

## Efecto de la aplicación de plasma seminal, GnRH y ablación folicular sobre la dinámica folicular en llamas (*Lama glama*)

Application effect of seminal plasma, GnRH and follicular ablation on the ovarian dynamic in llamas (*Lama glama*)

Nancy Silva H.<sup>1,3</sup>, Willian F. Huanca M.<sup>1</sup>, Guido Medina S.<sup>2</sup>, Wilfredo Huanca L.<sup>1,4</sup>

### RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de plasma seminal, un análogo de GnRH y la ablación folicular sobre la dinámica folicular en llamas. El estudio se realizó en Puno, Perú, utilizando 24 llamas seleccionadas bajo el criterio de presentar un folículo preovulatorio  $\geq 7$  mm, determinado mediante ecografía transrectal. Las llamas fueron distribuidas aleatoriamente en cuatro grupos: T1, 1 ml PBS IM; T2, 2 ml plasma seminal IM; T3, 1 ml GnRH IM; T4, ablación folicular. Los animales fueron evaluados, mediante ecografía transrectal, cada 2 h entre las 20 hasta las 36 h post-tratamiento para determinar la ovulación; posteriormente en forma diaria hasta el día 9 y luego cada 2 días hasta el día 15 pos-estímulo para determinar el intervalo a la emergencia de una nueva onda folicular, la aparición del nuevo folículo dominante y el diámetro del cuerpo lúteo al día 8 del tratamiento. No se encontró diferencia significativa entre tratamientos en las variables en estudio. Es posible que existan otros factores que podrían afectar el intervalo a la emergencia de una nueva onda folicular.

**Palabras clave:** llama, dinámica folicular, plasma seminal

<sup>1</sup> Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

<sup>2</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

<sup>3</sup> E-mail: nancy.silva@unmsm.edu.pe

<sup>4</sup> E-mail: whuancal@unmsm.edu.pe

Proyecto 149-2017-FONDECYT

El artículo es un trabajo derivado de tesis de la Bachiller Nancy Milagros Silva Huanca intitulado «Efecto de la aplicación de plasma seminal, GnRH y ablación folicular sobre la dinámica folicular en llamas (*Lama glama*)» para obtener el título de Médico Veterinario en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Recibido: 16 de enero de 2020

Aceptado para publicación: 8 de agosto de 2020

Publicado: 25 de noviembre de 2020

## ABSTRACT

The study aimed to evaluate the effect of applying seminal plasma, a GnRH analogue and follicular ablation on the follicular dynamic in llamas. The study was carried out in Puno, Peru, using 24 llamas selected under the criterion of presenting a preovulatory follicle  $\geq 7$  mm, determined by transrectal ultrasound. The animals were randomly distributed into four groups: T1, 1 ml PBS IM; T2, 2 ml seminal plasma IM; T3, 1 ml GnRH IM; T4, follicular ablation. The animals were evaluated, by transrectal ultrasound, every 2 h between 20 and 36 h post-treatment to determine ovulation; subsequently daily until day 9 and then every 2 days until day 15 post-stimulation to determine the interval to the emergence of a new follicular wave, the appearance of the new dominant follicle and the diameter of the corpus luteum on day 8 of treatment. No significant difference was found between treatments in the variables under study. It is possible that there are other factors that could affect the interval to the emergence of a new follicular wave.

**Key words:** llama, follicular dynamic, seminal plasma

## INTRODUCCIÓN

La crianza de camélidos sudamericanos es de importancia económica para los pobladores altoandinos por la producción de fibra y carne y gran adaptabilidad a la altura (Huanca *et al.*, 2007); sin embargo, presenta serias limitaciones en su eficiencia productiva y reproductiva, de allí que se viene investigando diversas alternativas de mejoramiento de la producción, incluyendo biotecnologías reproductivas, entre las cuales destacan los estudios sobre el control del desarrollo folicular (Trasorras *et al.*, 2013).

