

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL
CUSCO**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**



TESIS

**DETERMINACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO
EPIDERMAL (EGF) E INSULÍNICO (IGF) EN EL LÍQUIDO
FOLICULAR OVÁRICO DE ALPACAS**

Presentado por el Bachiller en Medicina Veterinaria:

JUAN HILARIO VALLADARES QUISPE

Para optar el título Profesional de **MÉDICO VETERINARIO**

ASESORES:

PhD. PEDRO WALTER BRAVO MATHEUS

MSc. GUIULFO DURIEL MAMANI MANGO

**Financiada por el:
Programa “YACHAYNINCHIS WIÑARINANPAQ” - UNSAAC**

Cusco - Perú
2023

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, **Asesor** del trabajo de investigación/tesis titulada: *Determinación de factores de crecimiento epidermal (EGF) e insulínico (IGF) en el líquido folicular ovárico de alpacas*
presentado por: *Juan Hilario Valladares Quipe* con DNI Nro.: *48087169*
presentado por: con DNI Nro.:
para optar el título profesional/grado académico de *Médico Veterinario*

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por *1* veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de *9*%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, *12* de *Enero* de 2024

Walter Bravo M
Firma

Post firma *Pedro Walter Bravo Matheis*

Nro. de DNI *23954705*

ORCID del Asesor *0000-0003-4141-3066 / 0000-0002-4257-9394*

Segundo Asesor DNI: *41061125*

Se adjunta: *Segundo Asesor* ORCID: *0000-0001-8109-7702*

- Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
- Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: *pid: 27259:303996359*

NOMBRE DEL TRABAJO

DETERMINACION DE FACTORES DE CRECIMIENTO EPIDERMAL(EGF) E INSULINICO (IGF) EN EL LÍQUIDO FOLICULAR O

AUTOR

Juan Valladares

RECUENTO DE PALABRAS

23838 Words

RECUENTO DE CARACTERES

137489 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

105 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

3.3MB

FECHA DE ENTREGA

Jan 12, 2024 8:46 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Jan 12, 2024 8:48 AM GMT-5**● 9% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 9% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 0% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Base de datos de trabajos entregados
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 20 palabras)
- Material bibliográfico
- Material citado

DEDICATORIA

A mi madre que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores lo cual me ha ayudado a seguir adelante en los momentos difíciles.

A mi padre sé que desde el cielo me ilumina para seguir adelante con mis proyectos.

A mis hermanos y Maribel que siempre me dieron su voz de aliento y me apoyaron para no rendirme y seguir adelante.

A todos ellos,

Muchas gracias de todo corazón.

AGRADECIMIENTO

Agradecer a mis asesores PhD. Pedro Walter Bravo Matheus y Mg. Sc. Guiulfo Duriel Mamani Mango, por sus esfuerzos y dedicación. Brindándome sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, paciencia y su motivación han sido fundamentales para mí y la culminación de mi tesis.

Agradecer al Ing Zootecnista José Becerra C., MVZ Nilton Cárdenas S., Ing Zootecnista Aydee Meza, Sr Benito J, Sr Fortunato C, Sr Efrain A, Sr Jose N.

y todos los trabajadores del Centro Experimental “La Raya” UNSAAC, por el apoyo y las facilidades brindadas en mi estadía.

Y por último agradecer a mis compañeros Neyda, Juan Carlos, Victor y Cendy.

A todos ellos.

Muchas gracias de todo corazón.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCION	1
CAPÍTULO I.....	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1 Desarrollo del problema.....	2
1.1 Pregunta de Investigación	3
1.1.1 Problemas específicos	3
CAPÍTULO II	4
OBJETIVOS Y JUSTIFICACION	4
2 Objetivo general.....	4
2.1 Objetivos específicos	4
2.2 Justificación de la investigación	4
CAPÍTULO III.....	6
HIPOTESIS.....	6
3 Hipótesis de Investigación.....	6
3.1 Hipótesis alterna.....	6
3.2 Hipótesis nula.....	6
CAPITULO IV	7
MARCO TEORICO	7
4 Antecedentes de la investigación.....	7
4.1 Antecedentes internacionales.....	7
4.2 Revisión bibliográfica.....	10
4.2.1 Pubertad en la alpaca	10
4.2.2 Foliculogénesis	10
4.2.2.1 Control hormonal gonadotrópico de la foliculogénesis	11
4.2.3 Fases del desarrollo folicular	14
4.2.3.1 Folículo primordial	14
4.2.3.2 Folículo primario	14
4.2.3.3 Folículo secundario.....	15
4.2.3.4 Folículo terciario o pre-antral	15
4.2.3.5 Folículo antral o folículo de Graff	16

4.2.4 Dinámica folicular	17
4.2.4.1 Reclutamiento folicular.....	17
4.2.4.2 Selección folicular	18
4.2.4.3 Dominancia del folículo.....	19
4.2.4.4 Divergencia del folículo.....	20
4.2.5 Ondas foliculares en alpacas	21
4.2.6 Líquido folicular	23
4.2.6.1 Origen del líquido folicular.....	24
4.2.6.2 Características bioquímicas del líquido folicular.....	24
4.2.6.3 Proteínas del líquido folicular.....	25
4.2.7 La barrera hemato-folicular	27
4.2.8 Factores de crecimiento (FC).....	28
4.2.8.1 Factor de crecimiento epidermal (EGF)	31
4.2.8.2 Factor de crecimiento tipo insulínico (IGF).....	35
4.2.9 Análisis de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA)	42
4.2.9.1 Pruebas de análisis de inmunoadsorción ligada a enzimas en microplaca.....	42
4.2.9.2 Técnica de ELISA Tipo Sándwich	42
CAPÍTULO V	43
MATERIALES Y METODOS	43
5 Materiales.....	43
5.1 Materiales de campo	43
5.2 Material biológico.....	43
5.3 Material de laboratorio.....	43
5.4 Material de oficina	44
5.5 Equipos.....	44
5.6 Metodología	45
5.6.1 Metodología de campo.....	45
5.6.1.1 Metodología ecográfica	45
5.6.2 Metodología en laboratorio.....	47
5.6.2.1 Análisis de concentración de factores de crecimiento epidermal e insulínico.....	47
a. Preparación de reactivos para EGF	47
5.6.2.2 Procedimiento de ELISA tipo sándwich para EGF	49
b. Preparación de reactivos para IGF-I	52
5.6.2.3 Procedimiento de ELISA tipo sándwich IGF-I.....	53

5.7 Diseño Experimental.....	56
5.7.1 Análisis estadístico de datos	56
CAPITULO VI.....	57
RESULTADOS Y DISCUSION	57
6 Resultados.....	57
6.1 Resultados EGF	57
6.2 Resultados IGF-I.....	58
6.3 Discusión.....	59
6.3.1 Determinar la concentración de EGF en el líquido folicular de folículos pequeños (4-5mm), folículos ovulatorios (7-10mm) y folículos en regresión (12-6mm)	59
6.3.2 Determinar la concentración de IGF-I en el líquido folicular de folículos pequeños (4-5mm), folículos ovulatorios (7-10mm) y folículos en regresión (12-6mm)	61
CAPÍTULO VII	64
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	64
7 Conclusiones.....	64
7.1 Recomendaciones	64
CAPÍTULO VIII.....	65
BIBLIOGRAFIA	65
CAPITULO IX.....	79
ANEXOS.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia de la foliculogénesis presentando las diferentes estructuras que podemos encontrar en cada fase	17
Figura 2. La secuencia esquemática de eventos durante el mecanismo de selección del folículo en ganado y caballos	19
Figura 3. Oleada folicular y relación de los niveles de FSH, estradiol y LH	21
Figura 4. Ciclo folicular de la alpaca.....	22
Figura 5. Dibujo que ilustra las rutas que puede tomar el líquido desde el capilar tecal hasta el líquido folicular y las posibles barreras del endotelio	28
Figura 6. Secuencia de aminoácidos y ubicación de los enlaces disulfuro del EGF del ratón	32
Figura 7. Maduración periovulatoria final del ovocito	33
Figura 8. El sistema factor de crecimiento epidérmico EGF intraovárico.....	34
Figura 9. Liberación de IGF-I por el hígado y transporte hacia el ovario	36
Figura 10. Secuencia de aminoácidos de IGF-I.....	38
Figura 11. Secuencia sugerida de eventos durante la selección del folículo dominante en el bovino	40
Figura 12. El factor de crecimiento insulínico tipo I IGF-I intraovárico.....	41
Figura 13. Dilucion de las muestras estándar EGF.....	48
Figura 14. Regresión lineal simple EGF.....	51
Figura 15. Dilucion de las muestras estándar IGF-1	52
Figura 16. Regresión lineal simple IGF-I	55
Figura 17. Concentración de EGF en los tres diferentes tiempos del desarrollo folicular ovárico de alpacas	58
Figura 18. Concentración de IGF-I en los tres diferentes tiempos del desarrollo folicular ovárico de alpacas	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Acción de los factores de crecimiento In vitro sobre la proliferación y la diferenciación de las células foliculares en mamíferos	29
Tabla 2. Concentración de los estándares EGF.....	50
Tabla 3. Concentración de los estándares IGF-I.....	55
Tabla 4. Concentración de EGF en el líquido folicular ovárico de alpaca en folículos pequeños, ovulatorios y regresión.....	57
Tabla 5. Concentración de IGF-I en el líquido folicular ovárico de alpaca en folículos pequeños, ovulatorios y regresión.....	58

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Ubicación de muestras en los pocillos de EGF.....	49
Ilustración 3. Ubicación de muestras en los pocillos de IGF	53

