

## **EFFECTO DEL FLUIDO FOLICULAR SOBRE LA CAPACIDAD DE UNIÓN A ZONA PELÚCIDA DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE ALPACA (*Vicugna pacos*)**

### **Effect of follicular fluid on the capacity of binding to the zona pellucida of epididymary sperm of alpaca (*Vicugna pacos*)**

Bravo Zeze, Briceño Ruben, Martha Valdivia\*

Laboratorio de Fisiología de la Reproducción animal, Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

\* Corresponding author: Martha Valdivia Cuya. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

E-mail: [mvaldiviac@unmsm.edu.pe](mailto:mvaldiviac@unmsm.edu.pe)

#### **ABSTRACT**

Follicular fluid is the liquid fraction that surrounds the oocyte during its growth and maturation in the ovary. The components of the follicular fluid can favor the functionality of the sperm. In the present research, the binding to the zona pellucida of epididymal spermatozoa of alpaca incubated with follicular fluid was studied. In the experiment a control group and a treatment group were used. The sperm from the control group and the treatment were incubated with zona pellucidae. The incubation of the treatment group was performed in the presence of follicular fluid at a concentration of 30%; while the incubation of the control group occurred in the absence of follicular fluid. It was observed that a greater number of spermatozoa joined the zona pellucida in the group incubated in the presence of follicular fluid. It was found that there were statistical differences between treatment and control. It is concluded that alpaca follicular fluid enhances the in vitro binding of spermatozoa to the zona pellucida of this species.

**Keywords:** Alpaca, follicular fluid, zona pellucida, epididymal sperm, gametic interaction.

#### **RESUMEN**

El fluido folicular es la fracción líquida que rodea al ovocito durante su crecimiento y maduración en el ovario. Los componentes del fluido folicular pueden favorecer la funcionalidad de los espermatozoides. En el presente trabajo se ha estudiado la unión a zona pelúcida de espermatozoides epididimarios de alpaca incubados con fluido folicular de esta especie. En el experimento se utilizó un grupo control y un grupo tratamiento. Los espermatozoides del grupo control y el tratamiento fueron incubados con zonas pelúcidas. La incubación del grupo tratamiento se realizó en presencia de fluido folicular a una concentración de 30%; mientras que la incubación del grupo control se dio en ausencia de fluido folicular. Se observó que un mayor número de espermatozoides se unían a la zona pelúcida en el grupo incubado en presencia de fluido folicular. Se encontró que había diferencias estadísticas entre el tratamiento y el control. Se concluye que el fluido folicular de alpaca favorece la unión in vitro de espermatozoides a la zona pelúcida de esta especie.

**Palabras clave:** Alpaca, fluido folicular, zona pelúcida, espermatozoides epididimarios, interacción gamética.

## INTRODUCCION

El fluido folicular es la fracción líquida que rodea al ovocito durante su desarrollo en el ovario, específicamente, dentro del folículo ovárico (Gosden et al., 1988). El fluido folicular contiene sustancias que son importantes para el crecimiento y maduración del ovocito como FSH, LH, progesterona, estradiol y factores de crecimiento (Gosden et al., 1988; Basuino y Silveira, 2015). Se ha podido observar que el fluido folicular puede estimular las funciones espermáticas relacionadas con la capacidad fecundante en varias especies. Por ejemplo, se ha reconocido que el fluido folicular tiene un efecto favorable en la movilidad espermática (Yanagimachi, 1969; Tesarik, 1985; McNutt et al., 1994; Jeon et al., 2001; Briton-Jones et al., 2001; Getpook y Wirotkarun, 2007; Esmailpour et al., 2014; Leemans et al., 2015) y la reacción acrosomal (Yanagimachi, 1969; Thérien et al., 2001; Thérien et al., 2005). En el caso de la alpaca, Bravo & Valdivia (2017) pudieron observar que el fluido folicular estimulaba la movilidad espermática. Sin embargo, el efecto in vitro del fluido folicular en la interacción gamética ha sido muy poco estudiado. Qiao et al., (1998) observaron que el fluido folicular humano reducía la capacidad fecundante de los espermatozoides; mientras que Basuino y Silveira (2015) propusieron el uso del fluido folicular como suplemento para la fertilización in vitro en humanos.

