

Susceptibilidad del Cuerpo Lúteo a la Prostaglandina $F_{2\alpha}$ en Alpacas Inducidas a Ovulación con Plasma Seminal y GnRH

SUSCEPTIBILITY OF THE CORPUS LUTEUM TO PROSTAGLANDIN $F_{2\alpha}$ IN ALPACAS AFTER INDUCED OVULATION WITH SEMINAL PLASMA AND GnRH

Camilo Mamani M.¹, Wilfredo Huanca L.^{1,5}, Luisa Echevarría C.², Aída Cordero R.³, Willian Fahrud Huanca M.¹, Tito Limache C.⁴

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la susceptibilidad del cuerpo lúteo al cloprostenol sódico (análogo sintético de la $PGF_{2\alpha}$) durante el desarrollo de la fase luteal en alpacas inducidas a ovulación con plasma seminal o con GnRH. El plasma seminal se obtuvo de muestras de semen de alpaca colectadas mediante vagina artificial, diluidas en proporción 1:1 en buffer fosfato salino (PBS), centrifugadas y conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utilizaron 96 alpacas hembras con folículo ≥ 7 mm, que fueron inducidas a ovulación mediante la inyección de plasma seminal ($n=48$) y GnRH ($n=48$). Las alpacas que ovularon fueron distribuidas en forma aleatoria en 6 grupos: un grupo control y 5 grupos tratados con $PGF_{2\alpha}$ los días 4, 5, 6, 7 y 8 posinducción de ovulación. Se colectaron muestras de sangre para determinar los perfiles de progesterona sérica al inicio y 24 horas del tratamiento. No hubo efecto luteolítico en animales tratados el día 4 o 5, mientras que en los animales tratados al día 6, 7 u 8 respondieron con una luteólisis efectiva a las 24 horas de la aplicación de $PGF_{2\alpha}$, mostrando disminución del diámetro del cuerpo lúteo y niveles de progesterona cercanos o inferiores a 1 ng/ml. Se concluye que el cuerpo lúteo en alpacas inducidas a ovulación con plasma seminal o GnRH es susceptible a la luteólisis a partir del día 6 posestimulo de ovulación.

Palabras clave: alpacas, cuerpo lúteo, FIO, plasma seminal, prostaglandina $F_{2\alpha}$

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

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

³ Facultad de Zootecnia, Departamento de Nutrición, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú

⁴ Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú

⁵ E-mail: whuanca2002@yahoo.com

Recibido: 8 de marzo de 2015

Aceptado para publicación: 15 de junio de 2016

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the susceptibility of the corpus luteum to cloprostenol sodium (synthetic analog of $\text{PGF}_{2\alpha}$) during development of the luteal phase in alpacas after induced ovulation with seminal plasma or GnRH. Semen was collected from male alpacas using an artificial vagina and then diluted 1/1 with phosphate buffered saline (PBS), centrifuged and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Females alpacas ($n=96$) bearing ≥ 7 mm follicles in their ovaries were induced to ovulate by injecting seminal plasma ($n=48$) and GnRH ($n=48$). Animal that ovulate were randomly assigned into one of six groups: control and treated with an injection of cloprostenol sodium on days 4, 5, 6, 7 and 8 post-ovulation. Blood samples were collected to determine serum progesterone concentrations at baseline and 24 hours post-injection of cloprostenol sodium. There was no luteolytic effect of $\text{PGF}_{2\alpha}$ in animals treated on day 4 or 5, whereas animals treated on day 6, 7 or 8 were responding with effective luteolysis at 24 hours post- $\text{PGF}_{2\alpha}$ showing a reduction in size of the corpus luteum and progesterone levels close or lower than <1 ng/ml. In conclusion, corpora lutea obtained by induced ovulation using seminal plasma or GnRH are susceptible to luteolysis from day 6 onwards after stimulation of ovulation.

Key words: alpacas, corpus luteum, OIF, seminal plasma, prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$

INTRODUCCIÓN

La baja eficiencia reproductiva de los camélidos sudamericanos es una de las principales limitantes que dificulta el desarrollo sostenido de la producción de estas especies, especialmente la alta mortalidad embrionaria en los primeros 30 días del servicio (Fernández Baca *et al.*, 1970; Novoa, 1991).