La fisiología reproductiva de los camélidos sudamericanos tiene la peculiar característica de ser animales de ovulación inducida; es decir, necesitan de un estímulo externo, como la cópula, para que las hembras ovulen (San Martín *et al.*, 1968; England *et al.*, 1969; Fernández Baca *et al.*, 1970). Sin embargo, un 5% de animales llega a ovular espontáneamente con solo estímulos olfatorios, auditivos o visuales (Fernández Baca *et al.*, 1970).

Se ha reportado que en el plasma seminal de los camélidos sudamericanos se encuentra un Factor Inductor de la Ovulación (FIO), que ha sido identificado como el factor de crecimiento neural-B (NGF-B), siendo este el responsable de la ocurrencia de ovulación (Adams *et al.*, 2005; Kershaw-Young *et al.*, 2012; Ratto *et al.*, 2012). Este factor también se encuentra en especies de ovulación espontánea, pero en menor concentración; de allí que al aplicar plasma seminal de toros en hembras camélicas se obtiene una tasa de ovulación de 25% en comparación con tasas de ovulación de 100 cuando se aplica plasma seminal de llama o de alpaca (López *et al.*, 2006).

El mecanismo de acción del FIO/NGF-B no está del todo esclarecido. Se ha reportado que el plasma seminal de la alpaca estimula la secreción de LH a nivel hipofisario, no encontrándose diferencias en los niveles de secreción al adicionar un anticuerpo anti-GnRH (Paolicchi *et al.*, 1999); sin embargo, Silva *et al.* (2012) encontraron una menor secreción de LH en llamas ovariectomizadas, que mejora cuando se les aplica estradiol

exógeno, lo cual estaría indicando que el FIO/NGF necesitaría la acción del estradiol a nivel hipotalámico. Esto ha sido sugerido en un estudio reciente, señalando que la inducción de la ovulación estaría mediada por neuronas Kisspeptin (El-Allali *et al.*, 2017).

El efecto inhibitorio que tiene el folículo dominante sobre los demás folículos subordinados ha sido atribuido a factores intraováricos, tales como la inhibina (Ginther, 2000), por lo que se sugiere eliminar la presencia de folículos  $\geq 7$  mm en camélidos, y trabajar con la onda folicular emergente siguiente (Ratto *et al.*, 2003). Los protocolos hormonales más usados para la sincronización de la onda folicular son en base a GnRH (Andrade, 2007) y LH (Ratto *et al.*, 2003; Andrade, 2007), contando con un intervalo a la emergencia de una nueva onda folicular de 4 y 2-5 días, respectivamente. Asimismo, la ablación folicular se ha aplicado como un tratamiento no-hormonal habiéndose reportado un intervalo a la aparición de folículos  $\geq 3$  mm de 4 días (Ratto *et al.*, 2003) y 2 días (Silva *et al.*, 2018) en promedio. Sin embargo, no hay reportes sobre el efecto del plasma seminal de camélidos sudamericanos sobre la dinámica folicular en los camélidos. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de plasma seminal, un análogo de GnRH y la ablación folicular sobre la dinámica folicular en llamas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de Estudio

El estudio se llevó a cabo durante el mes de enero de 2018 en el Centro de Investigación y Producción La Raya, perteneciente a la Universidad Nacional del Altiplano (UNA). El centro está ubicado entre los 4200 y 5500 msnm, en el distrito de Santa Rosa, provincia de Melgar, Puno, Perú. La zona está considerada como una zona agroecológica de puna húmeda.

### Unidades Experimentales

Se utilizaron 24 llamas, con un rango de edad entre 6 a 8 años, sin cría al pie, sin antecedentes de problemas reproductivos y que habían tenido por lo menos un parto. Se les hizo una ecografía transrectal para determinar la presencia de un folículo preovulatorio  $\geq 7$  mm, con un ecógrafo ALOKA SSD 500 (Tokyo, Japón) equipado con un transductor lineal rectal de 5 MHz. Los animales estuvieron bajo las mismas condiciones y se encontraban al pastoreo sobre praderas de pasto natural.