Se ha reconocido que la capacidad fecundante de los espermatozoides puede ser evaluada mediante el ensayo de unión a zona pelúcida, que mide el número de espermatozoides que se unen a la zona pelúcida del ovocito; además esta prueba integra las diversas funciones espermáticas que son necesarias para la interacción con el gameto femenino (Meyers et al., 1995; Oehninger et al., 1997; Fazeli et al., 1997; Liu y Baker, 2000; Oehninger et al., 2000; Gonzales et al., 2001; Oehninger et al., 2003; Lamb, 2010; Franken y Oehninger, 2012; Ferraz et al., 2014; Oehninger et al., 2014). Por este motivo, en el presente trabajo se realizó el ensayo en zona pelúcida del efecto del fluido folicular de alpaca en la interacción gamética de esta especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta y transporte de muestras

Los testículos y ovarios de alpaca fueron colectados animales beneficiados, en Camal Municipal de Huancavelica. Las gónadas fueron transportadas en suero fisiológico (NaCl 0,9%) a 4°C durante 12 horas, hasta el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Ya que en estas condiciones los espermatozoides se mantienen viables, mientras que las zonas pelúcidas de los ovocitos son muy estables incluso por varias semanas a esta temperatura.

### Obtención de zonas pelúcidas y fluido folicular

Los ovocitos fueron obtenidos a partir de folículos ováricos de 3 a 6 mm. Se utilizó una jeringa de 1 ml para aspirar el contenido de los folículos. El material aspirado se colocó en una placa con NaCl 0.9%, donde los ovocitos ya se encontraban liberados de las células del cúmulus. Se utilizó un sistema adaptado a una boquilla por un extremo y una pipeta Pasteur con la punta modificada, para manipular los ovocitos. Con la ayuda de una aguja y mediante constantes pipeteos se logró liberar el contenido de los ovocitos para obtener únicamente zonas pelúcidas aisladas.

Para la obtención del fluido folicular se procedió inicialmente de manera similar a la obtención de los ovocitos. Se extrajo el contenido del fluido folicular y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos (modificado de Schuffner et al., 2002). Luego se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

### Obtención de espermatozoides

Se utilizaron 27 muestras de alpacas machos. Los testículos fueron liberados de la capa albugínea. Se extrajo la cola del epidídimo y se le retiraron los vasos sanguíneos. Los dos epidídimos de cada animal fueron colocados en una placa con 1 ml de medio HAM F-10 (Sigma N6635) a 37 °C. Los epidídimos fueron seccionados con una tijera para permitir la salida de los espermatozoides. El medio con los espermatozoides fue colocado en un microtubo Eppendorf de 1.5 ml y se incubó a 37 °C.

### Interacción de espermatozoides con las zonas pelúcidas

Cada muestra tuvo un control negativo y un tratamiento con fluido folicular. Los espermatozoides fueron colocados directamente junto con tres zonas pelúcidas en una concentración final de 105 espermatozoides por cada zona pelúcida por ml de medio. Para el caso del control negativo, el enfrentamiento de los gametos se realizó únicamente en medio HAM F-10 en ausencia de fluido folicular. Para el tratamiento, los espermatozoides fueron incubados en un medio que consistía en HAM F-10 con fluido folicular de alpaca al 30% v/v. Finalmente las muestras fueron cubiertas con aceite mineral y se incubaron durante 5 horas a 37°C.

Luego del periodo de incubación, cada zona pelúcida fue lavada en suero fisiológico mediante continuos y suaves pipeteos, para desprender los espermatozoides débilmente unidos. Finalmente se observó al microscopio y se contó el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida. Se utilizó el micrométrico para poder contar los espermatozoides unidos en todos los niveles del campo.

### Análisis estadísticos

Para cada muestra, tanto para el control como para el tratamiento, se halló el promedio de espermatozoides unidos a la zona pelúcida y la desviación estándar.