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Selección de animales para estudio.....	79
Anexo 2. Grupo de estudio en pastoreo.....	80
Anexo 3 . Lista de alpacas para estudio.....	81
Anexo 4 . Seguimiento ecográfico transrectal.....	82
Anexo 5. Ecografía de los tamaños foliculares	83
Anexo 6. Proceso para la obtención de líquido folicular ovárico.....	84
Anexo 7 . Ficha de seguimiento del crecimiento folicular	85
Anexo 8. Muestras y reactivos.....	86
Anexo 9 . Pocillos y estándares	86
Anexo 10 . Procedimientos del protocolo de los kits	86
Anexo 11. Procedimientos del protocolo de los kits ELISA	87
Anexo 12. Procedimientos del protocolo de los kits ELISA	87
Anexo 13. Cálculo de la concentración de EGF e IGF-I en la ecuación de regresión simple en folículos pequeños (4-5mm)	88
Anexo 14. Cálculo de la concentración de EGF e IGF-I en la ecuación de regresión simple en folículos ovulatorios (7-10mm)	88
Anexo 15. Cálculo de la concentración de EGF e IGF-I en la ecuación de regresión simple en folículos en regresión (12 -6 mm).....	89
Anexo 16. Tabla de análisis de varianza para EGF	89
Anexo 17. Método de Tukey para EGF.....	89
Anexo 18. Test de normalidad Shapiro-Wilk EGF	90
Anexo 19. Tabla de análisis de varianza para IGF-I	90
Anexo 20. Método de Tukey para IGF-I	90
Anexo 21. Test de normalidad Shapiro-Wilk IGF-I.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

NCSS:	Number Crunching Statistical System
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
IGF-I:	Factor de crecimiento insulínico tipo I
FC:	Factor de crecimiento
LH:	Hormona luteinizante
FSH:	Hormona folículo estimulante
E₂:	Estradiol
P₄:	Progesterona
LF:	Líquido folicular
GnRH:	Hormona liberadora de gonadotropinas
GH:	Hormona del crecimiento
PAPP-A:	Proteína plasmática asociada a la preñez
cGMP:	Guanosin monofosfato cíclico
IGFBPs:	Proteínas de unión de factor de crecimiento tipo insulínico
RIA:	Radioinmunoensayo
ST:	Somatotropina

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la concentración del factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) del líquido folicular ovárico de alpacas, en diferentes fases del desarrollo folicular. Se utilizaron 15 alpacas hembras en etapa reproductiva a las que se realizó seguimientos ecográficos de los ovarios dos veces por semana durante 15 días. Se obtuvo los ovarios de cinco alpacas con tamaños foliculares 4 – 5mm, cinco alpacas con tamaños foliculares 7 – 10mm y cinco alpacas con tamaños foliculares en regresión 12 – 6mm. Para posteriormente aspirar el líquido folicular y almacenarlo a -20 °C, hasta su análisis con los kits ELISA EGF de ratón e IGF-I de humano de los fabricantes Sigma-Aldrich. Las concentraciones de EGF de acuerdo al tamaño fueron 3.9, 3.7 y 0.9 pg/mL. en folículos pequeños, ovulatorios y en regresión, respectivamente. Las concentraciones de IGF-I fueron 1.3, 1.3 y 1.5 ng/mL para folículos pequeños, ovulatorios y en regresión, respectivamente. Se concluye que para EGF existe una concentración mayor en folículos pequeños sin mucha diferencia con folículos ovulatorios, pero existiendo diferencia significativa con folículos en regresión y para IGF-I no existe diferencia significativa entre los tamaños foliculares.

Palabras clave: factor de crecimiento, epidérmico, insulínico, folículo antral, dinámica folicular, alpaca Huacaya,

ABSTRACT

The concentrations of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor type I (IGFI) were determined in alpacas ovarian follicular fluid of different phases of follicular development. Fifteen female alpacas were ultrasounded to determine small follicles (4 – 5 mm), ovulatory-sized follicles (7-10 mm) and regressing follicles (12 – 6 mm). Five alpacas of each group were slaughtered to collect follicular fluid. Samples were stored at -20 °C, until analysis with commercial EGF and IGF-I by ELISA method. The EGF concentrations were different ($P < 0.05$) being 3.9, 3.7 and 0.9 pg/mL. for small, ovulatory, and regressing follicles, respectively. The IGFI concentrations were not different ($P > 0.05$) being 1.3, 1.3, and 1.5 ng/mL for small, ovulatory, and regressing follicles, respectively. In conclusion, EGF varied according to ovarian follicle size, and IGF-I did not vary for ovarian follicle size.

Keywords: growth factor, epidermal, insulin, antral follicle, Alpaca.

INTRODUCCION

La dinámica folicular de los ovarios se encuentra regulada por ciertas señales endocrinas como pueden ser de gonadotropinas y esteroides ováricos, como también de hormonas peptídicas producidas localmente en el ovario y de ciertos factores de crecimiento (Espinoza et al., 2007). Asimismo, a nivel folicular la acción de las gonadotropinas se regula por factores de crecimiento (FC), que son secretados localmente y actúan de forma autocrina y paracrina (Bever., 1997). El factor de crecimiento epidérmico (EGF) ha sido localizado en folículos preantrales y antrales pequeños de hámster (Hammond et al., 1988).

Los FC estimulan la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y la proliferación de células de la granulosa en las cerdas también inhiben su diferenciación, al mismo tiempo que acortan el tiempo necesario para la ruptura de la vesícula germinal, lo que favorece la recuperación de la meiosis (May et al., 1988). Se reportó que las células del cúmulus y de la granulosa poseen receptores para EGF (Feng et al., 1987). El EGF intrafolicular se puede considerar como un factor de proliferación las células de la granulosa (Bendell & Dorrington, 1990). El factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF -I) es uno de los FC más importantes en la fisiología ovárica y controla la foliculogénesis *in vivo* (Monget & Monniaux, 1995). En alpacas no se encontró referencia alguna respecto a los niveles de factores de crecimiento en el líquido folicular ovárico, en tal virtud el objetivo de investigación fue determinar la concentración de los factores de crecimiento epidermal (EGF) e insulínico (IGF) del líquido folicular ovárico de alpacas en diferentes fases de desarrollo folicular.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1 Desarrollo del problema

La presente investigación surge a través de la observación de diferentes proyectos que se realizan en alpacas sobre las biotecnologías de reproducción, algunas de estas biotecnologías recién se están investigando e implementando en el cual existen algunas ramas que necesitan ser investigadas, como la concentración de EGF e IGF-I en el líquido folicular ovárico. El funcionamiento de los FC es importante en varios procesos reproductivos ya que generan un efecto sinérgico con otras hormonas reproductivas. En el avance de su identificación, estructura química, actividad biológica y mecanismo de acción, se ha determinado que tienen funciones tan importantes y complejas como las gonadotropinas y otras hormonas que interfieren en la reproducción (Peña et al., 2007).

La foliculogénesis ovárica se produce bajo la influencia de factores intraováricos (Field et al., 2014), como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I), que participan en la maduración nuclear de los ovocitos y expansión de células del cúmulo (Li et al., 2016), y que actúan sobre las células foliculares y aumentan la esteroidogénesis a través de la regulación y actividad de las enzimas esteroidogénicas (Salazar et al., 2014). La calidad de los gametos es uno de los muchos factores que intervienen en el éxito o el fracaso de la fertilización *in vitro* (FIV) (Scheffler et al., 2021). Así la calidad de los ovocitos contribuye al desarrollo de un embrión óptimo y, por lo tanto, a una gestación exitosa (Ebner et al., 2006). En consecuencia, en otras especies se han investigado factores en el líquido folicular (LF) que probablemente afecten la capacidad de desarrollo de los ovocitos (Revelli et al., 2009). Sin embargo, en alpacas aún no se conoce las concentraciones de estos factores.

1.1 Pregunta de Investigación

¿Cuál es la concentración de EGF e IGF-I en el líquido folicular ovárico de folículos pequeños, ovulatorios y en regresión de la alpaca?

1.1.1 Problemas específicos

¿Cuál es la concentración de EGF en el líquido folicular de folículos pequeños (4-5mm), folículos ovulatorios (7-10mm) y folículos en regresión (12-6mm)?

¿Cuál es la concentración de IGF-I en el líquido folicular de folículos pequeños (4-5mm), folículos ovulatorios (7-10mm) y folículos en regresión (12-6mm)?

CAPÍTULO II

OBJETIVOS Y JUSTIFICACION

2 Objetivo general

Determinar la concentración de EGF e IGF-I, en el líquido folicular ovárico de folículos pequeños, ovulatorios y folículos en regresión de la alpaca

2.1 Objetivos específicos

Determinar la concentración de EGF en el líquido folicular de folículos pequeños (4-5mm), folículos ovulatorios (7-10mm) y folículos en regresión (12-6mm).

Determinar la concentración de IGF-I en el líquido folicular de folículos pequeños (4-5mm), folículos ovulatorios (7-10mm) y folículos en regresión (12-6mm).

2.2 Justificación de la investigación

El líquido folicular es un elemento vital y dinámico del folículo ovárico que se encuentra muy cerca del ovocito en desarrollo, posee componentes que ayudan principalmente en el crecimiento y maduración de las células foliculares y de ovocitos, además de protegerlas del daño físico y estrés oxidativo. Por lo tanto, el conocimiento de las proteínas del líquido folicular podría proporcionar información sobre el microambiente folicular y mejorar nuestra comprensión de los procesos que median la foliculogénesis (Ambekar et al., 2013).

Los componentes principales de líquido folicular incluyen carbohidratos, péptidos, hormonas, factores de crecimiento, etc. (Nandi et al., 2007; Revelli et al., 2009). Aunque no se comprende completamente hasta qué punto estos componentes y otras sustancias desconocidas en líquido folicular afectan la maduración de los ovocitos, los estudios han demostrado que la composición de líquido folicular es bastante diferente entre animales prepúberes y adultos (Warzych et al., 2016; Wu et al., 2017) y cada vez es más evidente que los FC y sus proteínas de

unión ejercen un papel modulador clave en el crecimiento folicular, la maduración y la atresia. Es probable que los FC sean determinantes para el desarrollo de los folículos pequeños antes de que se conviertan en dependientes de las gonadotropinas, pero aún está por determinar si desempeñan papeles esenciales, limitantes o sólo permisivos en el desarrollo de los folículos dependientes de gonadotropinas. La comprensión de la función de los FC en la foliculogénesis puede tener importantes consecuencias prácticas (Gong et al., 1993). La suplementación del medio de maduración con EGF e IGF-I favorece la maduración in vitro de ovocitos, también favorece la producción in vitro de mayor cantidad de embriones de alpaca. Existe escasa información sobre la presencia de FC en los folículos ováricos de alpacas (Guillén., 2018).