### Plasma Seminal

El plasma seminal fue obtenido mediante la colección de semen de cuatro alpacas macho de 4-7 años, pertenecientes al Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. Se hicieron colectas de semen, 2-3 veces por semana durante dos meses antes de la fase experimental, con ayuda de una vagina artificial adaptada de ovinos.

El semen colectado fue diluido con fosfato buffer salino (PBS, Gibco, EEUU) en proporción 1:1 y sometido a un procedimiento mecánico de pasaje por una aguja N.º 21 y jeringa de 10 ml, con el propósito de romper la viscosidad seminal. Posteriormente fue centrifugado a 1500 g, durante 20 min, repitiéndose el procedimiento para asegurar el retiro de espermatozoides en el sobrenadante. Las muestras obtenidas se colocaron en tubos falcón de 15 ml, añadiéndole sulfato de gentamicina (10  $\mu\text{g}/10$  ml de solución), formando un pool del plasma de las muestras de todos los machos. El plasma fue congelado a  $-20$  °C hasta su utilización.

### Ablación Folicular

Se realizó anestesia epidural baja, aplicando 2 ml de lidocaína al 2% sin epinefrina, para facilitar el manejo del animal. La aspira-

Cuadro 1. Intervalo en días desde la aplicación de los tratamientos hasta la aparición de folículos  $\geq 3$  mm y folículos  $>7$  mm en llamas (promedio  $\pm$  desviación estándar; n=6 por grupo)

Intervalo a	Control	Plasma seminal	GnRH	Ablación folicular
Folículos $\geq 3$ mm	2.0 $\pm$ 0	2.0 $\pm$ 0	2.0 $\pm$ 0	2.0 $\pm$ 0
Folículo dominante	10.17 $\pm$ 4.12	9.17 $\pm$ 2.93	8.33 $\pm$ 2.66	7.83 $\pm$ 3.25

La diferencia entre grupos no es estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ )

Cuadro 2. Intervalo (horas) desde la aplicación de los tratamientos hasta la ovulación y tamaño del cuerpo lúteo al día 8 pos-aplicación de los tratamientos en llamas (promedio  $\pm$  desviación estándar; n=6)

	Control	Plasma seminal	GnRH	Ablación folicular
Tamaño folicular inicial (mm)	10.0 $\pm$ 2.1	8.2 $\pm$ 1.2	9.7 $\pm$ 3.9	12.2 $\pm$ 6.8
Intervalo a la ovulación (h)	-	30.0 $\pm$ 2.1	29.3 $\pm$ 1.5	-
Tasa de ovulación (%)	0	100	100	0
Tamaño del cuerpo lúteo (mm)	-	8.33 $\pm$ 1.51	8.50 $\pm$ 1.23	-

La diferencia entre grupos no es estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ )

ción transvaginal eco-guiada del folículo dominante fue realizada con un ecógrafo ALOKA SSD 500, equipado con un transductor transvaginal convexo de 5 MHz y con una guía para posicionar la aguja de aspiración a lo largo de la línea de punción. Previamente. Se facilitó el aspirado con una bomba de vacío con una presión de 70 mm Hg.

### Tratamientos

Los 24 animales fueron distribuidos en forma aleatoria en cuatro grupos experimentales de seis animales cada uno: T1: grupo control, 1 ml de PBS, vía IM; T2, 2 ml de plasma seminal, vía IM; T3, 1 ml de análogo de GnRH (0.0084 mg de acetato de buserelina, Conceptase®), vía IM; T4, ablación folicular.

El día 0 (D0) fue el día de aplicación de los tratamientos. Los animales del grupo T2 y T3 fueron evaluados mediante ecografía cada 2 h desde las 20 hasta las 36 horas pos-aplicación del tratamiento, para determinar el intervalo a la ovulación, con base a la ausencia del folículo dominante. Luego, fueron evaluados en forma diaria hasta el día 9 y luego cada dos días hasta el día 15 pos-aplicación del estímulo. Estas evaluaciones se hicieron con un ecógrafo ALOKA SSD 500 y un transductor lineal modo B de 7.5 MHz con el fin de determinar el intervalo a la emergencia de una nueva onda folicular, a partir de la observación de folículos  $\geq 3$  mm, y el intervalo a la presencia de un nuevo folículo  $\geq 7$  mm.