Para comparar el tratamiento con fluido folicular con el grupo control, se realizó una prueba de Mann-Whitney para datos no relacionados. Esta prueba se realizó, debido a que la distinta procedencia y estado de cada ovocito podría generar una variabilidad muy alta entre el tratamiento y control para considerarlos como datos relacionados. El nivel de significancia fue 0.05.

Finalmente, no se consideraron otros parámetros ya que se trataron las diferentes muestras indistintamente de la calidad espermática, para poder demostrar el efecto del fluido folicular en la mejora integral de la funcionalidad espermática, la cual se sintetiza en la capacidad de unión a zona pelúcida.

## RESULTADOS

Luego del conteo de espermatozoides unidos a la zona pelúcida el promedio para el control fue 2.4 espermatozoides, mientras que para el tratamiento fue 7.8 espermatozoides unidos a la zona pelúcida de alpaca (tabla 1).

Tabla 1. Unión a zona pelúcida de espermatozoides incubados con fluido folicular de alpaca. Las letras diferentes en las medias indican que existen diferencias significativas.

	Media ± error estándar	Mín.	Máx	N	Número de zonas pelúcidas
Control	2.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.0	10.00	27	81
Fluido folicular	7.8 ± 1.6 <sup>b</sup>	0.0	42.33	27	81
<					
P valor	0.001				

El análisis estadístico mostró que había diferencias significativas entre el tratamiento con fluido folicular y el control. Esto demuestra que el fluido folicular de alpaca ejerce un efecto positivo en la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida en alpaca (Tabla 1).

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo mostraron que el fluido folicular de alpaca estimula la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida en alpaca. Anteriormente, se ha podido reconocer para otras especies que el fluido folicular favorece ciertas funciones asociadas con la capacidad fecundante como la movilidad y la reacción acrosomal (Yanagimachi, 1969; Tesarik, 1985; Suarez et al., 1986; Morales et al., 1989; Ravnik et al., 1990; Hansen et al., 1991; McNutt y Killian, 1991; Ravnik et al., 1992; McNutt et al., 1994; Cheng et al., 1998; Jeon et al., 2001; Thérien et al., 2001; Briton-Jones et al., 2001; Schuffner et al., 2002; Getpook y Wirotkarun, 2007; Esmailpour et al., 2014; Leemans et al., 2015). Estudios previos en nuestro laboratorio determinaron que el fluido folicular favorece la movilidad espermática en alpaca (Bravo y Valdivia, 2017). Algunos autores han indicado que el fluido folicular puede descender junto con el ovocito durante la ovulación, y además podría tener una participación en el proceso de la fecundación al tener contacto con los espermatozoides (Oehninger, 2003; Taitzoglou et al., 2003; Hansen et al., 1991; Basuino y Silveira, 2015).

En el estudio de Qiao et al. (1998) indicaron que el fluido folicular inhibía la unión a la zona pelúcida en humanos. Adicionalmente, Muncu et al. (2004) concluían que el fluido folicular reducía la capacidad fecundante en espermatozoides humanos, aunque en este último trabajo, hubo una prolongada capacitación previa con BSA, lo que podría haber disminuido la longevidad de los espermatozoides. Contrariamente a estos trabajos, en el presente estudio, se demuestra que el fluido folicular de alpaca estimula la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida de esta especie, lo que, además, evidenciaría que el fluido folicular de alpaca capacita a los espermatozoides, ya que sólo los espermatozoides capacitados pueden unirse a la zona pelúcida (Graham y Mocé, 2005; Oehninger et al., 2014). La composición de fluido folicular de alpaca ha sido analizada previamente por Pacheco y Coila (2010) y Huanca et al. (2017), y se observó principalmente la presencia de albúmina, triglicéridos, colesterol y glucosa, además de fosfatasa, aminotransferasa y lactato deshidrogenasa, siendo la albúmina el componente más abundante, y probablemente el que produce el estímulo en la

funcionalidad espermática; sin embargo, es necesario un mayor estudio de las proteínas totales y de las hormonas para determinar con mayor rigor el agente estimulante en el fluido folicular de alpaca.

