

## Efecto de la Aplicación Intramuscular de Plasma Seminal sobre la Supervivencia Embrionaria en Alpacas Poscópula

### EFFECT OF INTRAMUSCULAR APPLICATION OF SEMINAL PLASMA ON ALPACA'S EMBRYO SURVIVAL AFTER COPULA

Jesús Turín V.<sup>1</sup>, Wilfredo Huanca L.<sup>1,3</sup>, Teodosio Huanca M.<sup>2</sup>, Rómulo Sapaná V.<sup>2</sup>

#### RESUMEN

Se evaluó el efecto de la aplicación por vía intramuscular (IM) de plasma seminal sobre la supervivencia embrionaria en alpacas luego de la monta natural. El estudio se llevó a cabo en Puno, Perú. El plasma seminal se obtuvo de muestras de semen de alpaca. El semen fue colectado y diluido en proporción 1:1 en buffer fosfato salino (PBS), y posteriormente centrifugado y conservado en congelación. Se seleccionaron alpacas hembras vacías (n=117) con presencia de un folículo ovárico dominante ( $\geq 7$  mm) detectado por ecografía transrectal. Los animales fueron servidos por monta natural y distribuidos aleatoriamente en tres grupos: T<sub>1</sub> (n=40), se les administró 1 ml de plasma seminal diluido en PBS, vía IM; T<sub>2</sub> (n=39), se les administró 1 ml de un análogo de GnRH (0.0042 mg de acetato de busarelina), vía IM; T<sub>3</sub> (n=38), sin administración alguna (control). Se hizo una evaluación mediante ecografía transrectal el día 25 de la monta para determinar la gestación y el día 62 para determinar la tasa de supervivencia embrionaria. La tasa de concepción al día 25 de la monta fue de 67.5, 51.3 y 55.3% y la tasa de supervivencia embrionaria al día 62 fue de 92.6, 80.0 y 85.7% para los grupos T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, respectivamente, sin diferencias estadísticas. Los resultados parecieran indicar que la aplicación IM de plasma seminal inmediatamente después de la monta determina una mejora en la supervivencia embrionaria en comparación a la aplicación de GnRH o la monta natural; sin embargo dicha diferencia no es estadísticamente diferente.

**Palabras clave:** alpacas, plasma seminal, FIO, cuerpo lúteo, supervivencia embrionaria

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

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA, Salcedo, Puno, Perú

<sup>3</sup> E-mail: whuanca2002@yahoo.com

Recibido: 5 de febrero de 2015

Aceptado para publicación: 9 de mayo de 2015

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of intramuscular application (IM) of seminal plasma on embryo survival in the alpaca after natural mating. The study was conducted in Puno, Peru. Seminal plasma was obtained from alpaca semen samples, which were collected and diluted 1:1 in phosphate buffered saline (PBS), then centrifuged and kept frozen in storage until use. Non-pregnant alpacas (n=117) were selected according to the presence of a dominant ovarian follicle ( $\geq 7$  mm) detected by transrectal ultrasonography. Females were naturally mated and assigned randomly into one of three groups: T<sub>1</sub> (n=40): 1 ml of seminal plasma diluted in PBS, IM; T<sub>2</sub> (n=39): 1 ml of GnRH analogue (0.0042 mg buserelin), IM; T<sub>3</sub> (n=38) without administration of any product (control). Females were evaluated by transrectal ultrasonography on day 25 after mating to determine pregnancy and on day 62 for determining the embryo's survival rate. The results showed 67.5, 51.3 and 55.3% conception rate on day 25 and 92.6, 80.0 and 85.7% of embryo's survival rate on day 62 for groups T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> respectively and without statistical differences between treatments. The results suggest that IM application of seminal plasma immediately after natural mating may increase embryo survival as compared to the application of GnRH or natural mating, however, this difference was not statistically significant.

**Key words:** alpacas, seminal plasma, OIF, corpus luteum, embryo survival

## INTRODUCCIÓN

La crianza de camélidos sudamericanos constituye la actividad económica más importante para el sostenimiento del poblador alto andino. El hábitat natural de estas especies son los ecosistemas alto andinos ubicados por encima de los 3800 msnm, con pastos de baja calidad y difíciles condiciones medioambientales; sin embargo, estos animales han sido capaces de adaptarse para producir fibra de gran calidad y carne de alto contenido proteico (Fernández Baca, 1991).

