

EFFECTO DEL SITIO DE DEPOSICIÓN DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LA TASA DE OVULACIÓN Y FORMACIÓN DEL CUERPO LÚTEO EN ALPACAS

EFFECT OF THE DEPOSITION SITE OF SEMINAL PLASMA ON THE OVULATION AND CORPUS LUTEUM DEVELOPMENT IN ALPACAS

Susan Panéz L.¹, Wilfredo Huanca L.^{1,2}, Teodosio Huanca M.³, Marcelo Ratto F.⁴ y Gregg Adams⁴

RESUMEN

El estudio tuvo por objetivo evaluar el sitio de deposición del plasma seminal sobre la tasa de ovulación y formación del cuerpo lúteo en alpacas. Se seleccionaron 91 hembras no lactantes con folículos ≥ 7 mm detectados por ecografía transrectal. Se sincronizó la onda folicular con la aplicación de 5 mg de LH, y 12 días después, se determinó la presencia de un folículo dominante (≥ 7 mm). Las hembras se distribuyeron al azar en seis tratamientos: G₁=16 (Plasma seminal vía intramuscular), G₂=15 (PBS vía intramuscular), G₃=16 (Plasma seminal vía intrauterina), G₄=15 (PBS vía intrauterina), G₅=15 (Plasma seminal vía intrauterina con curetaje), G₆=14 (PBS vía intrauterina con curetaje). La tasa de ovulación y presencia de cuerpo lúteo se determinó mediante ecografía el día D₂ y D₈ (D₀ = inicio del tratamiento). Se tomó muestras de sangre los días D₀, D₃ y D₉ para determinar perfiles séricos de progesterona mediante RIA. La tasa de ovulación fue de 93.8, 37.5 y 66.5% para G₁, G₃ y G₅, respectivamente, y no se registraron ovulaciones en los otros grupos. Se encontró que las alpacas G₁ producirían 25 veces más ovulaciones con respecto al G₃. Los resultados sugieren que la absorción del factor inductor de ovulación (FIO) del plasma seminal es vía sistémica y que el curetaje facilitaría la absorción del FIO incrementando el efecto ovulatorio del plasma seminal.

Palabras clave: alpaca, plasma seminal, ovulación inducida, factor inductor de ovulación, FIO

ABSTRACT

The present study was carried out to evaluate the effect of deposition site of seminal plasma on the ovulation rate and size of corpus luteum in alpacas. Non-lactating females bearing a ≥ 7 mm follicle detected by ultrasound were selected (n = 91). Follicular

¹ Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

² E-mail: whuanca2002@yahoo.com

³ Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIA), Puno

⁴ Departamento de Ciencias Biomédicas Veterinarias, Universidad de Saskatchewan, Saskatoon, Canadá

wave was synchronized by injecting 5 mg of LH and then, the presence of a dominant follicle ≥ 7 mm was determined 12 days later through ultrasound evaluation. Alpacas were assigned to one of six experimental groups: G₁ (n=16) seminal plasma (SP) by intramuscular injection – i.m.; G₂ (n=15) phosphate-buffered saline (PBS) i.m.; G₃ (n=16) SP by intrauterine administration – i.u.; G₄ (n=15) PBS i.u.; G₅ (n=15) SP i.u. with curettage; G₆ (14) PBS by i.u. with curettage. Ovulation rate and corpus luteum were determined by ultrasound evaluation on D₂ and D₈ (D₀ = day of treatment). Serum samples were taken from the jugular vein on D₀, D₃ and D₉ to determine progesterone profiles by radioimmunoassay. Ovulation rate was 93.7, 37.5, and 66.5% for G₁, G₃ and G₅ respectively, while none ovulations were observed in the other three groups. Alpacas in G₁ would produce 25 more ovulations than G₃. Results of the present study suggested that the ovulation-inducing factor (OIF) present in seminal plasma is absorbed systemically and that the mechanical action of curettage would contribute to the absorption of the OIF present in seminal plasma.

Key words: alpaca, seminal plasma, induced ovulation, inducing factor of ovulation, OIF

INTRODUCCIÓN

La alpaca, como los otros miembros de los camélidos, es una especie de ovulación inducida, donde la cópula es el factor principal que desencadena el fenómeno de la ovulación (Fernández Baca *et al.*, 1972), a través de la liberación del pico pre-ovulatorio de la LH (Bravo *et al.*, 1991). La ovulación también puede inducirse con el uso de hormonas como la Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) (San Martín *et al.*, 1968; Fernández Baca *et al.*, 1970a), LH y GnRH (Chen *et al.*, 1985; Sumar, 1991; Aller *et al.*, 1999; Huanca *et al.*, 2001).