La alpaca se encuentra dentro del grupo de animales de ovulación inducida; es decir, que necesitan un estímulo exógeno para que ocurra la ovulación y la posterior posible fecundación. El intervalo de tiempo entre la monta y la ovulación es en promedio de 30 horas (Vaughan y Tibary, 2006). Luego de la ovulación se forma el cuerpo lúteo, órgano secretor de progesterona, hormona encargada del mantenimiento de la preñez en los animales domésticos. La concentración plasmática de progesterona se incrementa a partir del día 4 de la inducción de la ovulación, alcanzando un pico en el día 8; y en caso de no ocurrir la preñez, las concentraciones plasmáticas disminuyen a partir del día

10, alcanzando niveles basales el día 12 de la monta, según ha sido reportado en llamas (Aba *et al.*, 1997) y alpacas (Vaughan y Tibary, 2006; Reyna *et al.*, 2015).

El uso de plasma seminal de los camélidos como inductor de ovulación viene siendo una práctica utilizada para mejorar la tasa de natalidad en alpacas y llamas. Esto es con base al hallazgo del factor inductor de ovulación (FIO) presente en el plasma seminal de animales de ovulación inducida (Adams *et al.*, 2005) y el mayor efecto luteotrópico que ejerce en la formación del cuerpo lúteo, resultando en mayores niveles de progesterona plasmática, por la mayor vascularización que ocurre en la fase luteal (Ulloa-Leal *et al.*, 2014). Esto permitió obtener mejores tasas de concepción en animales que fueron inducidos a ovulación con plasma seminal en relación con aquellos que recibieron GnRh como inductor de ovulación (Palián, 2010).

La prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ es la luteolisina más importante en la mayoría de los animales domésticos y se encarga de la luteólisis.

Sin embargo, el momento en que el cuerpo lúteo es sensible a su efecto varía entre las diferentes especies; de allí que se habla de un periodo refractario en el cual la aplicación de un análogo de prostaglandina no induce luteólisis. En llamas se observó que el cuerpo lúteo es sensible a la acción de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ a partir del día 6 posinducción de ovulación con GnRH (Bianchi *et al.*, 2012). Por estas razones, el objetivo del presente estudio fue investigar la susceptibilidad del cuerpo lúteo a la acción de un análogo de prostaglandina $F_{2\alpha}$ durante la fase luteal.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Producción (CIP) Quimsachata, anexo de la Estación Experimental ILLPA del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), en Puno, Perú, entre enero y marzo de 2013. Los animales experimentales fueron alpacas Huacaya, sin cría al pie, sin problemas reproductivos aparentes y con alimentación bajo pastoreo extensivo. Se les mantuvo separadas de los machos durante el estudio.

El semen (y plasma seminal) fue colectado de ocho machos entrenados para el uso de la vagina artificial adaptada a un maniquí de alpaca. El semen colectado era diluido con PBS para disminuir su viscosidad y, luego, centrifugado a 1500 g por 30 min. El sobrenadante fue evaluado para confirmar la ausencia de espermatozoides. El plasma seminal fue almacenado en tubos falcón de 10 ml, donde se adicionó sulfato de gentamicina, a razón de 10 mg por cada 10 ml de solución. La solución fue conservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Noventa y seis alpacas fueron evaluadas mediante ultrasonografía transrectal (Aloka SSD 500, transductor 5 MHz) para la detección de un folículo dominante ≥ 7 mm de diámetro, considerado de tamaño

preovulatorio en alpacas (Bravo *et al.*, 1991). La ovulación fue inducida con 1 ml de plasma seminal a la mitad de las hembras y a la otra mitad con 1 ml (0.0042 mg) del análogo de GnRH (Conceptal, Intervet International GmbH, Alemania), ambos por vía intramuscular. La tasa de ovulación fue detectada 48 horas después con base al criterio de desaparición de folículo dominante. Los animales que ovularon fueron distribuidos al azar en seis grupos, a cinco de los cuales se les administró 1 ml (0.262 mg) de un análogo de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ (cloprostenol sódico, Lutaprost, Agrovvetmarket, Perú) en los días 4, 5, 6, 7 y 8 posinducción de ovulación. El sexto grupo quedó como control sin tratamiento.

Se hicieron ecografías adicionales para medir el diámetro del cuerpo lúteo antes de la aplicación de prostaglandina, así como a las 24 y 48 h para observar la ocurrencia de luteólisis.