Una de las limitantes para mejorar la productividad de las alpacas es su baja eficiencia reproductiva, con una baja tasa de natalidad, explicable tal vez por su alta tasa de mortalidad embrionaria que puede llegar hasta el 50% durante los primeros 35 días de gestación (Fernández Baca *et al.*, 1970). La secreción de progesterona por el cuerpo lúteo es un factor determinante para el mantenimiento de una adecuada gestación (Sumar, 1988), ya que permite el mantenimiento de la

quiescencia uterina y actúa como facilitador del desarrollo de un ambiente uterino óptimo para que se produzca el reconocimiento materno de la preñez.

Los camélidos sudamericanos son especies de ovulación inducida (San Martín *et al.*, 1968); es decir, que necesitan un estímulo durante la cópula para que se produzca la liberación del ovocito. Estudios realizados por Chen *et al.* (1985) en camellos bactrianos y por Ríos (1989), en alpacas, sugirieron la presencia de un componente del plasma seminal del macho, al cual se le denominó Factor Inductor de Ovulación (FIO), debido a su capacidad de inducir a ovulación a las hembras sin ser apareadas y con solo depositar plasma seminal en la vagina. Posteriormente, Adams *et al.* (2005) demostraron el potente efecto luteotrópico del FIO, indicando que la aplicación intramuscular (IM) determina la liberación de LH en concentraciones más elevadas y perdurables en el tiempo, así como la liberación de progesterona en concentraciones que duplican las causadas por la aplicación de GnRH como inductor de ovulación.

Leyva y García (1999) reportaron que la administración de GnRH el día 5 poscópula incrementa la tasa de supervivencia embrionaria. Esto puede explicarse por el efecto que produce en la hipófisis para la liberación de LH, ocasionando un efecto luteotrópico adicional sobre el cuerpo lúteo, determinando una mayor secreción de progesterona, facilitando así la implantación del embrión. Con base a estos antecedentes, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la aplicación IM de plasma seminal luego de la monta sobre la tasa de supervivencia embrionaria a los 62 días poscópula. Estos resultados podrían servir para su aplicación en campo como un protocolo útil para la mejora de los parámetros reproductivos de los camélidos sudamericanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de Estudio

El estudio se llevó a cabo de enero a marzo de 2013, en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata, anexo de la Estación Experimental ILLPA, perteneciente al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). El centro está ubicado a 4200 msnm, 15° 45' Latitud Sur y 70° 34' Longitud Oeste, en el distrito de Cabanillas, provincia de San Román, Puno. Es una región natural del altiplano correspondiente a una zona agroecológica de puna seca.

### Unidades Experimentales

Se utilizaron 117 alpacas adultas hembras de 3 a 7 años de edad, con descendencia conocida y sin cría al pie al momento de la selección. De estas, 100 fueron de la variedad Huacaya y 17 de la variedad Suri. Se constató la presencia de folículo preovulatorio ( $\geq 7$  mm), mediante ecografía, utilizando un ecógrafo portátil (Aquila, Esaote-Pie medical, Maastricht, Holanda) equipado con un transductor lineal de 8 Mhz. Las hembras se mantuvieron separadas del contacto con los

machos hasta el momento del empadre controlado. Los machos empleados pertenecían al plantel de reproductores y tenían descendencia registrada. Todos los animales recibieron las mismas condiciones de manejo y fueron alimentados con pastos naturales.

### Obtención del Plasma Seminal

El plasma seminal fue obtenido a partir del semen colectado de cinco alpacas machos, de 3 a 7 años de edad, en la Unidad de Biotecnología Reproductiva de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. La colección se realizó una o dos veces por semana durante los tres meses previos al inicio del experimento. Se empleó una vagina artificial de ovinos adaptando su uso para alpacas, obteniendo un total de 12 eyaculados por animal aproximadamente.

Las muestras de semen fueron mezcladas y diluidas 1:1 (vol./vol.) con buffer fosfato salino (PBS, Gibco, Grand Island, NY, EEUU). Las muestras fueron centrifugadas luego de la dilución durante 30 min a 1500 g a temperatura ambiente para eliminar la fracción celular del semen. El sobrenadante fue recuperado y una gota del mismo se evaluó por microscopía para confirmar la ausencia de células. Ante la presencia de espermatozoides o resto celular, se repetía nuevamente el procedimiento anterior hasta no observar células. El plasma seminal libre de espermatozoides se almacenó en tubos Falcon de 10 ml, agregándole previamente sulfato de gentamicina (10 mg por cada 10 ml de solución) y guardado en congelación a -20 °C.