### Análisis Estadístico

Las mediciones del intervalo de tratamiento a la emergencia de folículos  $\geq 3$  mm, intervalo de tratamiento a folículos  $\geq 7$  mm, intervalo de tratamiento a la ocurrencia de ovulación y tamaño del cuerpo lúteo al día 8 pos-tratamiento fueron analizados mediante una prueba de análisis de varianza, utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 25.

## RESULTADOS

El intervalo desde la aplicación de los tratamientos hasta la emergencia de una nueva onda folicular (observación de folículos  $\geq 3$  mm) y al nuevo folículo  $\geq 7$  mm (nuevo folículo dominante) fue similar para los cuatro grupos (Cuadro 1).

No se encontró diferencia significativa para el intervalo a la ovulación entre los grupos T2 y T3. En todas estas ovulaciones, el cuerpo lúteo resultante fue de similar tamaño en el día 8 en ambos grupos (Cuadro 2)

## DISCUSIÓN

Cavilla *et al.* (2013) indican que ocurre un tipo de solapamiento de la emergencia de ondas foliculares sucesivas, que explica que el intervalo desde la aplicación de los tratamientos a la emergencia de una nueva onda folicular se haya presentado el mismo día en todos los grupos, incluyendo el control.

Se dispone de reportes donde el intervalo a la emergencia de una nueva onda folicular como respuesta a la ablación folicular se presentó a los  $3.1 \pm 0.9$  días con base a ecografías diarias (Ratto *et al.*, 2003) y de  $1.8 \pm 0.4$  días con ecografías cada 12 horas (Silva *et al.*, 2018). Asimismo, Andrade (2007), con la aplicación de GnRH reportó el desarrollo de folículos  $\geq 3$  mm a los  $4.6 \pm 1.2$  días. No obstante, las ecografías se realizaron en el presente estudio cada dos horas entre las 20 y las 36 h de la aplicación de los tratamientos para determinar la desaparición del folículo dominante, de allí que esta frecuencia de observaciones haya sido un factor determinante para determinar con mayor precisión el momento de la emergencia de una nueva onda folicular.

El intervalo al nuevo folículo dominante ( $\geq 7$  mm) en el presente estudio fue entre 8 y 10 días, sin diferencias entre grupos, incluyendo el grupo control, posiblemente atribuido al hecho que en todos los grupos se reportó la emergencia de una nueva onda folicular al mismo día, considerándose así como una especie de sincronización. Al respecto, Ratto *et al.* (2003) reportan un intervalo de  $5.8 \pm 1.0$  días luego de la ablación folicular; mientras que Andrade (2007), aplicando GnRH reportó un intervalo de  $7.9 \pm 1.6$  días.

Los resultados muestran que no existen diferencias significativas en el intervalo a la ovulación al aplicar GnRH o plasma seminal, siendo similar a lo reportado por otros auto-

res (Adams *et al.*, 2005; Ratto *et al.*, 2006). Por otra parte, Adams *et al.* (2005) reportan que aplicando plasma seminal se genera un cuerpo lúteo más grande que al usar GnRH, pero partiendo con folículo dominante inicial de 11 mm. Es posible, que, entonces, además de requerirse un diámetro mínimo del folículo dominante  $\geq 7$  mm para inducir la ovulación, se tenga que considerar el rango de tamaño de estos folículos para obtener cuerpos lúteos de mayor tamaño.

## CONCLUSIONES

- Los intervalos a la emergencia de una nueva onda folicular y a la aparición de un nuevo folículo dominante en llamas no difieren entre los tratamientos con plasma seminal, GnRH o ablación folicular.
- El intervalo entre la aplicación del tratamiento a la ovulación y el diámetro del cuerpo lúteo al día 8 de la aplicación de los tratamientos fueron similares al aplicar plasma seminal o GnRH.

## Agradecimientos

Al proyecto «Rol del plasma seminal en la fisiología reproductiva y aplicación de biotecnologías en camélidos», Código 149-2017-FONDECYT/CONCYTEC, por el financiamiento del presente trabajo.