CAPÍTULO III

HIPOTESIS

3 Hipótesis de Investigación

La concentración de los factores de crecimiento EGF e IGF-I en el líquido folicular ovárico de alpacas, es diferente en cada tamaño folicular.

3.1 Hipótesis alterna

Ha: Existen diferencias significativas en la concentración de EGF e IGF-I en el líquido folicular ovárico de folículos pequeños, ovulatorios y regresión.

3.2 Hipótesis nula

Ho: No existe diferencia significativa en la concentración de EGF e IGF-I en el líquido folicular ovárico de folículos pequeños, ovulatorios y regresión.

CAPITULO IV

MARCO TEORICO

4 Antecedentes de la investigación

4.1 Antecedentes internacionales

Las concentraciones del factor de crecimiento epidérmico EGF en líquido folicular ovárico los cuales fueron recolectados del camal, el EGF fue determinado mediante la técnica de radio inmunoensayo (RIA). Las concentraciones de EGF en porcinos fueron mayores en folículos pequeños (1-2mm) con una concentración de 13.6 ng/mL, medianos (3-6mm) con una concentración de 5.9 ng/mL y grandes (> 6mm) una concentración de 5.8 ng/mL. Se concluyó que el EGF podría funcionar como reguladores ováricos locales (Hsu et al., 1987). De igual manera se estudiaron el EGF en líquido folicular ovárico preovulatorios (14-26mm) de mujeres, el líquido folicular se obtuvo por aspiración ecoguiada y el EGF fue determinado por la técnica de RIA, con una concentración de 0.60 y 2.42 ng/mL. Se concluyó que el EGF en líquido folicular de folículos preovulatorios no está implicado en la regulación local del folículo, sin embargo, no se excluye el papel autocrino y paracrino del EGF en folículos pequeños (Westergaard & Andersen, 1989). Igualmente, en líquido folicular de folículos (>10 mm) en mujeres el líquido folicular fue obtenido por aspiración ecoguiada y se determinó el EGF por la técnica de inmunoensayo ligado a enzimas tipo sándwich, se encontró una concentración media de EGF 4.6 pg/mL (Inoue et al., 2009).

Se estudiaron los niveles de IGF-I y proteínas de unión a IGF (IGFBPs) en el líquido folicular ovino (2-8 mm) y luego clasificados por diferentes tamaños como pequeños (<3.5mm), medianos (4-5 mm), grandes (>5.5 mm) y atrésicos, el líquido folicular se obtuvo de ovarios obtenidos mediante ovariectomía y luego se aspiraron el líquido folicular, el IGF-I fue determinado mediante la técnica de RIA. Las concentraciones eran de 250 ng/ml en general, por clasificación

fueron en pequeños 252 ng/mL, en medianos 252 ng/mL, en grande 244 ng/mL, en atrésicos grandes 286 ng/mL y en atrésicos medianos 223 ng/mL. Estas concentraciones no variaron significativamente con el tamaño ya que los niveles de IGF-I fueron bajos en folículo grande se concluyó que el crecimiento folicular y la atresia en ovejas están determinadas menos por los cambios en los niveles de IGF-I que por los cambios en IGFbps. Estos cambios en los niveles de IGFbp serían el resultado más de actividades paracrinas que endocrinas y probablemente juegan un papel importante en la modulación de las acciones de los IGF sobre el desarrollo folicular y la atresia (Monget et al., 1993).

De igual manera se estudiaron las concentraciones de IGF-I en el líquido folicular de bovinos de carne, los folículos se clasificaron por diferentes tamaños pequeños (≤ 4 mm), medianos (5-7 mm), grandes (≥ 8 mm) y folículos atrésicos (≥ 8 mm). Los folículos se obtuvieron sincronizando las vacas y posteriormente fueron sacrificadas y recuperaron los ovarios y luego aspiraron el líquido folicular. El IGF fue determinado mediante la técnica de RIA. Se reportaron concentraciones en pequeños de 53.9 ng/mL, en medianos de 57.9 ng/mL, en grandes de 66 ng/mL y en folículos atrésicos grandes de 46.6 ng/mL. Se concluyó que las concentraciones de IGF-I fueron más altas en folículos grandes que en líquido folicular de folículos pequeños, medianos y atrésicos grandes (Echternkamp et al., 1994). Igualmente, estudios realizados en bovinos lecheros donde clasificaron los folículos por tamaños y en cuatro grupos, folículos pequeños (< 8.5 mm con una media de 7.42 mm), folículo dominante (≥ 8.5 mm con una media de 13.5 mm), folículos preovulatorios (≥ 8.5 mm con una media de 16.8 mm) y folículo en regresión (≥ 8.5 mm con una media de 13.6 mm). El líquido folicular se obtuvo de ovarios de camal, el IGF-I fue determinado mediante PCR cuantitativo y encontraron las siguientes concentraciones libres 3.2 ng/mL, 4.8 ng/mL, 5.9 ng/ml y 2.9 ng/mL de acuerdo al tamaño folicular. Se concluyó que la concentración

de IGF-I libre en folículos preovulatorios fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que en folículos en regresión (Sudo et al., 2007)

Como también estudios realizados en yeguas, señalan concentraciones de IGF-I en el líquido folicular ovárico durante su desarrollo folicular. En diferentes tamaños foliculares pequeños (6-15 mm), medianos (16-25 mm), grandes (> 25 mm) recolectaron el líquido folicular de camal, el IGF-I fue determinado mediante la técnica de RIA, las concentraciones fueron 1.6 ng/mL, 1.9 ng/mL, 25.1 ng/mL, respectivamente. Se concluyó que las concentraciones de IGF-I fueron mayores en folículos grandes ya que la concentración alta de IGF-I biodisponible en folículos grandes es asociado con un aumento de la esteroidogénesis (Spicer et al., 2005)

De igual manera se reportó en folículos en estro tardío y celo temprano. Los folículos fueron detectados mediante ecografía y palpación luego que tuvieran el tamaño preovulatorio (30.5 – 38mm) se realizó la ovariectomía para obtener el ovario y aspiración del líquido folicular, el IGF-I fue determinado mediante la técnica de RIA. Las concentraciones en estro tardío con folículos de 38 mm fueron de 401 ng/mL y en estro temprano en folículos de 30.5 mm fueron de 442 ng/mL. La concentración de IGF-I no fue diferente durante el celo, aunque en otras especies las concentraciones de IGF-I folicular se asoció al aumento de tamaño (Spicer et al., 1991)

Así también, en porcinos determinaron la concentración de IGF- I en el líquido folicular ovárico de folículos pequeños (1 – 3mm) y preovulatorios (> 6 mm) el líquido folicular lo obtuvieron de ovarios de camal. El IGF-I fue determinado mediante la técnica de RIA. La concentración de IGF-I fueron de 63 ng/mL y 104 ng/mL para folículos pequeños y preovulatorios, respectivamente. En el cual la concentración de folículos preovulatorios fue significativamente mayor a los folículos inmaduros. (Hammond et al., 1985).

4.2 Revisión bibliográfica

4.2.1 Pubertad en la alpaca

La pubertad en las alpacas comienza a los doce meses mostrando una conducta sexual muy similar a las hembras de dos o más años de edad (Bustinza, 2001). La aparición de la pubertad es regulada por el sistema nervioso central (SNC) mediante la síntesis y secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo. En la etapa prepúber, la secreción y acción de la GnRH se encuentra limitada a consecuencia de la elevada sensibilidad del hipotálamo hacia el efecto inhibitor (retroalimentación negativa) el cual se dará por la baja concentración de estrógenos que secreta el ovario prepúber. Para el comienzo de la pubertad en las hembras, el hipotálamo comienza a secretar GnRH, que a su vez estimula la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) la cual hace que folículos preantrales se transformen en folículos antrales. Este efecto positivo estimula el aumento de LH necesario para desencadenar la ovulación y luteinización del folículo, estimulando la actividad cíclica de los ovarios. La retroalimentación positiva se establece gradualmente durante el periodo de transición de la pubertad (García et al., 2018).

4.2.2 Foliculogénesis

El folículo es la unidad estructural y funcional del ovario, está compuesto por una célula gamética inmadura (ovocitos), rodeadas de células diploides llamadas de la granulosa además por fuera de estas, se encuentran las células de la teca que también son diploides (Gigli et al., 2006; Hutt & Albertini, 2007). Este proceso de foliculogénesis comienza inmediatamente después de que los primeros folículos se forman, y continúa hasta el final del periodo reproductivo (12-18 años en alpacas), incluido en la preñez y la lactancia (Adams et al., 1990). Teniendo las siguientes fases. formación, crecimiento y diferenciación folicular, engloba desde folículo primordial hasta

el de folículo preovulatorio (Gigli et al., 2006). La finalidad del proceso es la producción de un folículo maduro (Combelles, 2013). El desarrollo del folículo, en su etapa más temprana, siempre se ha considerado como una gonadotropina independiente, impulsada principalmente por factores secretores locales. Cuando el folículo alcanza la fase del pre-antral, su desarrollo y progresión a la fase antral temprana todavía depende principalmente de factores intraovaricos, el folículo expresa una respuesta funcional de receptor FSH y LH, y es capaz de responder a las gonadotropinas, lo cual ha sido probada *in vivo* e *in vitro* (Sánchez & Smitz, 2012). El paso de folículo primordial a folículo preantral involucra crecimiento celular, proliferación y diferenciación (Braw-Tal, 2002).