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular para la determinación de la concentración sérica de progesterona antes de la aplicación de la prostaglandina y 24 h después. Las muestras fueron centrifugadas a 1700 g por 25 min. El suero fue separado en viales de 2 ml y almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El análisis de progesterona se hizo con un kit comercial de radioinmunoensayo (PROGRIA-CT, KIP1458, Bélgica).

Los valores de distribución del diámetro de los folículos iniciales en cada tratamiento, así como la distribución del diámetro de los cuerpos lúteos por tratamiento y tiempo de evaluación se analizaron mediante la prueba de Shapiro Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó el análisis de varianza para detectar diferencias en el diámetro de los folículos iniciales antes de la inducción de ovulación y para determinar la susceptibilidad del cuerpo lúteo al tratamiento con base a su diámetro, y en caso de diferencias significativas se hizo la prueba de diferencias múltiples de Bonferroni. La relación entre la tasa de ovulación entre tratamientos se evaluó con la

Cuadro 1. Susceptibilidad del cuerpo lúteo (promedio \pm desviación estándar; mm), formado por acción del plasma seminal, a la PGF_{2 α} en función al tiempo de evaluación

Aplicación de PGF _{2α}	0 h	24 h	48 h
4	8.63 \pm 1.51	10.87 \pm 1.26 ^a	11.13 \pm 1.55 ^a
5	9.38 \pm 1.85	10.13 \pm 1.36 ^a	11.63 \pm 1.69 ^a
6	11.25 \pm 0.89	9.50 \pm 1.20 ^a	7.88 \pm 1.25 ^b
7	12.50 \pm 1.31	9.50 \pm 1.31 ^a	8.00 \pm 0.76 ^b
8	12.00 \pm 0.93	9.75 \pm 0.71 ^a	7.50 \pm 0.76 ^b

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Cuadro 2. Susceptibilidad del cuerpo lúteo (promedio \pm desviación estándar; mm), formado por acción de acetato de buserelina, a la PGF_{2 α} en función al tiempo de evaluación

Aplicación de PGF _{2α}	0 h	24 h	48 h
4	9.13 \pm 1.26	10.00 \pm 0.76 ^a	11.50 \pm 1.60 ^a
5	9.14 \pm 2.04	11.00 \pm 0.58 ^a	11.14 \pm 2.04 ^a
6	11.38 \pm 0.74	9.50 \pm 0.93 ^a	7.88 \pm 0.64 ^b
7	11.88 \pm 1.81	9.75 \pm 1.04 ^a	8.00 \pm 0.93 ^b
8	11.14 \pm 0.90	9.57 \pm 1.13 ^a	7.71 \pm 0.76 ^b

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

prueba de Chi cuadrado. Todos los análisis fueron realizados con un nivel de confianza de 95%, empleando el programa estadístico STATA 12.0 (Stata Corp).

RESULTADOS

El diámetro de los folículos iniciales que fueron inducidos con plasma seminal fue de 9.42 ± 1.33 y aquellos con GnRH fue de 9.23 ± 1.29 ($p=0.49$). La tasa de ovulación fue de 97.9% (47/48) y 93.8% (45/48) para plasma seminal y GnRH, respectivamente, y sin diferencia estadística.

En los cuadros 1 y 2 se muestra el tamaño promedio de los cuerpos lúteos en diferentes momentos posinducción de la ovulación con plasma seminal y GnRH, respectivamente. Se puede observar que a las 48 h, el tratamiento con PGF_{2 α} causó una reducción del tamaño del cuerpo lúteo en los animales que se les aplicó la prostaglandina en los días 6, 7 y 8 de la inducción de ovulación en comparación con los animales tratados los días 4 y 5, donde el cuerpo lúteo no fue afectado.

En el Cuadro 3 se observan los diámetros promedio de los cuerpos lúteos formados luego de la inducción de ovulación en el

Cuadro 3. Diámetro del cuerpo lúteo (promedio \pm desviación estándar; mm) en el grupo control (sin aplicación de $PGF_{2\alpha}$) posinducción de ovulación con plasma seminal o con acetato de buserelina (GnRH)

	Días post $PGF_{2\alpha}$						
	4	7	8	10	11	12	14
Plasma seminal	7.0 \pm 0.6	11.4 \pm 1.9	12.1 \pm 1.2	10.0 \pm 1.0	9.0 \pm 1.7	8.3 \pm 1.8	6.9 \pm 2.3
GnRH	7.1 \pm 1.5	9.7 \pm 1.5	11.4 \pm 1.0	9.9 \pm 0.9	8.6 \pm 1.1	8.0 \pm 1.2	6.3 \pm 1.0

