COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DEL LÍQUIDO FOLICULAR EN CABRAS ADULTAS Y PREPÚBERES Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES Y LA ALIMENTACIÓN

Soto, S., Català, M. G., Roura, M., Contreras-Solís, I., Izquierdo, D. y Paramio, M. T.
Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. España. Teresa.Paramio@uab.es

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos (AG) presentes en el líquido folicular (LF) influyen en la calidad del oocito y en el desarrollo embrionario. Las concentraciones de AG en LF dependen de la concentración en plasma y de la dieta (revisado por Leroy et al., 2014). Diversos investigadores han estudiado el contenido de AG en LF y sus variaciones dependiendo de diferentes factores como el tipo de folículo y su actividad o las modificaciones en la dieta (revisado por Dunning et al., 2014). A su vez, se ha visto como el uso de determinados AG afecta en el proceso de la producción *in vitro* de embriones (Marei et al., 2009 y 2010). Hasta la fecha, no existen estudios publicados sobre la composición de AG en el LF en cabras.

Por otro lado, sí existen publicaciones en cabras sobre el contenido de AG de la leche (Castro-Gómez et al., 2014) estando afectado por factores como el rebaño, la alimentación (Renna et al., 2012) o la época del año (Czarniawska-Zając et al., 2006). Según Czarniawska-Zając (2006) la época del año provoca variación en el perfil lipídico por la diferente composición de la dieta, sobre todo debido al acceso a forraje fresco en las estaciones de pastoreo.

En nuestro laboratorio, en cabras prepúberes se han observado diferencias en el porcentaje de blastocistos producidos *in vitro* según la estación del año, con un menor porcentaje en otoño (4,7 %), respecto al resto de las estaciones (invierno: 15,8 %; primavera: 16,2 %; y verano: 10,4 %), a pesar de ser fisiológicamente la época reproductiva (Catalá et al., 2015). El objetivo del presente estudio es analizar la composición de AG del LF en cabras adultas y prepúberes y sus variaciones por época del año, con tal de valorar si se pueden asociar al porcentaje de blastocistos producidos *in vitro* en nuestro laboratorio, así como a la dieta y la composición de la leche.

MATERIAL Y MÉTODOS

El LF de cabras adultas se obtuvo mediante *Laparoscopic Ovum Pick-Up* (LOPU) de 12 cabras Murciano-Granadina de 5 a 7 años estabuladas y alimentadas durante todo el año con heno de alfalfa *ad libitum*. Se llevaron a cabo de 1 a 5 sesiones de LOPU por cabra en las cuatro estaciones del año siguiendo la técnica descrita por Romaguera et al. (2011) aspirando los folículos entre 2 a 9 mm de los cuales se obtuvo un *pool*. Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Ética de la Experimentación Animal y Humana (Gobierno de España, autorización número DARP 591) y bajo la supervisión de la Comisión de Ética de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). El LF de cabras prepúberes se obtuvo mediante aspiración de los folículos de ovarios de hembras lactantes de 1 a 2 meses de edad, recuperados de un matadero local en las diferentes estaciones.

El líquido folicular recién obtenido se centrifugó dos veces a 500 x g durante 10 min y se congeló a -80ºC hasta su extracción para análisis con cromatografía de gases, en el Servicio de Análisis Químico de la UAB. Se utilizó el protocolo de Sukhija y Palmquist (1988) con algunas adaptaciones. Para la extracción, se mezclaron con un vortex 200 μL de muestra (100 μL LF + 100 μL PBS) durante 60 s con 450 μL de tolueno, 50 μL de ácido nonadecanoico (como estándar interno) y 1 mL de HCL (5 %). Luego se calentó al baño maría durante 1 h a 70ºC. Seguidamente, se añadió 1,25 mL de K_2CO_3 (12 %) y 500 μL de tolueno, se mezcló con un vortex durante 30 s y se centrifugó durante 5 min a 1000 G. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se secó con Na_2SO_4. Los extractos se conservaron a -20ºC hasta su posterior análisis con cromatografía de gases (123-2362, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA). Se analizaron un total de 18 ácidos grasos, aunque para el presente estudio seleccionamos solo los 6 más relevantes.