4.2.2.1 Control hormonal gonadotrópico de la foliculogénesis

En mamíferos, el factor liberador de GnRH se secreta en el sistema portal hipotálamo-hipofisario de manera pulsátil para estimular la liberación episódica de gonadotropinas en la circulación sistémica (Aba, 1995). Los aumentos periódicos de FSH y la liberación pulsátil de LH responsables de la aparición de ondas de folículos. En las alpacas y llamas existe una relación positiva significativa entre el tamaño del folículo y las concentraciones de estrógeno. El folículo emergente sintetiza y secreta aumentando niveles de estradiol durante la fase de crecimiento es máximo justo antes de que se alcance la meseta de crecimiento del folículo y luego baja durante la atresia, mientras no exista ovulación (Bravo et al., 1990; Aba et al., 1995; Chaves et al., 2002). En el proceso de diferenciación folicular, existe una mayor producción de inhibina por el folículo que está en proceso de maduración y por ende las concentraciones de FSH disminuyen (Donadeu & Ginther, 2002). Los receptores se expresan para LH como LHr y son detectados en las células de la granulosa en folículos de 8 mm y estos aumentan a medida que el folículo sigue desarrollándose. No se encuentra LHr en folículos subordinados menores a 8 mm ya que estos

dependen de FSH y tienen receptores FSHr estos subordinados a medida que van desarrollando adquieren LHr (Beg et al., 2002; Beg & Ginther, 2006; Gigli et al., 2006)

4.2.2.1.1 Formación de folículos dependientes de gonadotropinas

La maduración de los folículos ováricos a un estado preovulatorio abarca no sólo un incremento rápido de la proliferación de células de la granulosa contenidas en el folículo, sino también la diferenciación celular. Como consecuencia, el folículo desarrolla un antro lleno de líquido (Rodgers & Irving-Rodgers, 2010). En los folículos secundarios comienza a formarse un espacio lleno de líquido, el antro folicular, de ese modo se convierten en folículos terciarios. Con la utilización de otra nomenclatura, la formación del antro marca la transición entre folículos preantrales (sin antro) y folículos antrales (con antro). En algún momento de esta transición entre folículo secundario y terciario, también aparece la dependencia de los folículos hacia las gonadotropinas por lo que solo pueden seguir creciendo en presencia de las gonadotropinas. En el bovino y en otras especies, los folículos antrales se han dividido en folículos antrales pequeños, medianos y grandes. Aunque todos ellos tienen un antro folicular, dependiendo de su grado de desarrollo requieren de diferentes concentraciones de gonadotropinas para continuar creciendo. Los folículos antrales más pequeños solamente requieren de concentraciones basales de FSH y LH, por lo que pueden continuar creciendo en cualquier momento del ciclo estral e incluso en animales que no están ciclando (hembras en anestro prepuberal, gestacional, lactacional, estacional). En etapas posteriores los folículos antrales requerirán primero de concentraciones elevadas de FSH, y en sus etapas finales solamente podrán continuar creciendo en la presencia de pulsos frecuentes de LH, por lo que solo los folículos que encuentren concentraciones apropiadas de estas hormonas podrán seguir creciendo. Un folículo que llegue al estado de máximo desarrollo, conocido como folículo preovulatorio, al final, solamente llegará a ovular al ser expuesto a un pico

preovulatorio de LH (Rangel et al., 2018). El aumento de la producción de estrógenos que resulta en gran medida debido a la expresión de la proteína P-450 aromatasa (aromatasa), enzima que convierte la testosterona a estrógenos; aumento de la expresión de deshidrogenasa 3 β -hidroxiesteroide involucrada en la transformación de colesterol en pregnenolona y aumento de la expresión de receptores de membrana para la (LH) necesario para la ovulación (Park et al., 2004).

4.2.2.1.2 Crecimiento de folículos independientes de gonadotropinas

Desde la etapa temprana del desarrollo folicular hasta la etapa folicular pre-antral, parece estar impulsado por señales intraováricas e independientes de una estimulación de gonadotropinas. Existe una estrecha comunicación dentro del ovario entre oocitos, granulosa y células de la teca (Parker & Schimmer, 2006). Asimismo, además de las gonadotropinas existen otros factores que pueden intervenir en la regulación del desarrollo folicular y de la ciclicidad. Entre dichos factores se encuentran la insulina, el factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I) y la hormona de crecimiento (GH). La IGF-I es secretada principalmente por el hígado en respuesta a la estimulación de la GH y se piensa que regula gran parte de las acciones de la misma, de modo que cuando se administra GH, las concentraciones de insulina e IGF-I se incrementan y se observa un aumento en el número de folículos ováricos en cerdos, bovinos, caprinos y ovinos. El IGF-I, asimismo, modula la secreción de la GH por un efecto de retroalimentación negativa, por lo que, en el posparto temprano, cuando el animal está en balance energético negativo, las concentraciones de insulina e IGF-I descienden, mientras que las de GH aumentan. La insulina y el IGF-I estimulan la proliferación y esteroidogénesis de las células de la granulosa y la teca en el folículo (Rangel et al., 2018). Los principales procesos implicados en el crecimiento y diferenciación del folículo ovulatorio a lo largo de la fase dependiente de gonadotropinas a partir de 2 mm en ovinos, humanos y 3 mm en bovinos. Durante la fase de reclutamiento para la selección de 2 a 4 mm y de 2 a 8 mm

en ovejas y humanos, respectivamente, la gonadotropina clave es la FSH que induce la actividad de la aromatasas en las células de la granulosa esta acción de FSH es potencializada por una acción autocrina de activina producida por las células de la granulosa (Driancourt & Thuel, 1998).

4.2.3 Fases del desarrollo folicular

4.2.3.1 Folículo primordial

Los primeros folículos primordiales se detectan en los roedores 2-4 días postparto (Sforza & Forabosco, 1998). En bovinos, el pool de folículos primordiales es establecido durante el segundo trimestre de gestación (Kunwar et al., 2006). En el ovario, los gametos son almacenados en forma de folículos primordiales, que se encuentran compuestos por pequeños ovocitos y están rodeados por una sola capa de células de la granulosa y una membrana basal (Gilbert, 2005; Hutt et al., 2007).

4.2.3.1.1 Activación de folículos primordiales

Los folículos primordiales se activan estando en reposo y pasan a una fase de crecimiento que está caracterizada por dos fases consecutivas: (I) la proliferación y cambio de forma de las células granulosas (de planas a cuboides) y (II) El aumento en el diámetro del oocito (Braw-Tal, 2002). La proliferación y transformación de planas a cuboidales de las células pregranulosas está regulada por factores que se considera como posibles promotores de la activación de folículos primordiales ya que es necesario que para el inicio del crecimiento de los ovocitos deberá existir células de la granulosa cuboidales (Braw-Tal, 2002).

4.2.3.2 Folículo primario

Las células planas de la granulosa al empezar su división por mitosis se diferencian en una capa de células cúbicas que rodeará al ovocito I. Cuando sucede este proceso en los folículos estos se clasifican en folículos primarios. En esta etapa el ovocito empieza a ser rodeado de una capa

celular amorfa de glicoproteínas denominada zona pelúcida. Las células de la teca interna empiezan a rodear por fuera a las células de la granulosa (Figura 1) Rangel et al, (2018); (Gigli et al., 2006).

4.2.3.3 Folículo secundario

Las células de la granulosa incrementan de tamaño y número y se llama folículo secundario al ovocito I rodeado por varias capas de células de la granulosa. Las células tecales se diferencian en una capa externa e interna rodeando por fuera a las células de la granulosa. Hasta este estadio los folículos se clasifican en preantrales debido a que aún no se ha formado la cavidad antral (Gigli et al., 2006). Estos folículos secundarios tienen 2 o más capas de células cuboideas en la granulosa. Además, inician con el depósito de material para la formación de la zona pelúcida y los gránulos corticales, se forma la capa de células de la teca, se inicia la síntesis de ARN (ácido ribonucleico) en el ovocito y se muestra la capacidad de respuesta a las gonadotropinas (Figura 1) Rangel et al, (2018); (Gilbert, 2005).

4.2.3.4 Folículo terciario o pre-antral

Los folículos terciarios se clasifican en dominantes y subordinados. Los folículos dominantes, a diferencia de los subordinados, expresan en las células de la granulosa además de los receptores para FSH, receptores para LH (Gigli et al., 2006). Los folículos terciarios o folículos antrales se caracterizan histológicamente por la presencia de la cavidad antral y estar rodeados de varias capas cúbicas de células de la granulosa que comienzan a secretar un trasudado que se denominado como líquido folicular, al acumularse produce un reordenamiento de las mismas en células del cúmulo y murales (Ginther, 1992). En este estadio son la presencia de la teca interna constituida por tejido conectivo y la teca externa formada por una capa de colágeno atravesada por capilares con miofibroblastos diferenciados de los fibroblastos del estroma. A nivel molecular se

caracterizan por una mayor expresión de receptores para FSH en las células de la granulosa. Las células de la teca manifiestan receptores para LH (Gigli et al, 2006).

4.2.3.5 Folículo antral o folículo de Graff

Este folículo de Graff corresponde al estadio final del desarrollo folicular. Se caracteriza por la presencia de un antro repleto de líquido folicular y tiene dos tipos de células de la granulosa, las células de la granulosa murales y un tipo especializado de células de la granulosa llamado células del cúmulus. Ambos tipos celulares definen la estructura interna del folículo. Las células del cúmulus que rodean al ovocito y forma el complejo cúmulus-oophorus (CCO), mientras que las células de la granulosa murales forman la envoltura interna del folículo, los folículos de Graff, también están envueltos por una lámina especializada de matriz extracelular llamada lámina basal, que separa el folículo interno del tercer tipo de células somáticas presentes en el folículo, llamadas células de la teca.

Las células de la teca están compuestas por una capa celular vascularizada (Figura 1) que define los límites externos de los folículos antrales (Combelles, 2013). Los folículos preovulatorios o folículo de Graaf, poseen la capacidad de responder al estímulo de la LH produciendo cambios morfológicos y bioquímicos que finalizarán reiniciando la meiosis y dando lugar a la ovulación (Ginther, 1992). Además, se establecen las comunicaciones por uniones gap mediadas por proyecciones trans-zonales (PTZ) que permitirán una comunicación activa a través del intercambio de moléculas entre el ovocito y las células del cumulus (Gilbert, 2005; Hutt et al., 2007). Este folículo posee el mayor tamaño y se encarga de casi toda la secreción de estrógeno (Hafez, 2002).

