, donde la exposición de embriones bovinos a estrés calórico reduce la proporción de embriones que llegan a la etapa de blastocisto y el número de células de estos embriones (Jousan y Hansen, 2004; Sakatani *et al.*, 2004). Aunque en el presente estudio se evaluaron los efectos más evidentes del estrés calórico en los embriones, falta determinar si hay diferencia en la proporción de células en apoptosis, ya que esta condición indica el daño embrionario provocado por el estrés calórico (Paula-Lopes y Hansen, 2002; Jousan y Hansen, 2004).

El estrés calórico afectó la función del cuerpo lúteo, ya que 30.1 % de los cuerpos lúteos de las ovejas sometidas a estrés calórico tuvieron regresión prematura en contraste con 9.5 % en las del grupo testigo ($p < 0.01$). Cabe señalar que la evaluación anterior se hizo visualmente, con base en el tamaño y color de los cuerpos lúteos (Schiewe *et al.*, 1991), pero la regresión lútea fue corroborada con los niveles plasmáticos de progesterona; así, 26.7 % de las ovejas del grupo de estrés calórico mostraron regresión prematura, mientras que ninguna oveja del grupo testigo la presentó. Este hallazgo es interesante ya que en nuestro conocimiento no se había informado antes. El mecanismo por el cual el estrés calórico indujo la regresión lútea prematura se desconoce. Sin embargo, en los rumiantes domésticos es frecuente que se desarrollen cuerpos lúteos de vida

pre- and postovulatory periods and possibly requires higher degree of thermal stress to affect the early development of the embryo.

Absence of genetic differences in embryo susceptibility to heat stress contrasts with observations in studies with cattle, where cow embryos of breeds adapted to hot climates (Brahman and Romosinuano) are more resistant to heat stress than the embryos of unadapted cows (Holstein and Angus) (Paula-Lopes *et al.*, 2003; Hernández-Cerón *et al.*, 2004).

The number of embryo cells was similar among treatments, and breed effect was not observed, nor interaction of treatment $\times$ breed ($p > 0.05$; Table 2). These results are different from those obtained in other studies, where exposure of bovine embryos to thermal stress reduces the proportion of embryos reaching the blastocyst stage, and the number of their cells (Jousan and Hansen, 2004; Sakatani *et al.*, 2004). Although in the present study the most evident effects of heat shock in embryos have been assessed, it has not been determined yet whether there is a difference in the proportion of apoptotic cells since this condition also indicates embryonic damage provoked by heat shock (Paula-Lopes and Hansen, 2002; Jousan and Hansen, 2004).

Heat stress affected corpus luteum function, since 30.1 % of corpora lutea of ewes submitted to heat stress had premature regression, compared to 9.5 % in those of the control group ($p < 0.01$). It is worth pointing out that the previous assessment was made visually based on size and color of the corpora lutea (Schiewe *et al.*, 1991) but the luteal regression was confirmed with plasmatic progesterone levels; thus 26.7 % of the heat-stressed ewes showed premature regression, whereas

Cuadro 2. Número de células de embriones en las etapas de mórula y blastocisto de ovejas en estrés calórico y testigos[†].

Table 2. Number of embryo cells at stages of morula, and sheep blastocyst under heat stress, and control groups[†].

Tratamientos	Mórulas (n)	Número de células	Blastocistos (n)	Número de células
Estrés calórico	61	27.5 $\pm$ 3.7	19	48.3 $\pm$ 5.0
Testigo	72	30.4 $\pm$ 3.6	27	46.9 $\pm$ 3.3

No hubo diferencias entre tratamientos ($p > 0.05$) $\diamond$ No differences among treatments ($p > 0.05$).

[†]Se muestran las medias aritméticas sin transformación $\diamond$ Arithmetic means are shown without transformation.

corta, por la falta de exposición a progesterona de un ciclo estral previo, como ocurre en la primera ovulación de la pubertad, en el posparto o al inicio de la estación reproductiva (Garverick *et al.*, 1992). También los cuerpos lúteos de vida corta pueden presentarse en cabras (Saharrea *et al.*, 1998) y ovejas (Mejía *et al.*, 2000) superovuladas. La regresión prematura del cuerpo lúteo ocurre por la secreción adelantada de la prostaglandina F2 α (PGF2 α), lo cual sucede cuando aparecen prematuramente receptores a oxitocina en el endometrio (Garverick *et al.*, 1992).

