



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Efecto del fluido folicular sobre la capacitación de
espermatozoides epididimarios de alpaca
(*Vicugna pacos*)**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Zoología con
mención en Ecología y Conservación

AUTOR

Zeze Humberto BRAVO GUTIÉRREZ

Lima, Perú

2017

RESUMEN

La importancia económica de la ganadería de alpaca en las zonas altoandinas, hace necesario un mayor entendimiento de la fisiología reproductiva a fin de poder optimizar la producción de esta especie. La capacitación espermática en la alpaca, aún es poco entendida ya que falta dilucidar los factores que participan en este proceso. La capacitación in vitro de los espermatozoides con fluido folicular es un procedimiento que ha podido ser estudiado en diversas especies con resultados que permanecen en discusión. En alpaca, la capacitación espermática en presencia de fluido folicular permitiría una mayor comprensión de la fisiología reproductiva ya que este suplemento natural, podría ser considerado como un inductor fisiológico y sus efectos podrían mostrar resultados más cercanos a lo que ocurriría in vivo. Sin embargo, debido a los distintos efectos producidos por el fluido folicular en otras especies, es necesario determinar el efecto de esta sustancia sobre la actividad espermática de alpaca. Por ello, el presente trabajo se enfoca en evaluar los indicadores fisiológicos más importantes de la capacitación espermática, los cuales son: el aumento de la movilidad espermática, la reacción acrosomal y la capacidad de unión a la zona pelúcida. Se realizaron tres etapas experimentales con el objetivo de evaluar el efecto del fluido folicular sobre la capacitación de espermatozoides epididimarios de alpaca. En la primera etapa, el fluido folicular fue inactivado por calentamiento y el medio fue suplementado con suero bovino fetal, para determinar el efecto sobre la movilidad espermática. Los resultados obtenidos luego de la primera hora fueron los siguientes: fluido folicular inactivado sin FBS, 58,75%; fluido folicular inactivado con FBS, 58,75%; fluido folicular fresco sin FBS, 62,33%; con fluido folicular fresco con FBS, 64,83%; control sin FBS, 37,00% y control con FBS, 39,58%. Luego de la segunda hora de incubación, la movilidad fue la siguiente: fluido folicular inactivado sin FBS, 47,75%; fluido folicular inactivado con FBS, 53,75%; fluido folicular fresco sin FBS, 54,25%; fluido folicular fresco con FBS, 50,58%; control sin FBS, 32,25%; control con FBS, 36,92%. En la segunda etapa experimental, se evaluó el efecto del fluido folicular, en relación al tamaño folicular del cual provenían; para ello se clasificó el fluido folicular de acuerdo al tamaño del folículo proveniente, como sigue: De folículos menores de 3 mm, de folículos de entre 3 y 6 mm, y de folículos mayores de 6 mm. En esta etapa experimental

se evaluó el efecto del fluido sobre la movilidad y sobre la reacción acrosomal. Los resultados de la movilidad luego de la primera hora fueron los siguientes: fluido de folículos pequeños, 48,00%; fluido de folículos medianos, 43,33%; fluido de folículos grandes, 34,53%; control sin FBS, 26,00%; control con FBS, 29,20%. Luego de la segunda hora, los resultados fueron como sigue: fluido de folículos pequeños, 46,53%; fluido de folículos medianos, 40,00%; fluido de folículos grandes, 35,60%; control sin FBS, 28,13%; control con FBS, 26,80%. En el análisis de la reacción acrosomal se obtuvieron los siguientes resultados: fluido folicular de folículos pequeños, 66,3%; fluido folicular de folículos medianos, 58,86%; fluido de folículos grandes, 67,63%; control sin FBS, 30,06%; el control con FBS, 44,04%. En la tercera etapa, se evaluó la capacidad de los espermatozoides incubados con fluido folicular para unirse a la zona pelúcida de ovocitos homólogos. En este experimento, se enfrentaron los espermatozoides con zonas pelúcidas en el medio HAM F10 suplementado con fluido folicular y se determinó el número de espermatozoides unidos. Los resultados fueron los siguientes: fluido folicular, 7,90; control sin FBS, 1,68, control con FBS, 2,70. Los resultados permitieron reconocer que el fluido folicular de alpaca no es tóxico para los espermatozoides de alpaca, promueve la movilidad espermática sí solo ($\alpha=0,05$). Por otro lado, el fluido folicular favorece la movilidad espermática, independientemente del tamaño del folículo ($\alpha=0,05$); aunque el fluido de folículos medianos y pequeños ejercían un efecto ligeramente mayor. Asimismo, se pudo observar que el fluido folicular promovía la reacción acrosomal de los espermatozoides ($\alpha=0,05$). Adicionalmente, el fluido folicular favorecía la capacidad de los espermatozoides de alpaca para unirse a la zona pelúcida del ovocito ($\alpha=0,05$). Ante las evidencias, se concluye que el fluido folicular de alpaca es un inductor de la capacitación espermática para esta especie.