### Tratamientos

En el día de inicio del experimento, las hembras fueron servidas por monta natural y distribuidas aleatoriamente en tres grupos: T<sub>1</sub> (n=40): se le administró 1 ml de solución de plasma seminal diluida 1:1 (vol./vol.) en PBS; T<sub>2</sub> (n=39); se le aplicó 1 ml de un análogo de GnRH (0.0042 mg de acetato de buserelina)

(Conceptal, Intervet International GmbH, Alemania), ambos vía IM; y T<sub>3</sub> (n=38): no se le administró producto alguno.

### Diagnóstico Ecográfico

A los 25 días de la cópula (D25) se seleccionaron aquellas hembras que hasta ese día solo habían recibido un servicio (n=105). Los animales fueron evaluados por ecografía para determinar gestación en base a la observación de estructuras uterinas compatibles con la presencia de un embrión. En el día 62 poscópula (D62) se realizó una segunda evaluación ecográfica a las hembras que en D25 estaban preñadas y no repitieron servicio, para determinar el número de animales que mantuvieron la preñez.

### Análisis Estadístico

Las diferencias entre el tamaño del folículo dominante y los tiempos de cópula en los tres grupos al inicio del experimento se analizaron mediante un análisis de varianza. La tasa de concepción al día 25 de la monta y la tasa de supervivencia embrionaria al día 62 de la monta fueron comparadas entre grupos a través de la prueba de Chi cuadrado. Se utilizó el programa SPSS (SPSS Inc. Chicago, EEUU).

## RESULTADOS

El tamaño del folículo dominante en el momento del servicio fue similar en los tres tratamientos (Cuadro 1). Asimismo, los resultados muestran que los tiempos de cópula fueron similares entre los tres grupos de evaluación (Cuadro 2).

El porcentaje de concepción en T<sub>1</sub> fue ligeramente mayor en comparación a T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, pero sin diferencia estadística (Cuadro 3). Asimismo, los animales diagnosticados gestantes a los 25 días de la cópula presentaron una ligera mayor tasa de supervivencia embrionaria al día 62 poscópula en los

animales del grupo T<sub>1</sub> respecto a T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Cuadro 4).

## DISCUSIÓN

En las condiciones de la presente investigación, con una orientación de estudio para aplicaciones de campo, no se determinaron las tasas de ovulación, tamaño de cuerpo lúteo (CL) ni los perfiles séricos de progesterona y LH, como efecto de la aplicación IM de plasma seminal; sin embargo, con base a los estudios de Adams *et al.* (2005), López *et al.* (2006), Palian (2010) y Ulloa-Leal *et al.* (2014), los resultados permiten sugerir que la aplicación IM de plasma seminal o FIO, determinan tasas de ovulación superiores al 90%.

Los resultados obtenidos muestran que el 67.5% de las hembras tratadas con plasma seminal preñaron con un solo servicio en comparación al 51.3% de las que fueron tratadas con el análogo de GnRH, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Estos resultados concuerdan con Palián (2010), quien demostró que alpacas inducidas a ovulación con plasma seminal obtienen un mayor porcentaje de concepción (71%), en comparación con aquellas tratadas con el análogo de GnRH (57%).

Investigaciones realizadas por Adams *et al.* (2005) y Ulloa-Leal *et al.* (2014), evaluaron el efecto luteotrópico del FIO presente en el plasma seminal, demostrando que produce la liberación de LH en concentraciones séricas más altas y persistentes en el tiempo cuando se aplica por vía intramuscular en comparación a la aplicación de GnRH. Asimismo, ambos inductores determinan la formación de cuerpos lúteos de similares dimensiones, pero la liberación de progesterona es casi el doble en el caso de cuerpos lúteos formados como consecuencia de la inducción por plasma seminal, hasta los días 9 y 11 de la ovulación, periodo en el que se asume se

Cuadro 1. Tamaño del folículo dominante en alpacas al inicio de la aplicación de los tratamientos

Tratamiento	Hembras (n)	Media (mm)	Desvío estándar	Mínimo (mm)	Máximo (mm)
Plasma Seminal	40	8.09	1.01	7	11
GnRH	39	8.26	1.07	7	11
Control	38	8.40	1.06	7	12

Las diferencias entre grupos no tienen significancia estadística

Cuadro 2. Tiempos de cópula durante la monta controlada en alpacas al inicio del experimento

Tratamiento	Hembras (n)	Media (mm)	Desvío estándar	Mínimo (mm)	Máximo (mm)
Plasma Seminal	40	18.57	6.37	5	32
GnRH	39	20.71	5.96	6	35
Control	35	19.54	6.34	6	38