Los presentes resultados revelan de manera más integral, el efecto del fluido folicular en la funcionalidad espermática de alpaca. Además, estos resultados permiten apoyar la utilización del fluido folicular de alpaca en los medios de fecundación in vitro, como ha sido propuesto por Basuino y Silveira (2015) para humanos, ya que el fluido folicular podría estimular las funciones espermáticas asociadas a la capacidad fecundante (Bahmanpour et al., 2009).

## CONCLUSIÓN

El fluido folicular de alpaca favorece la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida de esta especie.

## REFERENCIAS

- Bahmanpour S, Namavar MR, Talaei T, Mazaheri Z, Monabati A. The effects of follicular fluid on human XY bearing sperm ratio by Fluorescent in Situ Hybridization (FISH). *International Journal of Reproductive BioMedicine*. 2009; 7(3), 129-133.
- Basuino L, Silveira Jr. CF. Human follicular fluid and effects on reproduction. *Jornal brasileiro de reproducao assistida*, 2015; 20(1), 38-40.
- Bravo Z, Valdivia M. Effect of Follicular Fluid on Sperm Motility of Alpaca *Vicugna pacos* (Linnaeus, 1758). *JSM Invitro Fertil*. 2017; 2(2): 1013.
- Briton-Jones C, Yeung, Q, Tjer G, Chiu T, Cheung L, Yim S, Lok I, Haines C. Andrology: The Effects of Follicular Fluid and Platelet-Activating Factor on Motion Characteristics of Poor-Quality Cryopreserved Human Sperm. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2001; 18(3), 165-170.
- Cheng, Fazeli, Voorhout, Tremoleda, Bevers, Colenbrander. Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances in vitro binding to the zona pellucida. *International Journal of Andrology*. 1998; 21(2): 57-66.
- Esmailpour T, Zarei MR, Bahmanpour S, Aliabadi E, Hosseini A, Jaberipour M. Effect of follicular fluid and platelet-activating factor on lactate dehydrogenase C expression in human asthenozoospermic samples. *Iranian journal of medical sciences*. 2014; 39(1), 20-28.
- Fazeli AR, Zhang BR, Steenweg W, Larsson B, Bevers MM, Van den Broek, J, Rodríguez-Martínez H, Colenbrander B. Relationship between sperm-zona pellucida binding assays and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 1997; 48(5), 853-863.
- Ferraz, MA. Morató R, Yeste M, Arcarons N, Pena AI, Tamargo C, Hidalgo CO, Muiño R, Mogas T. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology*. 2014; 81(8), 1067-1072.
- Franken, DR, Oehninger S. Semen analysis and sperm function testing. *Asian journal of andrology*. 2012; 14(1), 6.
- Getpook C, Wirotkarun S. Sperm motility stimulation and preservation with various concentrations of follicular fluid. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2007; 24(9), 425-428.