## LITERATURA CITADA

1. Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Singh J. 2005. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biol Reprod* 73: 452-457. doi: 10.1095/biolreprod.105.040097
2. Andrade J. 2007. Métodos de sincronización de la onda folicular en base a GnRH y LH y su efecto en la respuesta ovárica y tasa de preñez en alpacas y llamas. Tesis de Maestría. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 62 p.
3. Cavilla MV, Bianchi CP, Maistruarena C, Aba MA. 2013. Ultrasonographic and endocrine characterization of follicular waves in llamas with a special reference to the overlapping phenomenon during successive waves. *Reprod Domest Anim* 48: 923-930. doi: 10.1111/rda.12187
4. El-Allali K, El Bousmaki N, Ainani H, Simonneaux V. 2017. Effect of the camelid's seminal plasma ovulation-inducing Factor/ $\beta$ -NGF: a kisspeptin target hypothesis. *Front Vet Sci* 4: 99. doi: 10.3389/fvets.2017.00099
5. England BG, Foote WC, Matthews DH, Cardozo AG, Riera S. 1969. Ovulation and corpus luteum function in the llama (*Lama glama*). *J Endocrinol* 45: 505-513. doi: 10.1677/joe.0.0450505
6. Fernández-Baca S, Madden DH, Novoa C. 1970. Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *J Reprod Fertil* 22: 261-267. doi: 10.1530/jrf.0.0220261
7. Ginther OJ. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci* 2: 60-79. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00083-x
8. Huanca W, Cordero A, Huanca T, Adams GP. 2007. Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos: avances y perspectivas. *Arch Latinoam Prod Anim Supl* 15: 195-201.
9. Kershaw-Young CM, Druart X, Vaughan J, Maxwell WM. 2012.  $\beta$ -Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. *Reprod Fert Develop* 24: 1093-1097. doi: 10.1071/RD12039
10. López A, Huanca W, Leyva V. 2006. Inducción de la ovulación en llamas mediante la administración intramuscular del plasma seminal de llama, alpaca y toro. *Rev Inv Vet Perú* 17: 114-118.
11. Paolicchi F, Urquieta B, Del Valle L, Bustos-Obregón E. 1999. Biological activity of the seminal plasma of alpacas: stimulus for the production of LH by pituitary cells. *Anim Reprod Sci* 54: 203-210. doi: 10.1016/s0378-4320(98)00150-x

12. **Ratto MH, Singh J, Huanca W, Adams GP. 2003.** Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology* 60: 1645-1656. doi: 10.1016/S0093-691X(03)00176-6
13. **Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. 2006.** Comparison of the effect of natural mating, LH, and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Anim Reprod Sci* 91: 299-306. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.03.015
14. **Ratto MH, Leduc YA, Valderrama XP, van Straaten KE, Delbaere LT, Pierson RA, Adams GP. 2012.** The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *P Natl Acad Sci USA* 109: 15042-15047. doi: 10.1073/pnas.1206273109
15. **San Martín M, Copaira M, Zúñiga J, Rodríguez R, Bustinza G, Acosta L. 1968.** Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fertil* 16: 395-399. doi: 10.1530/jrf.0.0160395
16. **Silva ME, Recabarren MP, Recabarren SE, Adams GP, Ratto MH. 2012.** Ovarian estradiol modulates the stimulatory effect of ovulation inducing factor (OIF) on pituitary LH secretion in llamas. *Theriogenology* 77: 1873-1882. doi: 10.1016/j.theriogenology.-2012.01.004
17. **Silva ME, Urra F, Ratto MH. 2018.** Uterine endometrial vascularization during ovarian follicular growth in llamas: the effect of estradiol plasma concentration. *Theriogenology* 106: 164-169. doi: 10.1016/j.theriogenology.-2017.10.027
18. **Trasorras VL, Giuliano S, Miragaya MH. 2013.** *In vitro* production of embryos in South American camelids. *Anim Reprod Sci* 136: 187-193. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.10.009