Estudios realizados con plasma seminal sugieren que contiene factores que inducen la ovulación (Chen *et al.*, 1985; Ríos, 1985; Ciprián, 2000), lo cual ha sido confirmado recientemente (López, 2004; Adams *et al.*, 2005; Vásquez *et al.*, 2008); sin embargo, aun se requieren estudios que esclarezcan los mecanismos de acción del plasma seminal.

Los estudios acerca de la naturaleza del Factor Inductor de Ovulación (FIO) sugieren que en el plasma seminal existirían algunos factores diferentes a la GnRH (Pan *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001), que contribuyen a la liberación de LH e inducción de

la ovulación (Paolicchi *et al.*, 1999). Recientemente, Vásquez *et al.* (2008) evaluaron cuatro fracciones del plasma seminal en base al peso molecular, determinando que la fracción de plasma seminal ≥ 30 kDa es la responsable de inducir la ovulación.

La respuesta ovulatoria, según la vía de aplicación del plasma seminal, es muy variable. Cuando se aplicó por vía intravaginal, se obtuvo una tasa de ovulación de 7.6% en alpacas (Ríos, 1985) y 87.5% en camellos (Chen *et al.*, 1985); mientras que por la vía intramuscular se llega a inducir la ovulación en el 100% de las alpacas (López, 2004) y llamas (López, 2004; Vásquez *et al.*, 2008). Asimismo, la vía intrauterina induce desde un 0% en llamas (Adams *et al.*, 2005) hasta el 30% en alpacas (Ciprián, 2000). El presente estudio estuvo orientado a determinar el efecto del sitio de deposición del plasma seminal de alpacas sobre la tasa de ovulación y formación del cuerpo lúteo en alpacas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y Material Biológico

El estudio se desarrolló en el Centro de Investigación y Producción – Quimsachata, anexo de la Estación Experimental ILLPA –

Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria, ubicado a 4200 msnm, en el distrito de Santa Lucía, Lampa, Puno, entre los meses de enero y marzo de 2004. Se utilizaron 91 alpacas hembras adultas, no lactantes, ≥ 4 años de edad, sin problemas reproductivos aparentes. La selección de los animales se basó en la presencia de un folículo ≥ 7 mm, detectado mediante ultrasonografía, usando un ecógrafo modelo ALOKA SSD 500 y un transductor lineal Modo B de 7.5 MHz. Todas las hembras fueron alimentadas con pasturas naturales y criadas bajo las mismas condiciones.

Se colectó semen de ocho alpacas con una vagina artificial desarrollada para esta especie y con el apoyo de un maniquí (Sumar y Leyva, 1981, citado por Sumar, 1991). El eyaculado se diluyó 1:1 (v/v) con fosfato salino bufferado (PBS) y se centrifugó a 1000 G (3000 rpm) durante 20 min, para separar la fracción celular del plasma seminal. Se almacenó en tubos Falcon de 20 ml, agregándole 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de kanamicina para evitar la contaminación, y se congeló a -20°C hasta su posterior uso.

Diseño Experimental

Se administró 5 mg de LH (Lutropin-V, Bioniche Animal Health, Canadá), vía intramuscular para inducir la ovulación (Ratto *et al.*, 2003). La ovulación se verificó 2 días después (D_2 ; D_0 = Inicio del tratamiento) por ecografía transrectal en base al criterio de la desaparición del folículo dominante observado y medido al inicio del tratamiento. Se hizo una segunda ecografía en el día 8 (D_8) para detectar y medir el cuerpo lúteo y una tercera ecografía en el día 12 (D_{12}) para determinar la presencia de un nuevo folículo dominante (≥ 7 mm).

Las hembras fueron distribuidas al azar en seis grupos experimentales, donde se les administró 1.5 ml de plasma seminal (PS) o PBS, vía intramuscular (G_1 , $n=16$; G_2 , $n=15$), PS o PBS intrauterinamente (G_3 , $n=16$; G_4 , $n=15$), y PS o PBS intrauterinamente con curetaje¹ (G_5 , $n=15$; G_6 , $n=14$). La deposición intrauterina del PS o PBS se realizó mediante la técnica recto-cervical, utilizando una pipeta que se emplea para tratamientos uterinos en vacas. La pipeta se introdujo hasta uno de los cuernos uterinos donde se depositó la mitad de la dosis de PS o PBS; luego se retrajo la pipeta y sin retirarla totalmente, se reintrodujo en el otro cuerno uterino para depositar la dosis restante.