- Gonzales A, Rosa A, Cortez G, Olivares P, Ríos C, Ordoñez J. Validación del test de Zona como método de diagnóstico de la capacidad fecundante del espermatozoide humano. *Biofarbo*. 2001; 9(9), 5-14.
- Gosden RG, Hunter RH, Telfer E, Torrance C, Brown N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1988; 82: 813-825.
- Graham JK, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 2005; 64(3), 492-504.
- Hansen C, Srikandakumar A, Downey BR. Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development*. 1991; 30 (2): 148-153.
- Huanca W, Castro A, Gomez N, Cordero A. Biochemical composition of follicular fluid in relation to the stimulus to induce ovulation in alpacas (*Vicugna pacos*). *Reproduction, Fertility and Development*. 2017; 29(1), 164-164.
- Jeon BG, Moon JS, Kim KC, Lee HJ, Choe SY, Rho GJ. Andrology: Follicular Fluid Enhances Sperm Attraction and Its Motility in Human. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2001; 18(8), 407-412.
- Lamb DJ. Semen analysis in 21st century medicine: the need for sperm function testing. *Asian journal of andrology*. 2010; 12(1), 64.
- Leemans B, Gadella BM, Stout TA, Nelis H, Hoogewijs M, Van Soom A. An alkaline follicular fluid fraction induces capacitation and limited release of oviduct epithelium-bound stallion sperm. *Reproduction*. 2015; 150(3), 193-208.
- Liu DY, Baker HW. Defective sperm–zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. *Human Reproduction*. 2000; 15(3), 702-708.
- McNutt T, Killian G. Influence of Bovine Follicular and Oviduct Fluids on Sperm Capacitation in vitro. *Journal of Andrology*. 1991; 12 (4): 244-252.
- McNutt T, Olds-Clarke P, Way A, Suarez S, Killian G. Effect of Follicular or Oviductal Fluids on Movement Characteristics of Bovine Sperm during Capacitation in vitro. *Journal of Andrology*. 1994; 15 (4): 328-336.
- Meyers SA, Liu IK, Overstreet JW, Drobnis EZ. Induction of acrosome reactions in stallion sperm by equine zona pellucida, porcine zona pellucida, and progesterone. *Society for the Study of Reproduction*. 1995.
- Morales P, Cross NL, Overstreet JW, Hanson FW. Acrosome intact and acrosome-reacted human sperm can initiate binding to the zona pellucida. *Developmental biology*. 1989; 133(2), 385-392.
- Munuce MJ, Caille AM, Botti G, Berta CL. Modulation of human sperm function by follicular fluid. *Andrologia*. 2004; 36(6), 395-401.
- Oehninger S. Biochemical and functional characterization of the human zona pellucida. *Reproductive biomedicine online*. 2003; 7(6), 641-648.
- Oehninger S, Franken DR, Ombelet W. Sperm functional tests. *Fertility and sterility*. 2014; 102(6), 1528-1533.
- Oehninger S, Franken DR, Sayed E, Barroso G, Kolm P. Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Human Reproduction Update*. 2000; 6(2), 160-168.
- Oehninger S, Mahony, M, Özgür K, Kolm P, Kruger T, Franken D. Clinical significance of human sperm-zona pellucida binding. *Fertility and sterility*. 1997; 67(6), 1121-1127.
- Pacheco JI, Coila P. Composición del fluido folicular de alpaca (*Vicugna pacos*) en diferentes estadios de desarrollo. *Archivos de Zootecnia*. 2010; 59 (227): 451-454.
- Qiao J, Yeung WS, Yao YQ, Ho PC. The effects of follicular fluid from patients with different indications for IVF treatment on the binding of human spermatozoa to the zona pellucida. *Human Reproduction*. 1988; 13(1), 128-131.
- Ravnik S, Zarutskie P, Muller C. Lipid Transfer Activity in Human Follicular Fluid: Relation to Human Sperm Capacitation. *Journal of Andrology*. 1990; 11 (3): 2016-226.
- Ravnik S, Zarutskie P, Muller C. Purification and Characterization of a Human Follicular Fluid Lipid Transfer Protein That Stimulates Human Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction*. 1992; 47: 1126-1133.
- Schuffner A, Bastiaan H, Duran H, Lin Z, Morshedi M, Franken D, Oehninger S. Zona pellucid-induced acrosoma reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive Gi protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. *Molecular Human Reproduction*. 2002; 8 (8): 722-728.
- Suarez S, Wolf D, Meizel S. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Research*. 1986, 14 (2): 107-121.
- Taitzoglou IA, Chapman DA, Killian GJ. Induction of the acrosome reaction in bull spermatozoa with plasmin. 2003; *Andrologia* 35, 112-116.
- Tesarik J. Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1985; 74: 383-388.
- Thérien I, Bergeron A, Bousquet D, Manjunath P. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Molecular Reproduction and Development*. 2005; 71 (1). 97-106.
- Thérien I, Bousquet D, Manjunath P. Effect of Seminal Phospholipid-Binding Proteins and Follicular Fluid on Bovine Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction*. 2001; 65: 41-51.
- Yanagimachi R. In vitro Capacitation of Hamster Spermatozoa by Follicular Fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1969; 18: 275-286.