Cuadro 4. Perfiles de progesterona sérica (ng/ml) por efecto de la aplicación de prostaglandina $F_{2\alpha}$ en alpacas cuyos cuerpos lúteos fueron formados por acción del plasma seminal de alpaca o por acetato de buserelina (GnRH)

Días post $PGF_{2\alpha}$	Plasma seminal		GnRH	
	0 h	24 h	0 h	24 h
4	0.5 \pm 0.3	1.3 \pm 0.5	0.5 \pm 0.2	2.3 \pm 0.9
5	1.9 \pm 0.5	6.5 \pm 3.8	3.0 \pm 2.0	4.2 \pm 2.4
6	7.6 \pm 3.6	1.8 \pm 0.7	9.2 \pm 2.7	1.6 \pm 0.4
7	10.9 \pm 4.4	0.7 \pm 0.3	10.1 \pm 3.8	0.8 \pm 0.7
8	9.4 \pm 4.8	0.3 \pm 0.2	6.3 \pm 1.6	0.3 \pm 0.2

grupo no tratado con prostaglandina (grupo control), donde los niveles se incrementan hasta el día 8-10 y decaen en el día 14.

El Cuadro 4 muestra los perfiles de progesterona y su evaluación a las 24 horas de la aplicación de la $PGF_{2\alpha}$. Las concentraciones séricas fueron menores de 1 ng/ml en el día 4 y se incrementaron a partir del día 5. Los animales tratados en el día 7 y 8 con el análogo de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ disminuyeron sus concentraciones séricas por debajo de 1 ng/ml a las 24 h, mientras que en los animales tratados los días 4 y 5 se observaron incrementos en los niveles de progesterona a las 24 horas de la aplicación de $PGF_{2\alpha}$.

DISCUSIÓN

El hallazgo del factor inductor de ovulación (FIO) como potente agente luteotrópico en los camélidos sudamericanos sigue investigándose con el fin de determinar los mecanismos involucrados causantes de ovulación, formación de cuerpo lúteo y luteólisis (Adams *et al.*, 2005). A la fecha, se ha reportado que el FIO es una proteína perteneciente a la familia de la neurotrofina llamada factor de crecimiento neural β encontrado en alpacas (Kershaw-Young *et al.*, 2012) y llamas (Ratto *et al.*, 2012), que actúa vía sistémica hasta llegar al hipotálamo o hipófisis, desencadenando el pico preovulatorio de LH

para la liberación del ovocito (Panez *et al.*, 2009; Bogle *et al.*, 2012).

Las tasas de ovulación en el presente trabajo para plasma seminal y GnRH fueron estadísticamente similares, coincidentes con reportes previos con tasas ovulatorias superiores al 90% (Palián, 2010) en alpacas. Los resultados reafirman la posibilidad de utilizar el plasma seminal como tratamiento alternativo para la inducción de ovulación en los camélidos sudamericanos y, de esa forma, evitar el uso de hormonas sintéticas, en programas de inseminación artificial.

La aplicación de PGF_{2α} en los días 6, 7 y 8 de la inducción de la ovulación fue efectiva en la reducción del tamaño del cuerpo lúteo resultante, pero no en los días 4 y 5. Esta reducción del tamaño del cuerpo lúteo coincide con un descenso de los niveles de progesterona a valores inferiores a 1 ng/ml en los días 7 y 8 y a niveles de 1.6 a 1.8 ng/ml en el día 6, lo que concuerda con lo reportado por Bianchi *et al.* (2012), quienes señalan que la inyección de cloprostenol sódico en los días 6 y 8 induce una luteolisis efectiva a las 24 h del tratamiento. El efecto de la acción de la PGF_{2α} en estos días puede explicarse por la sensibilidad del cuerpo lúteo y la adquisición de los receptores, lo que no ocurre en los días previos.

El mayor diámetro del cuerpo lúteo fue alcanzado en el día 8 posinducción de ovulación en el grupo control (Cuadro 3). Este resultado concuerda con los hallazgos de Adams *et al.* (2005) y Ulloa-Leal *et al.* (2014), días en donde, además, encuentran la mayor concentración plasmática de progesterona.