Se tomaron muestras de sangre al azar a cinco animales de cada uno de los seis tratamientos los días 0 (D_0), 3 (D_3) y 9 (D_9) de la aplicación de LH, y el suero resultante se almacenó en viales de 1.5 ml en congelación para la determinación de niveles de progesterona mediante la técnica del radioinmunoensayo (RIA).

El análisis de los resultados se realizó mediante el Chi Cuadrado y regresión logística con el programa estadístico STATA 8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las alpacas de los tres grupos experimentales llegaron a ovular, aunque en diferentes proporciones, en tanto que las hembras que recibieron PBS no ovularon (Cuadro 1). Se encontró diferencia estadística entre las tasas ovulatorias de los tres grupos ($p < 0.05$). La administración del plasma por vía intramuscular alcanzó una tasa ovulatoria del 93.8% (15/16), similar a otros estudios

¹ Acción mecánica de raspar levemente la mucosa uterina con el extremo de la pipeta en el interior del lumen uterino por 30 segundos a fin de causar una leve lesión inflamatoria similar a la que ocasiona la fricción del pene al momento de la cópula.

Cuadro 1. Respuesta ovulatoria en llamas con folículos ≥ 7 mm en el día 2 de la administración de plasma seminal o PBS por vía intramuscular o intrauterina

Tratamientos	Plasma seminal			PBS		
	Total (n)	Ovulación		Total (n)	Ovulación	
		n	%		n	%
Administración intramuscular	16	15	93.8	15	0	0
Administración intrauterina	16	6	37.5	15	0	0
Administración intrauterina con curetaje	16	10	66.7	14	0	0

Cuadro 2. Diámetro del folículo dominante (mm) al inicio del experimento (D_0) en los grupos de alpacas que se les administró plasma seminal o PBS por vía intramuscular o intrauterina

Tratamiento	Plasma seminal	PBS
Administración intramuscular	8.1 \pm 1.3	8.2 \pm 1.7
Administración intrauterina	7.9 \pm 1.1	7.7 \pm 1.3
Administración intrauterina con curetaje	8.7 \pm 1.0	7.6 \pm 1.1

Cuadro 3. Concentración de progesterona sérica (ng/ml) en alpacas¹ tratadas con plasma seminal por vía intramuscular o intrauterina, y que presentaron ovulación comprobada por ultrasonografía transrectal

Tratamiento (con plasma seminal)	Alpacas con ovulación	Progesterona (ng/ml)
Administración intramuscular	5	8.2 \pm 1.7
Administración intrauterina	2	7.7 \pm 1.3
Administración intrauterina con curetaje	4	7.6 \pm 1.1

¹ Se colectó muestras de sangre a seis alpacas al azar por grupo experimental para la medición de progesterona sérica

en llamas (López, 2004; Adams *et al.*, 2005; Vásquez *et al.*, 2008) y alpacas (Adams *et al.*, 2005).

El análisis de regresión logística indicó que la probabilidad de ovulación del grupo G_1 es de 25 veces más respecto al G_3 ($p < 0.05$).

En un estudio previo se había determinado que, en los camélidos, el lugar de deposición del semen en la monta natural es intracornual y que, durante el proceso, la mucosa uterina sufre una leve irritación por la fricción realizada por el pene (Franco *et al.*, 1981, citado por Novoa, 1991). Además, Bravo (2002) observó hemorragias, edema e inflamación de los cuernos uterinos en alpacas sacrificadas a las 24 horas post cópula. Por tanto, es posible que la irritación endometrial causada por la cópula contribuya a una rápida y mejor absorción del plasma seminal a nivel de la mucosa uterina, acción similar a la realizada por el curetaje sobre la mucosa uterina en el presente estudio. Esta acción podría ser complementada con la ayuda de otros factores aún no determinados.

Ciprián (2000) encontró una tasa de ovulación de 20 a 30% en alpacas y llamas al administrar plasma seminal intrauterinamente, resultado similar al del presente estudio (37.5%, 6/16). Es posible que la baja tasa de ovulación se deba a que, si bien ocurrió una acción mecánica de irritación en el útero con el ingreso de la pipeta en los cuernos uterinos, no fue lo suficiente para facilitar la absorción del factor inductor de ovulación. Una mejor tasa de ovulación ocurrió al emplear el curetaje (66.7%, 10/15). Por otro lado, Adams *et al.* (2005) no obtuvo ovulaciones en alpacas tratadas con plasma seminal vía intrauterina pero la deposición fue realizada a nivel del cuerpo del útero y no intracornual.