La regresión lútea prematura encontrada en las ovejas con estrés calórico puede estar asociada con el tratamiento superovulatorio, ya que Rodríguez *et al.* (2007) no encontraron ningún efecto del estrés calórico en la función lútea en ovejas no superovuladas. En el citado estudio se aplicó un estrés calórico 2 d después del estro hasta el retorno al estro, y no fueron afectadas las concentraciones de progesterona ni la longitud de la fase lútea. En cabras superovuladas la liberación de la PGF2 α se asocia con la presencia de folículos anovulatorios, los cuales secretan estradiol, condición que adelanta la síntesis de receptores a oxitocina en el endometrio (Saharrea *et al.*, 1998). Se requieren más estudios en condiciones de estrés calórico para corroborar la ocurrencia de regresión lútea prematura en ovejas superovuladas y determinar las causas de dicho proceso. No obstante, los hallazgos del presente estudio deben considerarse para los programas de transferencia de embriones durante los meses cálidos del año.

Las ovejas que permanecieron en la cámara climática tuvieron un incremento ($p \leq 0.01$) de la temperatura rectal y frecuencia respiratoria (Cuadro 3), lo cual es un indicador de estrés calórico (Finocchiaro *et al.*, 2005). Además, el THI en la cámara climática fue superior (82) al THI en que las vacas (72) muestran baja fertilidad (Lozano *et al.*, 2005). No obstante, la temperatura rectal de las ovejas mostró sólo un aumento de 0.4 °C, lo que contrasta con el aumento que tienen las vacas lecheras expuestas a estrés calórico, el cual puede ser hasta de 2.2 °C (Ealy *et al.*, 1993). Esta diferencia en la temperatura rectal que experimentan las ovejas y las vacas en estrés calórico puede explicar la ausencia de un efecto en el desarrollo embrionario observado en el presente estudio. Las ovejas Pelibuey mostraron más tolerancia al estrés calórico, ya que durante el experimento su temperatura rectal y frecuencia respiratoria fueron siempre menores que las Suffolk, lo que coincide con otros estudios (Thimonier y Chemineau,

none of the control group presented this condition. This find is interesting since - as far as we know - it had not been reported previously. The mechanism, by which heat stress has induced premature luteal regression, is not known. Nevertheless, in domestic ruminants, it often happens that short-lived corpora lutea are developed, because of lacking exposure to progesterone of a previous estrus cycle, such as occurs at first ovulation of puberty, post partum, or at the beginning of the reproductive season (Garverick *et al.*, 1992). Short-lived corpora lutea may also occur in superovulated goats (Saharrea *et al.*, 1998) and sheep Mejía *et al.*, 2000). Premature corpus luteum regression takes place because of advanced F2 α prostaglandin secretion (PGF2 α), which happens when oxitocin receptors appear prematurely in the endometrium (Garverick *et al.*, 1992).

Premature luteal regression present in heat-stressed ewes may be associated to superovulatory treatment, since Rodríguez *et al.* (2007) did not find any effect of heat stress on luteal function in non-superovulated ewes. In the quoted study, thermal stress was applied 2 d after estrus until returning to estrus, and neither progesterone concentrations nor luteal phase length were affected. In superovulated goats, PGF2 α release is related to the presence of anovulatory follicles, which secrete estradiol, condition which advances oxitocin receptor synthesis in endometrium (Saharrea *et al.*, 1998). Further studies on heat stress conditions are required to corroborate the occurrence of premature luteal regression in superovulated ewes and to determine the causes of this process. Nevertheless, the finds of the present study should be considered for embryo transfer programs during the hot months of the year.

The ewes remaining in the climate chamber had an increase ($p \leq 0.01$) of rectal temperature and respiration rate (Table 3), which is an indicator of thermal stress (Finocchiaro *et al.*, 2005). Besides, THI in the climate chamber was higher (82) than THI in which the cows (72) show low fertility (Lozano *et al.*, 2005). However, the rectal temperature of the sheep only had an increment of 0.4 °C, which contrasts with the increase in dairy cows exposed to heat stress, that may rise up to 2.2 °C (Ealy *et al.*, 1993). This difference in rectal temperature experienced by ewes and cows under heat stress conditions may explain the absence of impact on embryo development observed in the present study. Pelibuey ewes showed more

Cuadro 3. Temperatura rectal y frecuencia respiratoria de ovejas Pelibuey y Suffolk en estrés calórico y testigos.
Table 3. Rectal temperature and respiration rate of Pelibuey and Suffolk ewes under heat stress, and control groups.