Palabras clave: Capacitación espermática, fluido folicular, movilidad espermática, reacción acrosomal, zona pelúcida.

ABSTRACT

The economic importance of alpaca in the high Andean zones requires a better understanding of reproductive physiology in order to optimize the production of this species. The sperm capacitation in the alpaca is still poorly understood since there is a lack of clarification of the factors involved in this process. In vitro sperm capacitation with follicular fluid is a procedure that has been studied in several species with variable results. In the case of alpaca, sperm capacitation in presence of follicular fluid would allow a better understanding of reproductive physiology since this natural supplement could be considered as a physiological inducer and its effects could show results closer to what would occur in vivo. However, due to the variable effects produced by follicular fluid in different species, it is necessary to determine if this substance exerts a positive effect on the sperm activity in alpaca. Therefore, the present study focuses on the three most important physiological indicators of sperm capacitation, which are: increased motility, acrosome reaction and the ability to bind to zona pellucida. In this way, three experimental stages were performed with the objective of evaluating the effect of follicular fluid on sperm capacitation in alpaca. In the first stage, the follicular fluid was inactivated by heating and the medium had fetal bovine serum as an additive in the capacitation medium, where the effect on sperm motility was determined. After one hour the motility was: inactivated folicular fluid without FBS, 58,75%; inactivated folicular fluid with FBS, 58,75%; no-inactivated folicular fluid without FBS, 62,33%; no-inactivated folicular fluid with FBS, 64,83%; control without FBS, 37,00%, control with FBS, 39,58%. After the second hour sperm motility was: inactivated folicular fluid without FBS, 47,75%; inactivated folicular fluid with FBS, 53,75%; 62,33%; no-inactivated folicular fluid with FBS, 54,25%; no-inactivated folicular fluid with FBS, 50,58%; control without FBS, 32,25%; control with FBS, 36,92%. In the second experimental stage, we evaluated the effect of follicular fluid, in relation to the follicular size from which they came; For this the follicular fluid was classified as coming from follicles smaller than 3 mm, between 3 and 6 mm and greater than 6 mm. In this experimental stage the effect of the fluid on the motility and on the acrosome reaction was evaluated. After one hour motility was: fluid from small follicles, 48,00%; fluid from medium follicles, 43,33%; fluid from big follicles, 34,53%;

control without FBS, 26,00%; control with FBS, 29,20%. After the second hour sperm motility was: fluid from small follicles, 46,53%; fluid from medium follicles, 40,00%; fluid from big follicles, 35,60%; control without FBS, 28,13%; control with FBS, 26,80%. The acrosome reaction was: fluid from small follicles, 66,3%; fluid from medium follicles, 58,86%; fluid from big follicles, 67,63%; control without FBS, 30,06%; el control with FBS, 44,04%. In the third stage, we evaluated the ability of spermatozoa incubated with follicular fluid to bind to the zona pellucida of homologous oocytes. In this experiment, spermatozoa were incubated with zona pellucida in a medium supplemented with follicular fluid and the number of spermatozoa were determined. The results obtained were: follicular fluid, 7,90; control without FBS, 1,68, control with FBS, 2,70. The results allowed to recognize that alpaca follicular fluid is not toxic to alpaca spermatozoa, and promotes sperm motility without other additives ($\alpha=0,05$). On the other hand, the follicular fluid promotes sperm motility, regardless of the size of the follicle ($\alpha=0,05$); although medium and small follicle fluid exerted a slightly greater effect. It was also observed that the follicular fluid promoted the acrosome reaction of spermatozoa ($\alpha=0,05$). Additionally, the follicular fluid favored the ability of the alpaca spermatozoa to bind the zona pellucida of the oocyte ($\alpha=0,05$). Finally, it is concluded that alpaca follicular fluid is an inducer of sperm capacitation for this species.

Key words: sperm capacitation, follicular fluid; sperm motility, acrosome reaction, zona pellucida.