La aplicación de LH al inicio del estudio permitió homogenizar los estadios de desarrollo folicular y eliminar posibles factores de variación en los grupos al inicio del experimento. Es así que el promedio del diámetro folicular en el D_0 fue mayor de 7 mm en todos los grupos (entre 7.7 ± 1.3 a 8.7 ± 1.0) (Cuadro 2). Al respecto, Bravo (2002) señala que la ovulación de un folículo pre ovulatorio se produce cuando el folículo adquiere un diámetro mayor o igual a 7 mm, y que el estímulo para inducir la ovulación es mejor cuando el folículo se encuentra en fase de crecimien-

to que en fase de regresión. Las concentraciones elevadas de estrógenos producidas por el folículo dominante activan el centro hipotalámico para la liberación pulsátil de GnRH, que a su vez estimulan los receptores de las células gonadotrofas en la hipófisis anterior para la síntesis y secreción pulsátil de LH (Hafez y Hafez, 2000).

La detección del cuerpo lúteo confirma la ovulación después de la cópula o de la administración de hormonas con actividad LH (Fernández-Baca *et al.*, 1970b; Bravo *et al.*, 1990). El mayor tamaño del cuerpo lúteo, medido con ayuda de la ultrasonografía transrectal, ocurre a los 6 días de la ovulación (Adams *et al.*, 1991), por lo que en este estudio se optó por hacer la verificación de la ovulación y medición del cuerpo lúteo en ese momento (D_8). El tamaño del cuerpo lúteo fue de 9.5 ± 1.1 , 9.8 ± 0.3 y 8.8 ± 1.0 para los grupos G_1 , G_3 y G_5 , respectivamente, sin diferencia significativa entre grupos, y los tamaños coinciden con los reportados en la literatura (Sumar *et al.*, 1988, citado por Bravo, 2002) en el día 7-8 post servicio. Por otro lado, no se observaron ovulaciones en los grupos que recibieron administración de PBS (G_2 , G_4 , G_6), indistintamente de la vía de administración o uso del curetaje, tal y como lo reportan otros autores al inyectar solución salina de PBS (López, 2004; Adams *et al.*, 2005; Vásquez *et al.*, 2008). Estos resultados respaldan los hallazgos del presente estudio y permiten explicar en parte la acción del plasma seminal (FIO) en la inducción de la ovulación.

La concentración de progesterona estuvo en estrecha relación con la ovulación. Las hembras que ovularon con la administración de plasma seminal expresaron el D_9 concentraciones altas de progesterona (Cuadro 3), mientras aquellas que no ovularon presentaron niveles basales. Al respecto, estudios previos señalan una concentración de progesterona ≥ 1 ng/ml a los 7 días del servicio en animales con ovulaciones comprobadas (Sumar, 1988, citado por Bravo, 2002).

La presencia del factor inductor de ovulación (FIO) en el plasma seminal de alpacas se respalda en los resultados de las investigaciones hasta ahora realizadas, incluyendo el presente estudio. El mecanismo de acción aún es desconocido, pero es probable que se ejerza directamente a nivel del ovario o a nivel de las neuronas productoras de GnRH, que en el caso de especies con ovulación inducida, sea probablemente el principal signo neural excitador para inducir la oleada preovulatoria de LH (Bakker y Baum, 2000). Los estudios realizados en los camellos bactrianos han permitido el aislamiento y la purificación de la proteína inductora de ovulación (Pan *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001), lo que aún no sucede en el caso de los camélidos sudamericanos. Se debe continuar con los trabajos de investigación que permitan dilucidar el mecanismo de acción, la composición bioquímica, y sus efectos sobre el sistema endocrino y fisiológico de alpacas y llamas.

Los resultados del presente estudio permiten sugerir que la acción del FIO presente en el plasma seminal de la alpaca es vía sistémica, como lo demuestra la administración intramuscular; además, el sitio probable de absorción del FIO se realiza a nivel de la mucosa uterina, siendo el curetaje una acción mecánica que facilitaría su absorción.