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA con el procedimiento de modelos lineales (GLM) del paquete estadístico SAS (versión 9.3; SAS Institute Inc., EE.UU.). Las medias fueron comparadas con LSMEAN y ajustadas por TUKEY.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los AG encontrados en mayor porcentaje en LF de cabras adultas fueron el palmítico, esteárico, oleico, linoleico y araquidónico (26,81 %, 23,59 %, 22,67 %, 9,88 % y 5,31 %, respectivamente). Estos resultados son similares a los encontrados en LF de vacuno, ovino y porcino (revisado por Leroy et al., 2014). En LF de prepúberes, encontramos los mismos AG principales pero en diferente concentración: oleico, palmítico, esteárico, linoleico y araquidónico (27,53 %, 23,44 %, 16,47 %, 12,02 % y 9,18 %, respectivamente). Considerando que su dieta se compone básicamente de leche de cabra, es interesante comparar estos resultados con la composición de la leche. Si observamos los resultados obtenidos por Ceballos et al. (2009) y Castro-Gómez et al. (2014) en leche de cabras de razas españolas, vemos que, igual que en LF, el palmítico es el AG principal, y el esteárico y el oleico se encuentran en alta proporción. En cambio, el mirístico y el cáprico son elevados en leche, pero bajos en LF (el cáprico no fue detectado con cromatografía). Por último, el linoleico y el araquidónico, elevados en LF, se encuentran en más baja cantidad en leche. Si la composición del LF dependiera solo de la dieta, se esperaría que en LF de cabras lactantes hubiera la misma variación de AG que en leche. Pero además de la dieta, depende del metabolismo de los oocitos y células del cúmulus (Bender et al., 2010).

Según la época del año observamos diferencias de AG en LF de cabras adultas, independientemente de que la dieta fuera la misma durante todo el año. Estas son: en primavera más SFA que en invierno y más palmítico que en el resto del año, en verano más MUFA que en primavera, en otoño más linoleico que en el resto del año, y en invierno más n-3 que en primavera (Tabla 1). En cabras prepúberes hemos observado que existe una disminución de la producción *in vitro* de embriones en otoño (4,7 %) respecto al invierno (15,8 %) y el resto de estaciones (Català et al., 2014). En la Tabla 2 en LF de prepúberes se ve que en otoño hay significativamente mayor porcentaje de AG n-6 (22,97 %) y menor AG n-3 (2,27 %) que en invierno (19,82 % y 4,93 %, respectivamente) y que en el resto de estaciones. Las cabras adultas, cuyos oocitos son más competentes para la producción *in vitro* de embriones, presentaron significativamente más n-3 y menos n-6 en LF que las prepúberes (resultados no presentados). En vacuno, altas concentraciones de linoleico (AG n-6) inhiben la maduración de los oocitos *in vitro* (Marei et al., 2010) mientras que el linolénico (AG n-3) mejora la competencia para producir embriones *in vitro* (Marei et al., 2009). Por tanto estos resultados nos podrían indicar la relación entre la competencia del oocito y la ratio entre n-6 y n-3 en LF. En la leche de cabra, Renna et al. (2012) observaron que los AG n-3 aumentaban tras la introducción de forraje fresco en la dieta, mientras que los AG n-6 variaban muy poco. Esto indicaría que una dieta rica en forraje fresco mejoraría la competencia oocitaria.

En conclusión, existe variación en los AG del LF a lo largo del año que no se corresponde totalmente a la observada en leche ni parece ser explicada por la dieta de cabras adultas. Por otro lado, los AG n-3 y n-6 del LF podrían explicar las diferencias estacionales en la competencia oocitaria observadas en cabras prepúberes. Es interesante realizar más estudios para entender el origen de las variaciones ya que los ácidos grasos influyen en el desarrollo embrionario y su uso podría aplicarse tanto en la reproducción como en la producción *in vitro* de embriones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Bender et al. 2010. Reprod. 139(6): 1047-55. • Castro-Gómez, et al. 2014. J. Dairy Sci. 97: 1-10. • Catalá et al. 2014. Reprod., Fert. & dev. 27(1):216-217. • Ceballos, et al. 2009. J. Food Compos. Anal. 22(4): 322-329. • Childs, et al. 2008. Theriog. 70(4): 595-611. • Czarniawska-Zajac, et al. 2006. Polish J. food Nutr. Sci. 15,: 51-55. • Dunning, et al. 2014. Reprod. 148(1): R15-27. • Leroy, et al. 2014. Reprod. Domest. Anim. 49: 353-361. • Marei et al. 2009. Biol. Reprod. 81(6): 1064-1072. • Marei et al. 2010. Reprod. 139(6): 979-988. • Renna, et al. 2012. Small Rumin. Res. 108: 12-21. • Romaguera, et al. 2011. Theriog. 76(1): 1-11. • Sukhija, et al. 1988. J. Agric. Food Chem. 36:1202-1206. • Tsiplakou, et al. 2012. Int. Dairy J. 24(2): 87-92.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL 2011-23784.