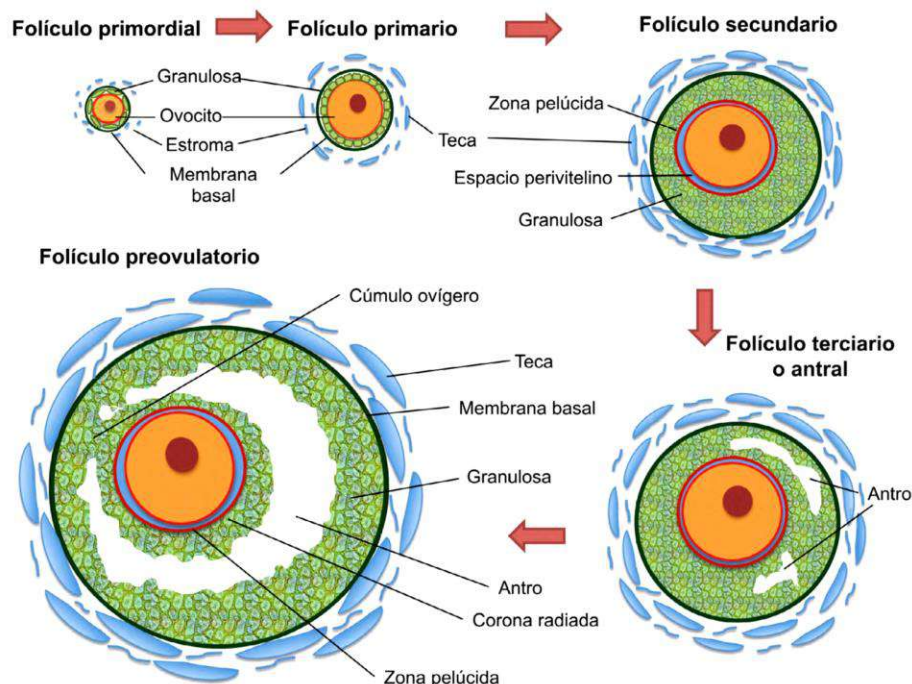


Figura 1. Secuencia de la foliculogénesis presentando las diferentes estructuras que podemos encontrar en cada fase. Fuente: Rangel et al. (2018).

4.2.4 Dinámica folicular

La dinámica folicular durante el ciclo estral acontece en ondas de crecimiento folicular que se superponen entre ellas. En cada una de estas ondas se desarrolla un folículo dominante que detiene el crecimiento de los demás folículos y que, según el perfil hormonal imperante, según el día del ciclo estral, será el que ovulará finalmente, posee los siguientes procesos reclutamiento folicular, selección, dominancia del folículo y divergencia del folículo (García et al., 2018).

4.2.4.1 Reclutamiento folicular

El reclutamiento es un proceso por el que bajo la acción de factores intraováricos estimulados por FSH, factores de crecimiento ligados a la insulina y sus proteínas de enlace IGFBP, un grupo de folículos antrales tempranos (2 – 3 mm de diámetro) comienzan a crecer en un medio con suficiente soporte hormonal gonadotrófico que les permite progresar a la ovulación (Fernández, 2003). Así, mismo Aba (2014) menciona que, en una alpaca hembra fértil, durante

cada onda folicular, se recluta un conjunto de folículos, y luego aparecen al mismo tiempo un conjunto de folículos antrales con diámetros que van desde 4 - 5 mm. De estos, un folículo está seleccionado para convertirse en el folículo dominante, y los demás sufren atresia y regresiones. Por otra parte, Adams et al (1989) y Bravo et al (1990a) indican que el reclutamiento o emergencia de un grupo de folículos permite obtener pequeños folículos antrales con un diámetro de 2 a 3 mm, que pueden crecer hasta 4 a 5 mm.

4.2.4.2 Selección folicular

La selección del folículo dominante se refiere al mecanismo de determinar qué folículo de la cola o grupo de selección continúa creciendo y se convierte en el folículo dominante para evitar la atresia. El principal suceso morfológico en el proceso de selección es la divergencia (Ginther et al., 1996). Dado que la desviación de tamaño y el evento de aumento de LH ocurren al mismo tiempo, la LH puede participar en el proceso de selección. Además, los folículos dominantes expresan más receptores de LH que los folículos subordinados (Gigli et al., 2006).

En el ganado bovino, hay mantenimiento o un aumento del IGF-I libre mediante la activación del sistema IGF por BP-proteasas (PAPP-A) y un aumento de los receptores de estradiol y LH, pero el sistema IGF es el único mecanismo con un efecto positivo demostrado en el comienzo de la desviación (Figura 2). Los cambios intrafoliculares en el futuro folículo dominante aparentemente aumentan la capacidad de respuesta a la disminución de la FSH y al aumento de la LH. Los otros folículos de la onda tienen la misma capacidad de dominancia, pero no alcanzan una etapa preparatoria similar antes de ser afectados negativamente por las concentraciones cambiantes de gonadotropina (Beg & Ginther, 2006)

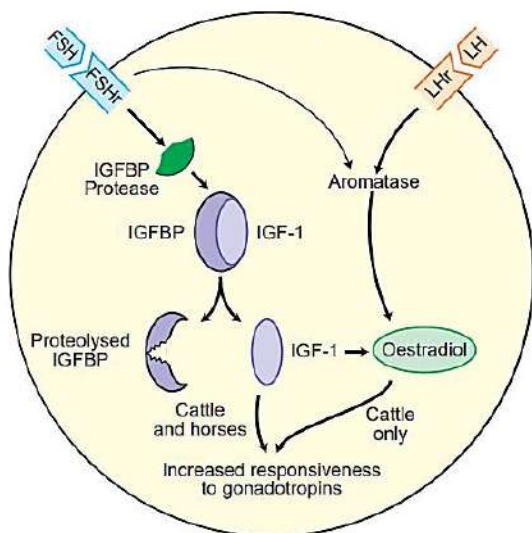


Figura 2. secuencia esquemática de eventos durante el mecanismo de selección del folículo en ganado y caballos

estos eventos ocurren antes del comienzo de la desviación del diámetro durante la selección del folículo en bovinos y equinos. Fuente: Beg & Ginther (2006)

4.2.4.3 Dominancia del folículo

El folículo seleccionado secreta estrógenos en mayor cantidad, originando la retroalimentación positiva sobre la liberación de LH; además, secreta inhibina, que por retroalimentación negativa sobre la hipófisis disminuye la liberación de FSH. De esta manera, el resto de los folículos que habían comenzado a crecer no pueden seguir haciéndolo, ya que para ello necesitan FSH (García et al., 2018)

El folículo dominante posee tres fases de desarrollo: crecimiento (aumento del diámetro del folículo), estático (cambio mínimo en el diámetro) y regresión (disminución del diámetro) (Stevenson, 2007). Cuando el folículo dominante regresa, se recluta otro conjunto de folículos antrales para la aparición de la siguiente onda folicular (Ginther et al., 1989). Es posible que en camélidos al igual como ocurre en otras especies, la inhibina producida por el folículo dominante participe en la regresión de los folículos subordinados (Fortune, 1994), también requiere el efecto sinérgico del estradiol y otros reguladores intraováricos, así como niveles menores de FSH en el

día de la desviación del folículo (Ginther et al., 1998). El diámetro más grande alcanzado por el folículo dominante es de 7 a 12 mm en las alpacas (Bravo & Sumar, 1989; Vaughan et al., 2004). Por otro lado, se determinó mediante ultrasonografía transrectal las características de las ondas foliculares del ovario en alpacas adultas. La media del diámetro del folículo dominante fue de 10.3 ± 1.6 mm (Hanco et al., 2015). También se reportó que el 60 % de los folículos dominantes sucesivos se encuentran en el ovario ipsilateral y un 40 % en el contralateral (Vaughan et al., 2004).

4.2.4.4 Divergencia del folículo

Los folículos ováricos experimentan cambios degenerativos durante los cuales pierden su integridad, la atresia se relaciona con diversos cambios morfológicos, bioquímicos e histológicos que varían mucho con la etapa de crecimiento folicular. La mayor parte de los oocitos se pierden en fases variables de su crecimiento, así como durante todas las etapas del ciclo. Esta pérdida ocurre más a menudo en las etapas avanzadas del crecimiento folicular. Dichos cambios pueden estar relacionados con disfunción de las células de la granulosa y con trastornos en el paso de sustancias nutritivas del plasma sanguíneo hacia el interior de los folículos. La degeneración se acompaña de pérdida de oocito, células de la granulosa y receptores para varias hormonas (Hafez, 2002).

Aproximadamente el 90% de los folículos ováricos iniciarán su crecimiento, pero no llegarán a ovular y sufrirán regresión, hecho conocido como atresia folicular. Se calcula que la atresia ocurre en cualquier momento del desarrollo, pero es más frecuente en los estadios de dependencia a las gonadotropinas (Rangel et al., 2018). Cuando los folículos sufren atresia cesa la producción de estradiol e inhibina, por lo que la secreción de FSH se reanuda dando inicio a un nuevo reclutamiento folicular. La razón por la que se desarrollan oleadas foliculares durante la fase lútea, que culminan en atresia es que la progesterona producida por el cuerpo lúteo inhibe la

frecuencia de pulsos de LH. Así, los folículos dominantes no obtienen el suficiente aporte de dicha hormona para concluir su crecimiento y ovular, causándose su regresión (Figura 3) (Rangel et al., 2018).