CONCLUSIONES

- Existe una asociación entre la vía de administración de plasma seminal sobre la tasa de ovulación en alpacas.
- El curetaje realizado a nivel endometrial facilitaría la absorción del factor inductor de ovulación incrementando el efecto ovulatorio del plasma seminal.

LITERATURA CITADA

1. **Adams GP, Ratto M, Huanca W, Singh J. 2005.** Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biol Reprod* 73: 452-457.
2. **Adams GP, Sumar J, Ginther OJ. 1991.** Form and function of the corpus luteum in llamas. *Anim Reprod Sci* 24: 127-138.
3. **Aller JF, Canicno AK, Rebuffi G, Alberio RH. 1999.** Inducción de la ovulación en llamas. En: Libro de Resúmenes del II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco, p 91.
4. **Bakker J, Baum M. 2000.** Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Neuroendocrinology* 21: 220-262.
5. **Bravo WP. 2002.** The reproductive process of South American camelids. Salt Lake City, USA: UT. 100 p.
6. **Bravo PW, Stabenfeldt GH, Lasley B, Fowler ME. 1991.** The effect of ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American camelids. *Biol Reprod* 45: 553-559.
7. **Bravo PW, Fowler ME, Stabenfeldt GH. 1990.** Endocrine responses in the llama to copulation. *Theriogenology* 33: 891-899.
8. **Ciprian A. 2000.** Efecto del plasma seminal como factor de ovulación en alpacas y llamas. Puno: Tesis Médico Veterinario y Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Univ. Nacional del Altiplano. 57 p.
9. **Chen BX, Yuen ZX, Pan GW. 1985.** Semen – induced ovulation in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J Reprod Fert* 73: 335-339.
10. **Fernández-Baca S, Sumar J, Novoa C. 1972.** Comportamiento sexual de la alpaca macho frente a la renovación de las hembras. *Rev Inv Pec, Perú* 1(2): 115-228.
11. **Fernández-Baca S, Madden DHL, Novoa C. 1970a.** Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *J Reprod Fert* 22: 261-267.

12. **Fernández-Baca S, Hansel W, Novoa C. 1970b.** Corpus luteum function in the alpaca. *Biol Reprod* 3: 252-261.
13. **Hafez E, Hafez B. 2000.** Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. México: Ed. Interamericana McGraw-Hill. 519 p.
14. **Huanca W, Cárdenas O, Olazábal C, Ratto M, Adams G. 2001.** Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. *Rev Inv Vet, Perú* 12(Supl 1): 462-463.
15. **López A. 2004.** Inducción de la ovulación en llamas mediante la administración intramuscular del plasma seminal proveniente de llama, alpaca y bovino. Lima: Tesis Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 41 p.
16. **Novoa C. 1991.** Fisiología de la reproducción de la hembra. En: Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Cap. III. Fernández-Baca S (ed). Santiago de Chile: FAO. p 91-109.
17. **Pan G, Chen Z, Liu X, Li D, Wie W, Ling F, Fang L. 2001.** Isolation and purification of the ovulation-inducing factor from seminal plasma in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Theriogenology* 55: 1863-1879.
18. **Paolicchi F, Urquieta B, Del Valle L, Bustos-Obregón L. 1999.** Biological activity of the seminal plasma of alpacas: stimulus for the production of LH by pituitary cells. *Anim Reprod Sci* 54: 203-210.
19. **Ratto M, Sing J, Huanta W, Adams G. 2003.** Follicular wave synchronization and pregnancy rater alter fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology* 60: 1645-1656.
20. **Ríos M. 1985.** Presencia de un factor de inducción de la ovulación en el semen de alpaca y toro. Lima: Tesis Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 30 p.
21. **San Martín M, Copaira M, Zúñiga J, Rodríguez R, Bustinza G, Acosta L. 1968.** Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fert* 16: 395-399.
22. **Sumar J. 1991.** Fisiología de la reproducción del macho. En: Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Cap. IV. Fernández-Baca S (ed). Santiago de Chile: FAO. p 111-148.
23. **Vásquez ME, Huanca WL, Huanca TM, Ratto MF, Adams G. 2005.** Efecto de fracciones del plasma seminal, según su peso molecular, sobre la inducción de la ovulación en llamas (*Lama glama*). *Rev Inv Vet, Perú* 19: 20-25.
24. **Zhao XX, Li XL, Chen BX. 2001.** Isolation of ovulation – inducing factors in the seminal plasma of Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) by DEAE – cellulose chromatography. *Reprod Domestic Anim* 36: 177-181.