

Composición bioquímica del fluido folicular en los tres estadios de crecimiento folicular en alpacas

Biochemical composition of follicular fluid in the three stages of follicular growth in alpacas

Gabriel Tapia M.¹, Wilfredo Huanca L.^{1,4}, Alfredo Pozo C.^{1,3}, Alvaro Vásquez Y.¹,
Melissa Ticona A.¹, Juan Zevallos A.²

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo determinar la concentración de glucosa, proteínas totales, albúmina, colesterol y triglicéridos en el fluido folicular durante los tres estadios del desarrollo folicular en alpacas. Se utilizaron 27 animales del CIP Chuquibambilla, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú. Los ovarios de las alpacas fueron revisados mediante un ecógrafo Aloka SSD 500 y un transductor lineal de 7.5 MHz. Los animales fueron sometidos a un procedimiento de sincronización de la onda folicular a la presencia de un folículo ≥ 7 mm. En el día 9 de la sincronización fueron distribuidos según el estadio de la onda folicular en tres grupos: G1, folículo ≥ 7 mm en estadio de crecimiento; G2, folículo ≥ 7 mm en estadio de estática; G3, folículo ≥ 7 mm en estadio de regresión. Seguidamente, se procedió a la aspiración del fluido folicular del folículo dominante con el ecógrafo indicado y un transductor transvaginal de 5.0 MHz. El fluido fue centrifugado y el sobrenadante colocado en viales y almacenado en nitrógeno líquido. Las determinaciones bioquímicas se hicieron con kits comerciales específicos en un analizador bioquímico semiautomático. Los resultados fueron: glucosa 37.04, 41.19 y 30.07 mg/dl; proteínas totales 1.65, 1.93 y 1.79 g/dl; albúmina 1.14, 1.42 y 1.31 g/dl; colesterol 15.82, 18.3 y 11.08 mg/dl; triglicéridos 11.3, 12.35 y 10.78 mg/dl para los estadios de crecimiento, estático y regresión, respectivamente, sin diferencias significativas entre estadios, con excepción de la glucosa. La concentración de glucosa fue menor en el estadio de regresión en comparación con el estadio de estática ($p < 0.05$).

Palabras clave: alpaca, estadios foliculares, fluido folicular, ecografía, glucosa, regresión

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

² Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

³ Dirección actual: Escuela Profesional de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú

⁴ E-mail: whuancal@unmsm.edu.pe

Recibido: 25 de abril de 2019

Aceptado para publicación: 15 de julio de 2020

Publicado: 29 de septiembre de 2020

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the concentration of glucose, total proteins, albumin, cholesterol and triglycerides in the follicular fluid during the three stages of follicular development in alpacas. Twenty-seven animals from CIP Chuquibambilla, National University of the Altiplano, Puno, Peru were used. The alpaca ovaries were checked by an Aloka SSD 500 ultrasound and a 7.5 MHz linear transducer. The animals were subjected to a follicular wave synchronization procedure in the presence of a follicle ≥ 7 mm. On day 9 of the synchronization the animals were distributed according to the stage of the follicular wave in three groups: G1, follicle ≥ 7 mm in the growing stage; G2, follicle ≥ 7 mm in the static stage; G3, follicle ≥ 7 mm in the regression stage. The follicular fluid was aspirated from the dominant follicle with the indicated ultrasound and a 5.0 MHz transvaginal transducer. The fluid was centrifuged, and the supernatant placed in vials and stored in liquid nitrogen. Biochemical determinations were made with specific commercial kits in a semi-automatic biochemical analyser. The results were: glucose 37.04, 41.19 and 30.07 mg/dl; total proteins 1.65, 1.93 and 1.79 g/dl; albumin 1.14, 1.42 and 1.31 g/dl; cholesterol 15.82, 18.3 and 11.08 mg/dl; triglycerides 11.3, 12.35 and 10.78 mg/dl for the stages of growth, static and regression, respectively, without significant differences between stages, with the exception of glucose. The glucose concentration was lower in the regression stage compared to the static stage ($p < 0.05$).

Key words: alpaca, follicular stages, follicular fluid, ultrasound, glucose, regression

INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos (CSA) representan un recurso pecuario y genético de gran importancia social, económica, cultural y científica para los países de la Región Andina (Fernández-Baca, 1991; FAO, 2005). Los CSA han ido adquiriendo una capacidad notoria de adaptación a las condiciones adversas medioambientales del altiplano andino. Su hábitat está ubicado entre los 3800 y 5000 msnm, alimentándose de pasturas de baja calidad nutricional existentes en la zona; no obstante, estos animales son capaces de convertir la vegetación nativa en fibra de alta calidad y carne con alto contenido proteico (Fernández-Baca, 1991; Aba, 2014).