Las diferencias entre grupos no tienen significancia estadística

Cuadro 3. Tasa de concepción a los 25 días de la cópula en alpacas

Tratamiento	Hembras		Tasa de concepción (%)
	Servidas (n)	Preñadas en el día 25 (n)	
Plasma Seminal	40	27	67.5
GnRH	39	20	51.3
Control	38	21	55.3

Las diferencias entre grupos no tienen significancia estadística

Cuadro 4. Tasa de supervivencia embrionaria en alpacas a los 62 días de la cópula

Tratamiento	Hembras		Supervivencia embrionaria (%)
	Preñadas en el día 25 (n)	Preñadas en el día 62 (n)	
Plasma Seminal	27	26	92.6
GnRH	20	16	80.0
Control	21	18	85.7

Las diferencias entre grupos no tienen significancia estadística

produce el reconocimiento maternal de la preñez en la alpaca. Dicho incremento en la liberación de progesterona sería determinado por el incremento en la vascularización que produce el FIO en el folículo ovulatorio y en el cuerpo lúteo en desarrollo, al producir el aumento de la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en las células de la granulosa (Ulloa-Leal *et al.*, 2014).

Paolicchi *et al.* (1999) y Bogle *et al.* (2012) sugieren que la aplicación de FIO purificado sobre las células gonadotropas de la hipófisis anterior cultivadas *in vitro*, determina la liberación de mayores volúmenes de LH en comparación con el efecto producido por la aplicación de GnRH, hecho que sugiere que la acción liberadora de estos agentes inductores utiliza mecanismos diferentes; sin embargo, el camino fisiológico a través del cual el FIO determina la liberación de LH en el organismo de las hembras de los camélidos *in vivo*, no ha sido totalmente esclarecido.

## CONCLUSIONES

La aplicación intramuscular de plasma seminal en alpacas hembras inmediatamente después de la cópula pareciera determinar un incremento porcentual de la supervivencia embrionaria en comparación a la aplicación de GnRH o la sola monta natural; sin embargo, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa.

## LITERATURA CITADA

1. **Adams G, Ratto M, 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. **Bogle O, Ratto M, Adams G. 2012.** Ovulation-inducing factor (OIF) induces LH secretion from pituitary cells. *Anim Reprod Sci* 133: 117-122. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.06.006
3. **Chen B, Yuen Z, Pan G. 1985.** Semen-induced ovulation in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J Reprod Fert* 73: 335-338. doi: 10.1530/jrf.0.0740335
4. **Chipayo Y, Leyva V, García W. 2003.** Efecto del estradiol en el periodo de reconocimiento maternal de la preñez sobre la supervivencia embrionaria en alpacas. *Rev Inv Vet Perú* 14: 111-118. doi: 10.15381/rivep.v14i2.1615
5. **Fernández Baca S, Hansel W, Novoa C. 1970.** Embryonic mortality in the alpaca. *Biol Reprod* 3: 243-251.
6. **Fernández-Baca S. 1991.** Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Chile: FAO. 429 p.
7. **Leyva V, García W. 1999.** Efecto de la progesterona exógena y endógena en alpacas en celo sobre la ovulación, fertilización y gestación. En: Res. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco, Perú.
8. **López A, Huanca W, Leyva V, Falcón N, Huanca T, Ratto M. 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. doi: 10.15381/rivep.v17i2.1520
9. **Palián J. 2010.** Inducción de ovulación con plasma seminal o análogo de GnRH (acetato de buserelina) y su efecto sobre la tasa de concepción en alpacas (*Vicugna pacos*), inseminadas con semen fresco. Tesis de Médico Veterinario. Lima. Univ Nacional Mayor de San Marcos. 66 p.
10. **Paolicchi F, Urquieta B, Del Valle L, Bustos O. 1999.** Biological activity of the seminal plasma of alpacas, stimulus for the production of LH by pituitary cells. *Anim Reprod Sci* 54: 203-210.
11. **Ríos M. 1989.** Presencia de un factor de inducción de la ovulación en el semen de alpaca y toro. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 30 p.

- 12. San-Martin M, Copaira M, Zuniga J, Rodríguez R, Bustinza G, Acosta L. 1968.** Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fertil* 16: 395-399.
- 13. Sumar J. 1988.** Removal of the ovaries or ablation of the corpus luteum and its effect on the maintenance of gestation in the alpaca and llama. *Acta Vet Scand* 83(Suppl): 133-141.
- 14. Ulloa-Leal C, Bogle O, Adams G, Ratto M, 2014.** Luteotrophic effect of ovulation-inducing factor/nerve growth factor present in the seminal plasma of llamas. *Theriogenology*. 81: 1101-1107. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.01.-038