Tratamientos	Pelibuey		Suffolk	
	Temperatura rectal (°C)	Frecuencia respiratoria (resp min ⁻¹)	Temperatura rectal (°C)	Frecuencia respiratoria (resp min ⁻¹)
Estrés calórico	38.9 ± 0.1ac	89.6 ± 11.4ae	39.3 ± 0.2ad	105.4±10.4af
Testigo	38.5 ± 0.2bc	41.7 ± 5.4be	38.9 ± 0.2bd	58.1±7.4bf

ab Diferente literal en una columna indica diferencia ($p \leq 0.01$) ♦ Different literal in a column indicates difference ($p \leq 0.01$).

cd y ef Diferente literal en una hilera indica diferencia ($p \leq 0.01$) ♦ Different literal in a row indicates difference ($p \leq 0.01$).

1988; Martínez *et al.*, 2005). La mayor capacidad para regular la temperatura corporal de las ovejas Pelibuey estrés calórico puede obedecer fundamentalmente a los mecanismos de disipación del calor que desarrollaron estas ovejas durante su proceso de adaptación a los climas tropicales y subtropicales. Así, la presencia de pelo en lugar de lana y menores depósitos de grasa subcutánea en comparación con las ovejas Suffolk, contribuyen a que las ovejas Pelibuey pierdan calor y se termorregulen más eficazmente (Ross *et al.*, 1985).

CONCLUSIONES

La exposición de ovejas Pelibuey y Suffolk a estrés calórico durante 6 h diarias del día 2 al 6 después del estro no afectó el porcentaje de embriones transferibles ni de embriones que llegaron a la etapa de blastocisto y no se observaron diferencias entre razas. El estrés calórico aumentó la proporción de ovejas con regresión prematura del cuerpo lúteo.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México, Proyecto IN222305.

LITERATURA CITADA

Al-Katanani, Y. M., F. F. Paula-Lopez, and P. J. Hansen. 2002. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 85:390-396.
 Arroyo, L.J., J. Gallegos-Sánchez, A. Villa-Godoy, J.M. Berruecos, G. Perera, and J. Valencia. 2007. Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19° north latitude. *Anim. Reprod. Sci.* 102:24-30.

heat tolerance, since during the experiment, their rectal temperature and respiration rate were always recorded lower than those for Suffolk sheep, which agrees with other studies (Thimonier and Chemineau, 1988, Martínez *et al.*, 2005). Greater capacity of regulating body temperature in Pelibuey ewes under heat stress may be essentially due to the mechanisms of heat dissipation developed by these sheep during their process of adaptation to tropical and subtropical climates. Thus, the presence of hair instead of wool and lesser subcutaneous fat depots, compared to Suffolk sheep, contribute to the Pelibuey sheep losing heat and regulating heat more efficiently (Ross *et al.*, 1985).

CONCLUSIONS

The exposure of Pelibuey and Suffolk sheep to heat stress during 6 h daily from the 2nd to the 6th day after estrus, did not affect the percentage of transferable embryos, nor of embryos reaching blastocyst stage, and differences between breeds were not observed either. Thermal stress increased the proportion of ewes with premature luteal regression.