Pese a la resistencia y rusticidad, su productividad se ha visto disminuida por la baja eficiencia reproductiva, especialmente

por la elevada mortalidad embrionaria, que puede alcanzar hasta el 50% en los primeros 30 días de gestación (Fernández-Baca *et al.*, 1970, Ratto *et al.*, 2011). Para revertir esta situación, se ha ampliado el conocimiento sobre su fisiología reproductiva y el desarrollo de nuevas tecnologías (Aba, 2014). La actividad ovárica en los CSA se presenta en ciclos de desarrollo folicular semejante a lo evidenciado en otros mamíferos, pero sin la presencia de un cuerpo lúteo. El desarrollo folicular ha sido clasificado en tres estadios: crecimiento, estática y regresión (Vaughan *et al.*, 2004).

El estudio del fluido folicular es fundamental, puesto que proporciona el microentorno para el desarrollo de los ovocitos, pudiendo tener un rol importante en la determinación de la calidad de los ovocitos y el potencial para lograr el desarrollo embrionario (Albohomsen *et al.*, 2011, Wallace

et al., 2012). En alpacas existe limitada información sobre la composición del fluido folicular, por ello el estudio de los componentes bioquímicos del fluido folicular durante el desarrollo folicular permitirá conocer los cambios que ocurren en el entorno del ovocito durante el desarrollo del folículo. Esta información podría utilizarse como un parámetro de evaluación de la calidad de los ovocitos, que estaría a su vez, directamente relacionado con la fertilidad (Matoba *et al.*, 2014). Es así que el objetivo del presente estudio fue determinar la concentración de glucosa, proteínas totales, colesterol y triglicéridos en los estadios de crecimiento, estática y regresión del folículo ovárico de la alpaca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio

Las muestras del fluido folicular se obtuvieron durante los meses de febrero y abril de 2016 en el CIP-Chuquibambilla de la Universidad Nacional del Altiplano, localizado en la provincia de Melgar, región de Puno, Perú. El análisis bioquímico se realizó en el Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

Animales

Se utilizaron 27 alpacas hembra adultas Suri, de 4-7 años, vacías. Estos animales fueron mantenidos fuera del contacto con los machos, pero recibieron las mismas condiciones de manejo y alimentación a base de pasturas naturales que el resto del rebaño. Las hembras fueron seleccionadas con base a la presencia de un folículo ≥ 7 mm de tamaño, determinado a través de un ecógrafo ALOKA SSD 500 equipado con un transductor lineal de 7.5 MHz.

Sincronización de la Onda Folicular

Con el propósito de obtener un crecimiento folicular uniforme y disponer de los folículos dominantes en los diferentes estadios de desarrollo folicular en estudio, se procedió a la sincronización de la onda folicular mediante la administración de 1 ml de un análogo de GnRH (0.0042 mg de acetato de buserelina – Conceptase® – Agrovot Market). La ovulación se verifica por ecografía a las 48 horas de la aplicación hormonal mediante la desaparición del folículo dominante. Este procedimiento permitió la emergencia de una nueva onda folicular y la posterior formación del folículo dominante en los estadios en estudio.

Identificación Ecográfica

Se realizaron evaluaciones ecográficas cada dos días para identificar el estadio de desarrollo del folículo dominante. A partir del día 9 de la sincronización se distribuyeron los animales en tres grupos: G1 (n=9): animales con folículos ≥ 7 mm en estadio de crecimiento (con incremento de tamaño en dos observaciones); G2 (n=9): animales con folículos ≥ 7 mm en estadio estático (sin variación en el tamaño en al menos dos observaciones); G3 (n=9): animales con folículos ≥ 7 mm en estadio de regresión (con disminución de tamaño en dos observaciones).

Obtención del Fluido Folicular

La aspiración del fluido folicular se hizo con una aguja N.º 19 acoplada en un transductor transvaginal de 5.0 MHz y con un ecógrafo ALOKA SSD500. El procedimiento consiste en ubicar el transductor en el fondo de la vagina, y una mano en el recto. Se fija el ovario contra la punta del transductor permitiendo visualizar tanto el ovario como el folículo dominante en la pantalla del equipo de ultrasonografía, se impulsa la agu-

ja suavemente para que penetre la pared vaginal y el folículo. El contenido folicular aspirado es recolectado en un tubo Falcón de 15 ml y mantenido a una temperatura de 37 °C en baño maría. Para la aspiración del fluido folicular se utilizó un medio compuesto de 10 000 UI/L de heparina y 50 µg/l de gentamicina.