La falta de sensibilidad del cuerpo lúteo en respuesta a la aplicación del análogo de PGF_{2α} en los días 4 y 5 puede deberse a una deficiente activación enzimática. Los receptores para PGF_{2α} a nivel de las células luteales grandes en vacas (Tsai y Wiltbank, 1998) y ovejas (Juengel *et al.*, 1996) están presentes a los 2 días posteriores a la ovulación. Arosh *et al.* (2004) indicaron que en los primeros

días de formación del cuerpo lúteo hay una disponibilidad limitada de transportadores para PG y aumento en la expresión de la PGE₂, lo cual corresponde a un efecto luteotrópico. Otro mecanismo propuesto para el periodo refractario del cuerpo lúteo es la falta de producción de endotelina-1, que es un péptido vasoconstrictor mediador de la regresión luteal (Levy *et al.*, 2000).

Por consiguiente, se puede afirmar según los resultados obtenidos en el presente estudio, que la susceptibilidad del cuerpo lúteo a la acción de la prostaglandina F_{2α} en la alpaca ocurre a partir del día 6 de la inducción de la ovulación.

LITERATURA CITADA

1. **Aba MA, Bravo PW, Forsberg M, Kindahl H. 1997.** Endocrine changes during early pregnancy in the alpaca. *Anim Reprod Sci* 47: 273-279. doi: 10.1016/S0378-4320(97)00028-6
2. **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
3. **Arosh JA, Banu SK, Chapdalaine P, Madore E, Sirois J, Fortier MA. 2004.** Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology* 145: 2551-2560. doi: 10.1210/en.2003-1607
4. **Bianchi CP, Cavilla MV, Jorgensen E, Benavente MA, Aba MA. 2012.** Development of corpus luteum susceptibility to an analog of prostaglandin F_{2α}, throughout the luteal phase in llamas (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci* 131: 199-203. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.03.007
5. **Bogle OA, Ratto MH, Adams GP. 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

6. **Bravo PW, Stabenfeldt GH, Lasley BL, 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. doi: 10.1095/biolreprod45.4.553
7. **Fernández Baca S, Hansel W, Novoa C. 1970.** Corpus luteum function in the alpaca. *Biol Reprod* 3: 252-261.
8. **Juengel JL, Wiltbank MC, Meberg BM, Niswender GD. 1996.** Regulation of steady-state concentrations of messenger ribonucleic acid encoding prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptor in ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 54: 1096-1102. doi: 10.1095/biolreprod54.5.1096
9. **Levy N, Kobayashi S, Roth Z, Wolfenson D, Miyamoto A, Meidan R. 2000.** Administration of prostaglandin $F_{2\alpha}$ during early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and of its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. *Biol Reprod* 63: 377-382. doi: 10.1095/biolreprod63.2.377
10. **Kershaw-Young C, Druart X, Vaughan J, Maxwell W. 2012.** β -nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. *Reprod Fert Dev* 24: 1093-1097. doi: 10.1071/RD12039
11. **Novoa C. 1991.** Fisiología de la reproducción de la hembra. En: Fernández Baca S. (ed). *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. Santiago de Chile: FAO. p 93-103.
12. **Palián JW. 2010.** Inducción de ovulación con plasma seminal o análogo de GnRH (acetato de buselerina) 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.
13. **Panez S, Huanca W, Huanca T, Ratto M, Adams G. 2009.** Efecto del sitio de deposición del plasma seminal sobre la tasa de ovulación y formación del cuerpo lúteo en alpacas. *Rev Inv Vet Perú* 20: 21-27. doi: 10.15381/rivep.v20i1.526
14. **Ratto MH, Leduc YA, Valderrama XP, van Straaten KE, Delbaere LT, Pierson RA, et al. 2012.** The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proc Natl Acad Sci* 109: 15042-15047. doi: 10.1073/pnas.1206273109 / - / DCSupplemental
15. **Reyna I, Huanca W, Ampuero A, Huanca T. 2015.** Efecto de cuatro diluciones de plasma seminal sobre la tasa de ovulación, tamaño de cuerpo lúteo y perfil de progesterona en alpacas. *Rev Inv Vet Peru* 26: 614-620. doi: 10.15381/rivep.v26i4.11218
16. **Tsai SJ, Wiltbank MC. 1998.** Prostaglandin $F_{2\alpha}$ regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biol Reprod* 58: 346-352. doi: 10.1095/biolreprod-58.2.346
17. **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
18. **Vaughan JL, Tibary A. 2006.** Reproduction in female South American camelids: a review and clinical observations. *Small Rumin Res* 61: 259-281. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.07.015