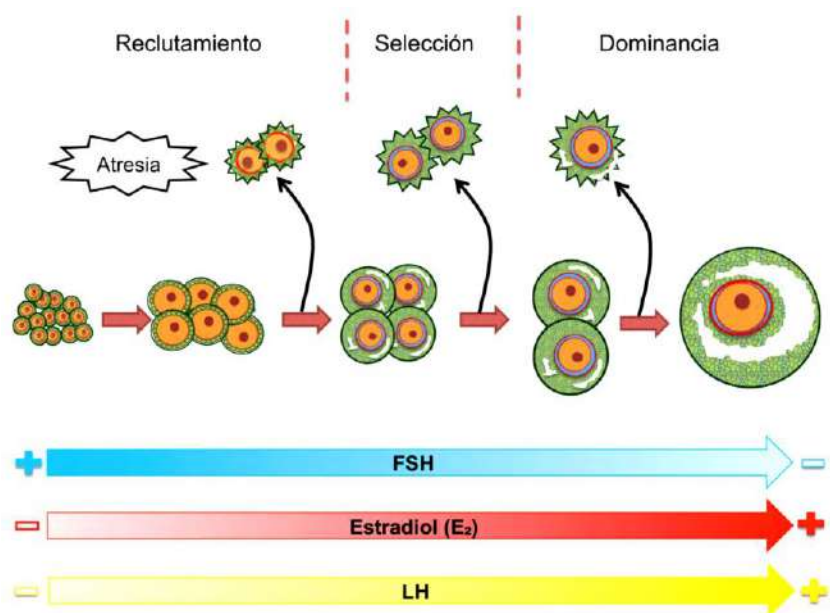


Figura 3. Oleada folicular y relación de los niveles de FSH, estradiol y LH.

Fuente: Rangel et al. (2018)

4.2.5 Ondas foliculares en alpacas

En ausencia de macho, la alpaca hembra tendrá varias ondas continuas de folículos anovulatorios, con periodos de crecimiento, maduración y regresión (Adams et al., 1990). Las ondas son consecutivas hasta que se dé una ovulación con fertilización e implantación exitosa (Hafez, 2002). Asimismo, Bravo y Sumar (1989) realizaron laparoscopia en alpacas y determinaron que el tiempo promedio para la formación de una onda folicular fue de 12 días. El periodo de crecimiento del folículo es de 4 días en promedio (3-5 días), la fase estática donde alcanza el tamaño ovulatorio (8-12 mm) dura en promedio 4 días (2-8 días) y la fase de regresión o atresia fue en promedio de 4 días (3-5 días).

En la alpaca el folículo puede alcanzar un tamaño de 6 mm que no demostrara dominancia, pero superando este tamaño ejerce su dominancia a causa de una producción elevada de estrógenos sobre el resto (Hafez, 2002). Un solo folículo se convierte en un folículo dominante y madura gradualmente y alcanza el tamaño de la ovulación (≥ 7 mm) y los otros regresionan (Adams et al., 1989; Bravo et al., 1990a).

Antes que suceda la regresión completa de la onda folicular (Figura 4), la siguiente onda empezara con su desarrollo entre 2 a 3 días antes de que decaiga la otra onda (Bustinza, 2001). Además, en el 85% de los casos, los folículos de los dos ovarios crecen alternativamente. Sin embargo, en otro estudio, el intervalo entre ondas foliculares (es decir, el intervalo de tiempo entre la aparición de folículos dominantes consecutivos) varió ampliamente, con una duración de entre 12 y 16 días, y ocasionalmente hasta 22 días. También se determina que entre el día 0 y el 10 después de la aparición de la nueva onda folicular, la tasa de crecimiento folicular es constante (0.43 ± 0.02 mm / día), por lo que la mayoría de los folículos alcanzan una medida de 6 o 7 mm de diámetro en los 6-8 días, por lo que se recomienda como óptimo para el empadre (Adams et al., 1989; Bravo et al., 1991).

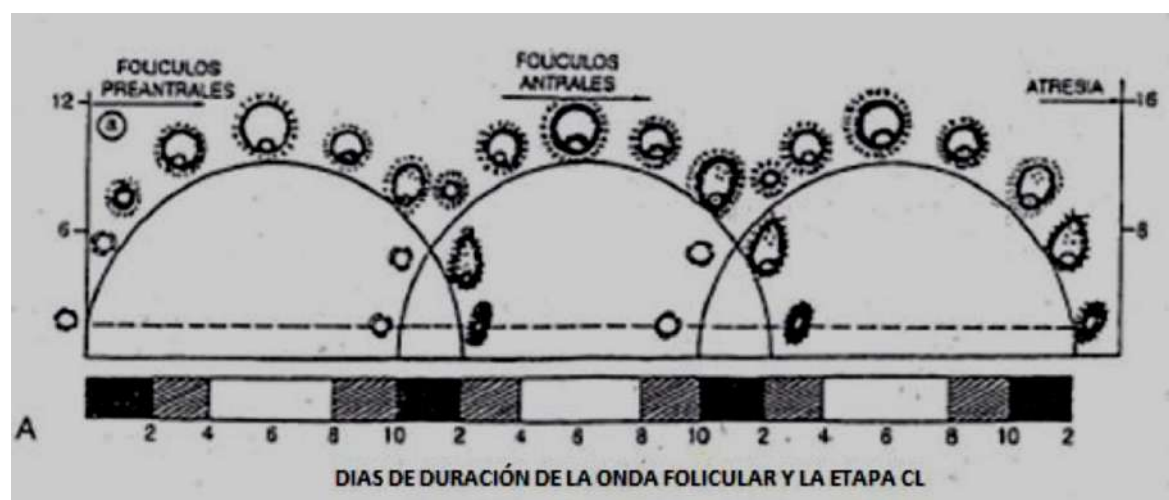


Figura 4. Ciclo folicular de la alpaca. Fuente: Hafez (2002)

4.2.6 Líquido folicular

El líquido folicular es un líquido extracelular amarillo complejo, semiviscoso que se acumula en el antro del folículo durante la fase de crecimiento del folículo. El líquido folicular proporciona un microambiente para la maduración del complejo cúmulo-ovocito y la diferenciación de las células de la granulosa, proviene principalmente del plasma que pasa a través del compartimiento vascular de la pared del folículo. Sin embargo, también contiene factores producidos localmente por las células del folículo y su producción varía en diferentes estados reproductivos. Su composición es al menos tan compleja como el suero, en cierto sentido su composición es única para cada folículo y depende de su estado metabólico, genera un entorno propicio para el crecimiento y diferenciación celular de los folículos como también para el núcleo y la maduración citoplasmática de los ovocitos, por lo que es dinámico (Fahiminiya & Gérard, 2010).

Los folículos no tienen una gran cantidad de líquido extracelular desde el comienzo del desarrollo. El folículo primordial consiste en un ovocito pequeño rodeado por una sola capa de células escamosas, cuando el folículo primordial abandona la reserva ovárica, se convierte en un folículo primario con una capa de células pregranulares en su capa externa, que comienzan a convertirse en células cuboidales de la granulosa; estas células se multiplican y se organizan en varias capas alrededor del ovocito para formar el folículo secundario, la granulosa empezará a secretar el líquido folicular y a medida que aumenta se formará espacios entre ellas. En los folículos terciarios o de Graff, estos espacios de líquido se irán confluyendo para formar el antro folicular. Por otro lado, el estroma se reorganiza y se diferencia, el cual rodea al folículo formando las tecas foliculares externa e interna; esta última se vasculariza (angiogénesis) y permite que varios componentes ingresen al folículo en crecimiento (Gosden et al., 1988).

4.2.6.1 Origen del líquido folicular

El líquido folicular se deriva del suero sanguíneo y también está compuesto en parte por sustancias producidas localmente relacionadas con las actividades metabólicas de las células foliculares, estas sustancias pueden variar con el desarrollo del folículo ovárico (Tabatabaei et al., 2011). Debido a que es poco probable que las proteínas plasmáticas que se encuentran en el líquido folicular se sinteticen in situ; por otro lado, las altas concentraciones de esteroides y mucopolisacáridos reflejan casi con certeza la actividad de síntesis de las células foliculares (Edwards, 1974). Otros estudios indican tres etapas de formación del líquido folicular. El origen del líquido primario sería intracelular, mientras que el líquido secundario se atribuye a la trasudación de los capilares tecaes. El líquido terciario se origina en el folículo colapsado posterior a la ovulación (Gosden et al., 1988).

Se espera que los cambios de volumen también estén regulados por los polipeptidos y hormonas esteroideas. En este sentido, las concentraciones de estrógeno y andrógeno en el antro de un folículo en expansión pueden ser muy diferente en comparación con los que se reducen, atrésicos (McNatty et al., 1979).

4.2.6.2 Características bioquímicas del líquido folicular

La composición bioquímica del folículo dominante es un indicador de la etapa de desarrollo y la calidad del ovocito, porque proporciona información sobre las necesidades de la célula (Gérard et al., 2002). El estado y la composición bioquímica del líquido folicular son importantes para determinar el estado de maduración del ovocito, su calidad y su posterior potencial para la fertilización y el desarrollo embrionario. Estos factores nos permitirán predecir el éxito de la fertilización y la probabilidad de un embarazo a término (Fahiminiya & Gérard, 2010).

Los componentes del líquido folicular incluyen esteroides y glicoproteínas, que son sintetizados por las células foliculares dominantes y forman parte de componentes específicos del líquido folicular, así como otros factores o sustancias sintetizadas por las células somáticas del ovario; estos compuestos contribuyen al metabolismo de las células y del ovocito folicular (Gérard et al., 2002; Nandi et al., 2007). la composición bioquímica del líquido folicular de la alpaca posee poca variación en los diferentes estadios de crecimiento, estas características son similares a otras especies estudiadas, por lo que los folículos secundarios también se pueden utilizar como fuente de líquido folicular (Pacheco & Coila, 2010)

4.2.6.3 Proteínas del líquido folicular

Cuando aparece el folículo dominante, aumenta su producción de estradiol e inhibina, lo que hace que el folículo continúe madurando y restrinja el crecimiento de otros folículos. El desarrollo de los folículos terminales depende estrictamente de las gonadotropinas, porque su crecimiento se caracteriza por un fuerte aumento de la sensibilidad de sus células de la granulosa a la FSH (Monniaux et al, 1997).