El líquido folicular fue centrifugado a 700 g por 20 min para separar los contenidos celulares. El sobrenadante fue colocado en viales de 2 ml y almacenados en nitrógeno líquido hasta su análisis.

Análisis Bioquímico

Se determinaron los niveles de glucosa, proteína, albumina, triglicéridos y colesterol del líquido folicular a través de kits comerciales (FAR Diagnostics, Italia) específicos para cada uno de ellos, siguiendo las especificaciones del fabricante, utilizándose 500 µl del reactivo y 5 µl de la muestra del fluido folicular. Los análisis fueron realizados con un analizador bioquímico semiautomático (SINOWA, China).

Análisis Estadístico

El análisis se realizó mediante el programa estadístico SPSS 25. Se verificó que los valores presenten una distribución normal antes de realizar el análisis de varianza para comparar las medias de los diferentes estadios (G1, G2, G3) de cada componente bioquímico. Las diferencias entre medias fueron evaluadas mediante la prueba de Tukey, considerado una significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS

El diámetro folicular al momento de la aspiración fue similar en los tres estadios (Cuadro 1). No hubo diferencias significativas entre estadios de desarrollo folicular para los niveles de proteína, albúmina, triglicéridos y colesterol del líquido folicular. Sin embargo,

Cuadro 1. Diámetro folicular en el día 9 de la sincronización folicular con un análogo de GnRH en alpaca según el estadio de desarrollo folicular (9 alpacas por grupo)

| Estadio | Media (mm) | Mínimo (mm) | Máximo (mm) |
|---------|-------------|-------------|-------------|
| G1 | 8.63 ± 1.38 | 7 | 11 |
| G2 | 8.98 ± 1.44 | 7.6 | 12 |
| G3 | 8.22 ± 1.06 | 7 | 10 |

G1: estadio de crecimiento; G2: estadio de estática; G3: estadio de regresión

los niveles de glucosa fueron menores en el estadio de regresión en comparación con el estadio de estática ($p < 0.05$; Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Los componentes bioquímicos del fluido folicular son esenciales para la maduración y fertilización del ovocito, por lo que cambios en su concentración pueden afectar el crecimiento y la calidad del ovocito (Leroy *et al.*, 2004; Gode *et al.*, 2011).

Glucosa

La glucosa cumple un rol fundamental en el metabolismo ovárico como fuente de energía. Las diferencias encontradas entre el estadio de estática y regresión podrían sugerir un agotamiento de los contenidos de glucosa en el estadio de regresión folicular. Según por Bravo *et al.* (1990), el periodo de crecimiento y estática se presenta a los 4.8 ± 1.5 días y 5.0 ± 1.6 días, respectivamente, en tanto que el periodo de regresión ocurre a partir de 10-11 días en adelante, lo que implicaría un tiempo suficiente para que los niveles de glucosa disminuyan debido al catabolismo local de los carbohidratos (Ali *et*

Cuadro 2. Concentración de glucosa, proteína, albúmina, colesterol y triglicéridos en el fluido folicular en el día 9 de la sincronización folicular, según el estadio de desarrollo folicular (9 alpacas por grupo)

| Componente bioquímico | Estadios de desarrollo folicular | | |
|-----------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Crecimiento | Estática | Regresión |
| Glucosa (mg/dl) | 37.04 ± 8.58 ^{a,b} | 41.19 ± 9.99 ^a | 30.07 ± 7.85 ^b |
| Proteína (g/dl) | 1.65 ± 0.63 | 1.93 ± 0.85 | 1.79 ± 0.97 |
| Albúmina (g/dl) | 1.14 ± 0.36 | 1.42 ± 0.48 | 1.31 ± 0.57 |
| Colesterol (mg/dl) | 15.82 ± 7.7 | 18.3 ± 7.43 | 11.08 ± 5.25 |
| Triglicéridos (mg/dl) | 11.3 ± 5.12 | 12.35 ± 5.84 | 10.78 ± 4.27 |

^{a,b} Superíndices diferentes en la misma línea indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

al., 2008). Este hallazgo coincide con lo reportado por Gérard *et al.* (2002) en yeguas, donde los contenidos de glucosa tendieron a disminuir al pasar de la etapa dominante temprana (20-22 mm) a la etapa dominante tardía (30-32 mm). No obstante, los resultados difieren de lo reportado por Pacheco *et al.* (2019), quienes utilizan ovarios de animales procedentes de centros de sacrificio y que pueden afectar los niveles a nivel folicular.