***Tabla 1**. Cabras adultas. Porcentaje de ácidos grasos en líquido folicular en las diferentes estaciones del año.*

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Mirístico (C14:0)	1,16 ± 0,26	1,81 ± 0,16	1,85 ± 0,46	1,35 ± 0,28
Palmítico (C16:0)	31,72 ± 3,07^{a}	26,24 ± 0,75^{b}	25,93 ± 1,20^{b}	23,37 ± 0,79^{b}
Esteárico (C18:0)	24,48 ± 0,96	21,89 ± 1,00	23,71 ± 0,76	24,31 ± 1,07
Oleico (C18:1n9)	20,83 ± 1,27	24,42 ± 1,30	22,32 ± 0,84	23,10 ± 0,84
Linoleico (C18:2n6)	8,93 ± 0,98^{b}	8,70 ± 0,59^{b}	12,05 ± 0,25^{a}	9,83 ± 0,42^{b}
Araquidónico (C20:4n6)	5,26 ± 0,68	5,02 ± 0,41	5,50 ± 0,42	5,45 ± 0,73
MUFAs	23,65 ± 1,48^{b}	28,68 ± 1,58^{a}	24,51 ± 1,23^{ab}	26,44 ± 0,88^{ab}
PUFAs	18,02 ± 2,42	18,93 ± 1,36	22,21 ± 0,79	22,28 ± 2,01
SFA	58,33 ± 3,30^{a}	52,78 ± 1,24^{ab}	53,28 ± 1,67^{ab}	51,30 ± 1,64^{b}
n-3	3,83 ± 0,92^{b}	4,82 ± 0,47^{ab}	4,66 ± 0,74^{ab}	7,00 ± 0,97^{a}
n-6	14,19 ± 1,57	13,71 ± 0,98	17,55 ± 0,35	15,28 ± 1,08

Los porcentajes están representados como $\bar{X}$ ± SEM. *Los valores con diferente letra en la misma fila difieren significativamente (P<0,05).*

***Tabla 2**. Cabras prepúberes. Porcentaje de ácidos grasos en líquido folicular en las diferentes estaciones del año.*

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Mirístico (C14:0)	1,57 ± 0,07^{b}	1,68 ± 0,05^{ab}	1,74 ± 0,^{ab}	2,00 ±0,06^{a}
Palmítico (C16:0)	23,40 ± 0,30	23,14 ± 0,37	23,02 ± 0,17	24,21 ± 0,37
Esteárico (C18:0)	17,28 ± 0,38	16,40 ± 0,48	16,18 ± 0,51	16,01 ± 0,58
Oleico (C18:1n9)	27,30 ± 0,62	28,12 ± 0,05	28,01 ± 0,60	26,70 ± 0,11
Linoleico (C18:2n6)	12,49 ± 0,62^{ab}	11,85 ± 0,50^{ab}	13,08 ± 0,31^{a}	10,67 ± 0,61^{b}
Araquidónico (C20:4n6)	8,46 ± 0,49	9,22 ± 0,46	9,89 ± 0,50	9,15 ± 0,67
MUFAs	31,68 ± 0,69	32,27 ± 0,17	33,07 ± 0,71	32,04 ± 0,27
PUFAs	25,11 ± 0,54	24,90 ± 0,17	25,24 ± 0,21	24,75 ± 0,13
SFA	43,21 ± 0,15^{a}	42,21 ± 0,24^{ab}	41,69 ± 0,61^{b}	43,22 ± 0,20^{a}
n-3	4,16 ± 0,32^{a}	3,83 ± 0,48^{a}	2,27 ±0,23^{b}	4,93 ±0,15^{a}
n-6	20,95 ± 0,44^{b}	21,07 ± 0,60^{b}	22,97 ± 0,30^{a}	19,82 ± 0,11^{b}

Los porcentajes están representados como $\bar{X}$ ± SEM. *Los valores con diferente letra en la misma fila difieren significativamente (P<0,05).*

FATTY ACID COMPOSITION IN FOLLICULAR FLUID OF ADULT AND PREPUBERTAL GOATS AND ITS EFFECT ON *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION (IVEP) AND DIET

ABSTRACT: The aim of this study was to analyse the fatty acid (FA) composition in follicular fluid (FF) of prepubertal and adult goats during different seasons in order to find a relationship with oocyte quality and the diet. FF was recovered by LOPU from adult goats and by follicular aspiration of ovaries from suckling prepubertal goats. FF was frozen (-80ºC) and analysed by gas chromatography. The main FAs found in FF in both ages were palmitic, stearic, oleic and linoleic acids, which are different from FAs of goat milk. FF of adult goats showed seasonal variation although they were fed with the same diet all year. In our previous studies, we observed lower percentage of blastocysts produced *in vitro* in autumn (4.7 %) than in winter (15.8 %) in prepubertal goat oocytes. FF presented lower n-3 FA (2 % vs. 5 %) and higher n-6 FA (23 % vs. 20 %) in autumn than in winter. n-3 was low in milk in both seasons. In conclusion, the percentage of n-3 and n-6 can explain some differences in oocyte competence of prepubertal goats. FF composition of adult goat ovaries has some variation according to the season that is not explained by the diet.

Keywords: goats, fatty acids, oocytes, IVEP.