Debido a la acción temprana de factores locales como IGF-1, activina e inhibina; a diferencia de los folículos subordinados que no parecen desarrollar estos mecanismos de sobrevivencia por lo que sufrirán de atrésia, cuando el folículo dominante alcanza el tamaño preovulatorio adquiere receptores de LH en la granulosa que puede deberse a la influencia del estradiol, que le permite sobrevivir a la disminución de FSH que ocurre antes del pico preovulatorio de LH, que es potencial para la ovulación (Findlay, 1993). Lo que resulta en la integración de señales extraováricas (paracrinas) y factores intrafoliculares (autocrinas) serían los que determinan si un folículo continuará su desarrollo o terminará en atresia (Webb et al., 2003).

Las acciones intrafoliculares de los factores de crecimiento IGF y EGF en la modulación de la función de las células de la granulosa inducida por FSH las cuales son esteroidogénesis, producción de inhibina y proliferación celular. El IGF puede potenciar la acción estimuladora de FSH en la diferenciación celular como lo demuestra el aumento de la secreción de hormonas esteroideas y peptídicas. El EGF promueve la proliferación celular. La FSH y el IGF aumentan el tono de activina de las células de la granulosa y al menos algunas acciones estimulantes de FSH y el IGF en la secreción de E₂ e inhibina A están mediadas por la activina producida localmente que ejerce de manera autocrina/paracrina (Glister, 2001)

4.2.6.3.1 Interacción de las gonadotropinas y estradiol (E₂) con el EGF e IGF

Antes de la ovulación en mamíferos, se desencadena una cascada de eventos que se asemejan a un proceso inflamatorio y de remodelación tisular que desencadenada por la LH en el folículo ovárico, Sin embargo, se cree que muchos efectos de LH son indirectos debido a la expresión restringida de su receptor, la estimulación de la LH induce la expresión transitoria y secuencial de los miembros de la familia del EGF recapitula eventos morfológicos y bioquímicos desencadenados por la LH, incluida la expansión del cúmulo y la maduración de los ovocitos. Por lo tanto, estos factores de crecimiento relacionados con EGF son mediadores paracrinos que propagan la señal de LH a través del folículo (Park et al., 2004).

Algunos efectos autocrinos y paracrinos del estradiol en las células de la granulosa incluyen un aumento en la actividad de la aromatasa (Gore-Langton & Armstrong, 1994), promoción de una mayor expresión de receptores para la FSH y la LH, incremento en la sensibilidad a las gonadotropinas (Richards et al., 1979) y una mayor síntesis de IGF-I por tal razón estos péptidos generan efectos estimulantes en las células ováricas, un sistema de respuesta autocrina estrechamente regulado interconectado con las hormonas pituitaria y gonadal. El desarrollo de tal

sistema regulador obviamente mejoraría el crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos a nivel local, Tal mecanismo podría estar involucrado en la selección del folículo dominante elegido para el crecimiento y la ovulación. Para comprender mejor cómo se regula este supuesto sistema autocrino y su interfaz con las hormonas tróficas ováricas clásicas FSH, LH y estradiol (E_2) se realizó interacciones con LH, FSH y E_2 . el IGF-I aumento su concentración en el doble con la interacción con FSH, la interacción con E_2 de igual manera aumento en el doble su concentración de IGF-I, la interacción de E_2 más FSH incremento la concentración en el triple, interacción con la LH aumento en doble su concentración y la interacción de LH y FSH aumento en el doble la concentración de IGF-I en el líquido folicular. Esto indica que la secreción gonadal de IGF-I puede ser estimulada por las principales hormonas implicadas en la regulación trófica del ovario, Al igual que con otras funciones dependientes de gonadotropina de las células de la granulosa, Esta interfaz entre las hormonas circulantes y los sistemas autocrinos podría proporcionar un mecanismo importante para amplificar los efectos de las hormonas gonadotrópicas a nivel local. (Hsu & Hammond, 1987). Los folículos seleccionados tienen concentraciones más altas de estradiol en el líquido folicular (Fortune et al., 2001)

4.2.7 La barrera hemato-folicular

El líquido folicular está separado de la circulación sanguínea por la barrera hematofolicular, que consta de dos capas de células (granulosa y teca) y una membrana basal que las separa. La teca interna está ubicada fuera de la membrana basal y a diferencia de la granulosa, tiene vasos sanguíneos (Figura 5). La integridad folicular completamente desarrollada está indudablemente determinada por las características de estas tres capas, la capa de la granulosa es muy pequeña en las primeras etapas de crecimiento y la teca se desarrolla a medida que los folículos se expanden (Edwards, 1974).

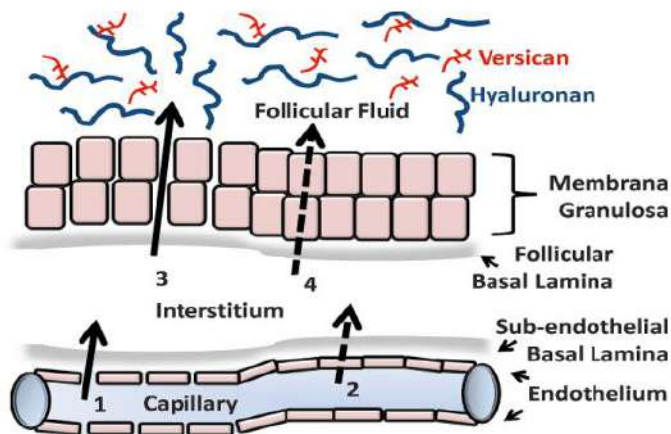


Figura 5. Dibujo que ilustra las rutas que puede tomar el líquido desde el capilar tecal hasta el líquido folicular y las posibles barreras del endotelio.

la lámina basal subendotelial, el intersticio, la lámina basal folicular y la membrana granulosa. Las rutas 1 y 3 muestran el movimiento de líquido entre las células (flechas sólidas), y las rutas 2 y 4 muestran rutas transcelulares (flechas punteadas) que involucran acuaporinas o transcitosis. Fuente: Rodgers e Irving-Rodgers (2010)

4.2.8 Factores de crecimiento (FC)

El contenido de líquido folicular incluye muchos factores secretados por las células de la granulosa y teca. Estos factores pueden interactuar constantemente; por lo que el equilibrio entre la estimulación y la inhibición dentro del folículo en sus diferentes etapas determinará el desarrollo o atresia del folículo (Rosales et al., 2010). La investigación informada por Ireland et al., (2000) demostraron que existe en el líquido folicular, factores de crecimiento intrafolicular, como inhibinas, activinas y factores de crecimiento similares a la insulina y sus proteínas de unión, en el líquido folicular de folículos bovinos individuales, tienen acciones endocrinas, autocrinas y paracrinas y que poseen un rol importante en la regulación del crecimiento, diferenciación y función folicular (Tabla 1), la diferencia entre ellos determinaría qué onda folicular será el folículo dominante y esto se da por estimulación gonadotrópica.

Los FC son moléculas de naturaleza proteica, también conocidos como péptidos biorreguladores, al contrario de las hormonas reproductivas conocidas, es sintetizado por varios

órganos y tejidos. su principal función es controlar el ciclo celular y regular su desarrollo en diferentes etapas; además de ser considerados mitogénicos (Gospodarowicz & Moran, 1976).

El efecto biológico se ejerce a través de la unión con los receptores que se encuentran en la membrana, que suelen ser glicoproteínas, y que se comunican con el llamado Sistema de Segundos Mensajeros mediante cambios conformacionales. La respuesta a los FC es una estimulación rápida del transporte de aminoácidos, uso y consumo de glucosa, ARN y síntesis de proteínas, algunas de las cuales inducen la síntesis de ADN y la replicación celular (Hill, 1989). Los FC se originan intra folicularmente o provienen de la circulación sistémica; y su expresión varía entre las diferentes especies, siendo específicos de cada especie lo que sugiere que su importancia en la regulación desarrollo folicular es específico de la especie, o que su síntesis ovárica local podría ser facultativo, pero no esencial para la foliculogénesis (Monniaux et al., 1997).

		GRANULOSA	TECA
PROLIFERACIÓN	ESTIMULACIÓN	EGF TGF- α bFGF IGF-I	TGF- α
	INHIBICIÓN	TGF- β	TGF- β
DIFERENCIACION	ESTIMULACIÓN	IGF-I	TGF- β Inhibina
	INHIBICIÓN	EGF bFGF Activina A Citoquinas	TGF- α Activina A

Tabla 1. Acción de los factores de crecimiento In vitro sobre la proliferación y la diferenciación de las células foliculares en mamíferos. Fuente: Monniaux et al. (1997)

El estudio de los FC en la foliculogénesis es difícil ya que pertenecen a un complejo sistema de familias al que pertenecen cada FC, receptores, proteínas de unión y proteasas que pueden alterar la biodisponibilidad de los ligandos (Monget & Monniaux, 1995). La unión con moléculas receptoras localizadas en la membrana plasmática de las células blanco genera señales, las cuales son transferidas hacia el interior del citoplasma mediante la activación de enzimas con actividad kinásica que fosforilan ciertos sustratos proteicos formando así una reacción en cascada de señales conocida como transducción que finalizan con la activación de la expresión génica y produciendo la transcripción específica de ciertos genes los que serán traducidos en los ribosomas, constituyéndose en la respuesta celular a un determinado factor de crecimiento (Carpenter & Cohen, 1979).

El desarrollo de pequeños folículos antrales no es estrictamente dependiente de gonadotropinas, sino que los factores locales EGF y el IGF influyen directamente en el desarrollo folicular al promover la proliferación de las células de la granulosa los cuales ayudan en el crecimiento de folículos antrales pequeños. Durante el desarrollo folicular final, esto cuando pasa a desarrollar folículos antrales grandes que dependen de gonadotropinas. Factores como IGF e inhibina potencian acciones de diferenciación de las gonadotropinas en las células de la granulosa y tecaes (Monniaux et al, 1997). La apoptosis de las células de la granulosa de los folículos antrales tempranos y preovulatorios es inhibida por el IGF-I y EGF (Chun et al, 1996). Tienen un papel muy importante, ya que funcionan como factores de sobrevivencia que evita la apoptosis. En este grupo se encuentran las gonadotropinas FSH y LH, hormonas esteroidales, factores como EGF e IGF-I. La respuesta a estas moléculas dependerá necesariamente de los receptores a dichos factores que en ese momento se estén expresando en la célula. Sin embargo, no siempre la célula responderá al estímulo, aunque posea el receptor (Flores et al., 2005). La atresia se caracteriza por

un marcado aumento en las concentraciones intrafoliculares de IGFBP < 40kDa y por la inhibición de la acción de los IGF (Monget & Monniaux, 1995).