La glucosa se origina a partir de la glucólisis dentro de las células de granulosa mural (Leese y Lenton, 1990, Collins *et al.*, 1997) y por la afluencia de algunas moléculas del plasma sanguíneo a los folículos (Leese y Lenton, 1990); de allí que una menor permeabilidad de la barrera folicular en el estadio de regresión podría disminuir la afluencia de glucosa a partir de plasma sanguíneo. Los cambios en la permeabilidad son factibles debido a que las propiedades metabólicas de la barrera del folículo cambian significativamente durante el crecimiento folicular (Gosden *et al.*, 1983).

En otras especies se ha observado un comportamiento similar de disminución en la concentración de glucosa en el fluido folicular, pero relacionado al tamaño folicular. Ali *et*

al. (2008) encontraron que el contenido de glucosa en el fluido folicular e los dromedarios disminuyó a medida que los folículos aumentaron de 5-9 mm (136 ± 4.05 mg/dl) a 10-20 mm (77.09 ± 4.31 mg/dl), atribuyendo el cambio a un efecto de dilución, ya que comparativamente habría más fluido presente en los folículos grandes que en los pequeños. Por el contrario, en vacas lecheras se ha evidenciado que la concentración de glucosa fue directamente proporcional al tamaño folicular (Leroy *et al.*, 2004).

Proteína total

Se encontró un ligero incremento, no significativo, de los niveles de proteína del estadio de crecimiento al estadio de estática. En este sentido, Vencato *et al.* (2014) evaluaron en llamas el perfil electroforético de proteínas del fluido folicular en las tres etapas del desarrollo del folículo, encontrando un aumento en proteínas de 250 kDa al pasar de la fase de crecimiento a la fase de estática, lo que coincidiría con el comportamiento observado en el presente estudio. Por otro lado, Leroy *et al.* (2004) indicaron que el contenido de la proteína total en vacas lecheras no difiere significativamente durante el crecimiento folicular. Pacheco *et al.* (2019) re-

porta valores diferentes, posiblemente debido a la técnica de determinación y a que en este estudio se utilizaron animales vivos, no indicándose el tamaño promedio de los folículos incluidos en la categoría de grandes.

Albúmina

Los niveles de albúmina no presentaron diferencia significativa entre los estadios, por lo que no habría asociación entre el estadio de desarrollo folicular y los niveles de albúmina. Pacheco *et al.* (2007) reportaron valores superiores de albúmina (5.29 g/dl) con relación a los resultados obtenidos en el presente estudio; no obstante, el fluido también fue recuperado de folículos >7 mm de ovarios procedentes de camal, por lo que se podrían haber generado cambios en la composición regular *in vivo* de la albúmina.

La albúmina constituye más de la mitad de la proteína total, lo cual también fue observado en otros estudios en CSA (Vencato *et al.*, 2014; Huanca *et al.*, 2017).

Colesterol

El colesterol folicular se origina a partir de las células de granulosa y del suero sanguíneo mediante la captación de lipoproteínas plasmáticas (Endresen *et al.*, 1990). En el presente trabajo se evidenció una ligera y no significativa disminución en la concentración del colesterol al pasar del estadio de estática a regresión. En este sentido, Gérard *et al.* (2002) observaron en yeguas que el contenido de lipoproteínas disminuyó significativamente al pasar de la etapa dominante temprana (20-22 mm) a la etapa dominante tardía (30-32 mm), comportamiento similar a este estudio.

Triglicéridos

Los niveles de triglicéridos fueron similares en los tres estadios de desarrollo folicular. En estudios similares, Huanca *et al.*

(2017) reportaron valores de 3.94 y 3.16 mg/dl para folículos >7 mm utilizando como inductor de ovulación al PS y GnRH, respectivamente, sin encontrar diferencias significativas. Por otro lado, Leroy *et al.* (2004) observaron que la concentración de este metabolito aumentó en un 43% en el líquido folicular a medida que el tamaño del foliculo aumentó de pequeño (<4 mm) a grande (>10 mm) en vacas lecheras.

CONCLUSIONES

- Se observó una mayor concentración de glucosa en el líquido folicular durante el estadio de estática con respecto al estadio de regresión folicular en las alpacas.
- No hubo diferencias significativas en las concentraciones de niveles de proteína, albúmina, triglicéridos y colesterol del líquido folicular entre los tres estadios de desarrollo folicular en las alpacas.