End of the English version—



- Bridges, P. J., M. A. Brusie, and J. E. Fortune. 2005. Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. *Domestic Anim. Endocrinol* 29:508-522.
- De Rensis, F., and R. J. Scaramuzzi. 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow – a review. *Theriogenology* 60:1139-1151.
- Ealy, D. A., M. Drost, and J. P. Hansen. 1993. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.* 76:2899-2905.
- Federer, W. T. 1955. *Experimental Design: Theory and Application*. The Macmillan Company. New York, USA. pp:45-58.
- Finocchiaro, R., J. B. Van Kaam, B. Portolano, and I. Misztal. 2005. Effect of heat stress on production of Mediterranean dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 88:1855-1864.
- García E. 1981. *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen*. 3ª edición. Instituto de Geografía UNAM. México. 246 p.
- Garverick, H. A., W. G. Zollers, and M. F. Smith. 1992. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Anim. Reprod. Sci.* 28:111-124.
- Hansen, P. J., M. Drost, R. M. Rivera, F. F. Paula-Lopes, Y. M. Al-Katanani, C. E. Krininger, and C. C. Chase. 2001. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* 55:91-103.
- Hernández-Cerón, J., C. C. Chase, and J. P. Hansen. 2004. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus breeds. *J. Dairy Sci.* 87:53-58.
- Jousan, F. D., and P. J. Hansen. 2004. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol. Reprod.* 71:1665-1670.
- Kleemann, D. O., and S. K. Walker. 2005. Fertility in South Australian commercial Merino flocks: relationships between reproductive traits and environmental cues. *Theriogenology* 63:2416-2433.
- Lindner, G. M. and R. W. Wriugh. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20:407-416.
- Lozano D., R. R. C. G. Vásquez P., y E. González P. 2005. Factores asociados del estrés calórico y producción de leche sobre la tasa de gestación en bovinos en sistemas intensivos. *Téc. Pecu. Méx.* 43:197-210.
- Martínez D., N., H. Montaldo V., J. Valencia M., A. Porras A., y J. Hernández-Cerón. 2005. Temperatura rectal, frecuencia respiratoria y niveles de cortisol en ovejas Pelibuey y Suffolk en condiciones de estrés térmico. *In: Memorias XIX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal*. Tampico México. pp:654.
- Mejía V., O., C. Murcia M., J. Valencia M., y F. Espinosa A. 2000. Administración posmonta de acetato de fluorogestona en ovejas donadoras de embriones. *Vet. Méx.* 31:129-135.
- Minitab Inc. 2006. *Minitab Statistical Software*, Release 15 for Windows, State College, Pennsylvania.
- Montero A., J. Hernández-Cerón, H. Montaldo, A. Cortéz, y R. Romero. 2006. Concentración de la proteína de choque calórico 70 (HSP-70) en linfocitos de ovejas Pelibuey y Suffolk en condiciones de estrés calórico. *In: Memorias de XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. Veracruz, México. pp:4.
- Paula-Lopes, F. F., and P. J. Hansen. 2002. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol. Reprod.* 66:1169-1177.
- Paula-Lopes, F. F., C. C. Chase, Y. M. Al-Katanani, C. E. Krininger, R. M. Rivera, S. Tekin, A. C. Majewski, O. M. Ocon, T. A. Olson, and P. J. Hansen. 2003. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction* 125:285-294.
- Rivera, R. M., and P. J. Hansen. 2001. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction* 121:107-115.
- Rodríguez M., H. H. Montaldo, A. Balcázar, y J. Hernández-Cerón. 2009. Niveles de progesterona sérica en ovejas Pelibuey y Suffolk sometidas a estrés térmico. *Vet. Méx.* 40:197-202.
- Ross, T. T., L. Goode, and A. C. Linnerud. 1985. Effects of high ambient temperature on respiration rate, rectal temperature, fetal development and thyroid gland activity in tropical and temperature breeds of sheep. *Theriogenology* 24:259-270.
- Roth, Z., A. Arav, A. Bor, Y. Zeron, R. Braw-Tal, and D. Wolfenson. 2001a. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* 122:737-744.
- Roth, Z., and P. J. Hansen. 2004. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol. Reprod.* 71:1898-1906.
- Roth, Z., and P. J. Hansen. 2005. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction* 129:235-244.
- Roth, Z., R. Meidan, A. Shaham-Albalancy, R. Braw-Tal, and D. Wolfenson. 2001b. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 121:745-751.
- Russel, J. F., J. M. Doney, and R. G. Gunn. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci. Cambridge* 72:451-454.
- Saharrea, A., J. Valencia, A. Balcázar, O. Mejía, J. L. Cerbón, V. Caballero, and L. Zarco. 1998. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology* 50:1039-1052.
- Sakatani, M., S. Kobayashi, and M. Takahashi. 2004. Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. *Molecular Reprod. Develop.* 67:77-82.
- SAS Institute Inc. 2003. *SAS OnlineDocâ 9.1*. Cary, NC. SAS Institute Inc. USA.
- Schiewe, M. C., T. A. Fitz, J. L. Brown, L. D. Stuart, and D. E. Wildt. 1991. Relationship of oestrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F-2a receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. *J. Reprod. Fertility* 93:19-30.
- Thimonier, J., and P. Chemineau. 1988. Seasonality of reproduction in female farm animals under a tropical environment (cattle, sheep and goats). *In: Memory 11 International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*. Dublin, Ireland. pp:229-237.