LITERATURA CITADA

1. **Aba M. 2014.** Anatomy and physiology of reproduction in the female llama and alpaca. In: Llama and alpaca care. Part: 3 Reproduction. Philadelphia, PA, USA: Elsevier. p 140-146.
2. **Albomohsen H, Mamouei M, Tabatabaei S, Fayazi J. 2011.** Metabolic composition variations of follicular fluid and blood serum in Iranian dromedary camels during the peak breeding season. *J Anim Vet Adv* 10: 327-331. doi: 10.3923/javaa.2011.327.331
3. **Ali S, Ahmad N, Akhtar N, Zia-ur-Rahman, Noakes DE. 2008.** Metabolite contents of blood serum and fluid from small and large sized follicles in dromedary camels during the peak and the lowbreeding seasons. *Anim Reprod Sci* 108: 446-456. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.10.001

4. **Bravo PW, Fowler ME, Stabenfeldt GH, Lasley BL. 1990.** Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biol Reprod* 43: 579-585. doi: 10.1095/biolreprod43.4.579
5. **Collins A, Palmer E, Jacqueline B, Jean B, Duchamp G, Buckley T. 1997.** A comparison of the biochemical composition of equine follicular fluid and serum at four different stages of the follicular cycle. *Equine Vet J* 25: 12-16. doi: 10.1111/j.2042-3306.1997.tb05092.x
6. **Endresen MJ, Haug E, Abyholm T, Henriksen T. 1990.** The source of cholesterol for progesterone synthesis in cultured preovulatory human granulosa cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 123: 359-364. doi: 10.1530/acta.0.1230359
7. **[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2005.** Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914: Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. FAO. 62 p.
8. **Fernandez-Baca S, Madden DH, Novoa C. 1970.** Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *J Reprod Fert* 22: 261-267. doi: 10.1530/jrf.0.0220261
9. **Fernandez-Baca S. 1991.** Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago de Chile: FAO. 429 p.
10. **Gérard N, Loiseau S, Duchamp G, Seguin F. 2002.** Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (1HNMR). *Reproduction* 124: 241-248. doi: 10.1530/rep.0.1240241
11. **Gode F, Gulekli B, Dogan E, Korhan P, Dogan S, Bige O, Cimri D, Atabay N. 2011.** Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality. *Fertil Steril* 95: 2274-2278. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.03.045
12. **Gosden RG, Laing SC, Flurkey K, Finch CE. 1983.** Graafian follicle growth and replacement in anovulatory ovaries of ageing C57BL/6J mice. *J Reprod Fert* 69: 453-462. doi: 10.1530/jrf.0.0690453
13. **Huanca W, Castro A, Gomez N, Cordero A. 2017.** Biochemical composition of follicular fluid in relation to the stimulus to induce ovulation in alpacas (*Vicugna pacos*). *Reprod Fert Dev* 29: 164-164. doi: 10.1071/RDv29n1Ab111
14. **Leese HJ, Lenton EA. 1990.** Glucose and lactate in human follicular fluid concentrations and interrelationships. *Hum Reprod* 5: 915-919. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137219
15. **Leroy J, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, de Kruif A. 2004.** Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 80: 201-211. doi: 10.1016/S0378-4320(03)00173-8
16. **Matoba S, Bender K, Fahey AG, Mamo S, Brennan L, Lonergan P. 2014.** Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential. *Reprod Fertil Dev*. 26: 337-345. doi: 10.1071/RD13007
17. **Pacheco J, Coila P, Olivera M., Quispe A. 2019.** Variaciones de la composición bioquímica del fluido folicular de la alpaca según el estado de crecimiento del folículo ovárico. *Rev Inv Vet Perú* 30: 1629-1636. 10.15381/rivep.v30i4.17193
18. **Ratto MH, Cervantes M, Norambuena C, Silva M, Miragaya M, Huanca W. 2011.** Effect of location and stage of development of dominant follicle on ovulation and embryo survival rate in alpacas. *Anim Reprod Sci* 127: 100-105. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.07.003
19. **Vaughan JL, Macmillan KL, D'occhio MJ. 2004.** Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Anim Reprod Sci* 80: 353-361. 10.1016/j.anireprosci.2003.08.002

20. **Vencato J. 2014.** Novel approaches in andrology examination and follicular fluid biochemical characterization in the optimization of reproductive technologies in farm animals. Tesis Doctoral. Italia: Univ. Degli Studi di Padova. 143 p.
21. **Wallace M, Cottell E, Gibney MJ, McAuliffe FM, Wingfield M, Brennan L, 2012.** An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. *Fertil Steril* 97: 1078-1084. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.01.122