Así mismo Hammond et al., (1991) indican que este sistema podría funcionar como un importante mecanismo de amplificación local para la esteroidogénesis y la acción de la gonadotropina. Los IGF pueden promover el crecimiento y diferenciación de las células ováricas, finalmente las células ováricas secretan una familia heterogénea y compleja de proteínas de unión a IGF (IGFBP). La secreción de estas proteínas por las células ováricas está regulada por gonadotropinas y factores ováricos producidos localmente, Colectivamente, estos diversos componentes proporcionan una red local integrada y sinérgicamente cooperativa para promover el crecimiento y la diferenciación dependientes de gonadotropinas en el ovario.

4.2.8.1 Factor de crecimiento epidermal (EGF)

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue descubierto por Stanley Cohen en 1962 encontró inicialmente en las glándulas submaxilares de ratones llamándolo factor del parpado dental, luego realizo estudios *in vitro* con explantes de piel y epidermis y demostró efecto directo sobre el crecimiento epidérmico y llamo EGF (Carpenter & Walh, 1991). El ovario es uno de los órganos capaces de sintetizar EGF, habiéndose determinado la presencia de actividad EGF en liquido folicular porcino y en cultivos de células tecaes (Botella et al., 1995). El EGF es un polipéptido que se encuentra formada por una cadena de 53 residuos de aminoácidos. En su estructura tridimensional posee tres puentes disulfuro intramoleculares (Figura 6); estos puentes disulfuro son fundamentales para el efecto y la afinidad sobre su receptor de membrana (Carpenter & Cohen, 1979)

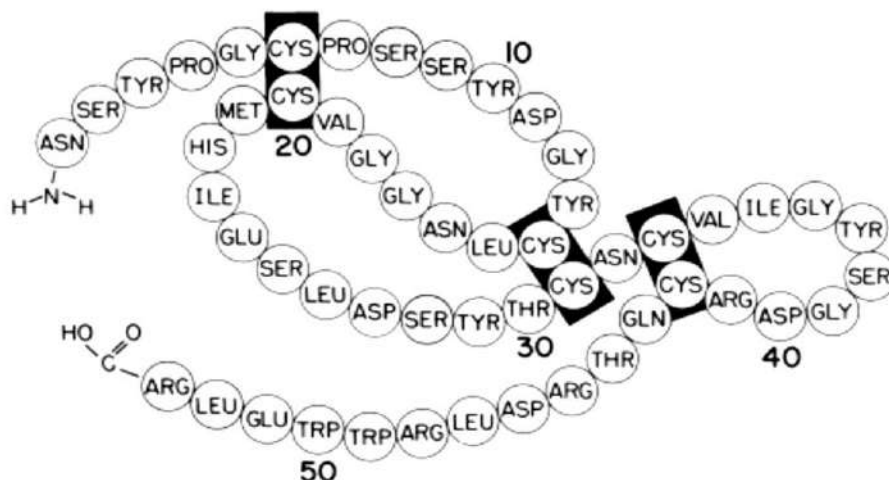


Figura 6. Secuencia de aminoácidos y ubicación de los enlaces disulfuro del EGF del ratón
Fuente: Carpenter & Cohen (1979).

4.2.8.1.1 Función del EGF en el desarrollo folicular

El EGF posee un papel regulador durante el desarrollo folicular temprano, demostrando que se encuentra en el ovocito, pero solo en la etapa temprana del desarrollo folicular como es en el reclutamiento de folículos (Reeka et al., 1998). Se reportó que concentraciones sustancialmente más altas de EGF en líquido de folículos menores de 6 mm de diámetro que en el suero, infiere que el EGF es sintetizado por la teca y/o la capa de células de la granulosa de estos folículos y por el contrario, las bajas concentraciones en los folículos preovulatorios indican que la producción de EGF ha disminuido en estos (Westergaard & Andersen., 1989).

Se demostró que el EGF del líquido folicular maduro humano genera un efecto positivo sobre la meiosis ovocitaria de ratón, el efecto positivo fue en gran medida mediada por el EGF siendo un efecto estimulante sobre la maduración de ovocitos. El EGF ejerce un efecto de expansión del cumulo relacionado con la síntesis de proteoglicanos, esto mejora la accesibilidad de los ovocitos para la fertilización (Das et al., 1992). El ciclo celular se detiene en la profase y luego se reinicia cuando la LH actúa sobre las células de la granulosa activa. Las células de la

granulosa detienen la meiosis por la acción de cGMP (guanosin monofosfato ciclico) que se difunden hacia el ovocito a través de uniones gap, LH reinicia el ciclo celular cerrando las uniones gap y disminuyendo el cGMP del ovocito. La activación del receptor del EGF, (EGFR) es un paso esencial para desencadenar la reanudación meiótica inducida por LH (Figura 7) (Norris et al., 2010).

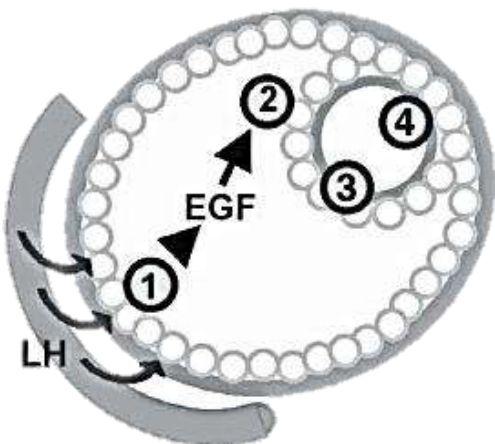


Figura 7. Maduración periovulatoria final del ovocito

la transducción de señales periovulatorias culminan en la maduración de los ovocitos (1) La LH circulante induce una cascada de expresión génica en las células murales de la granulosa, incluida la expresión de ligandos similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF), que actúan sobre las células del cúmulo granuloso (2). Las células del cúmulo modifican sus interacciones físicas con el ovocito y secretan factores que promueven la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito (3), (4) el ovocito reanuda la meiosis, Fuente: Hutt & Albertini (2007)

A nivel del ovario, el EGF ejerce potentes efectos reguladores sobre la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa estos efectos del EGF presumiblemente están mediados por receptores de membrana celular específicos, cuya existencia se ha demostrado en células de la granulosa bovina, ovina y murina. Se ha demostrado que la unión de LH a los receptores de LH en las células de la teca externa y las células de la granulosa mural conduce a la liberación mediada por metaloproteinasa de matriz (MMP) de factores de crecimiento similares a EGF de la superficie celular (Figura 8) (Evron et al., 2015). La liberación de factores de crecimiento similares a EGF inducida por LH y mediada por MMP conduce a la activación de los

receptores de EGF en las células del cúmulo granuloso y, por lo tanto, a la fosforilación de la proteína reguladora aguda esteroidogénica, lo que da como resultado una regulación positiva posterior de la esteroidogénesis (Andric & Ascoli., 2008).

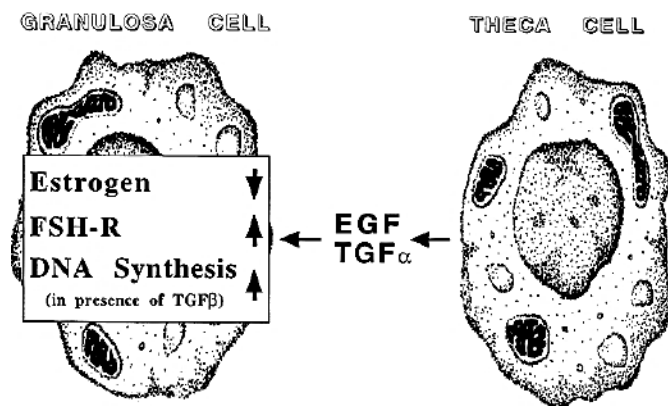


Figura 8. El sistema factor de crecimiento epidérmico EGF intraovárico

factor de crecimiento transformante- α . TGF α , FSH hormona estimulante del folículo. Fuente: Evron et al. (2015)

En las células de la granulosa bovina in vitro, EGF estimulan fuertemente la proliferación, pero inhiben la esteroidogénesis y la producción de inhibinas lo que mejora el crecimiento (Monniaux et al., 1997).

La auto fosforilación es fundamental para la interacción del receptor con sus sustratos. Estos se unen al receptor mediante los denominados dominios puentes de SH2. Las vías de transducción de señales activadas por EGF incluyen la vía de fosfatidilinositol, que conduce a la activación de la proteína quinasa C y a un incremento en la concentración de Ca $^{2+}$ intracelular y la activación de Ras (proteína de unión al GTP) de la ruta Ras / Raf / MAP quinasa, que conduce a la fosforilación de proteínas reguladoras y factores de transcripción y que termina en la proliferación celular (Boonstra et al., 1995; Tarnawski & Jones, 1998).

4.2.8.2 Factor de crecimiento tipo insulínico (IGF)

El descubrimiento del factor de crecimiento parecido a la Insulina de tipo 1 (IGF-1) se remonta a los experimentos de Salmon y Daughaday (1957) identificaron una sustancia que se encontraba en la sangre y que en experimentos de cultivo celular era capaz de estimular la incorporación de sulfatos al cartílago, a la que llamaron factor de sulfatación Trece años más tarde el Dr. Daughaday propuso renombrar “somatomedinas” después de varios años en los años 70 se investigó su estructura siendo similar a la insulina y lo llamaron “factor de crecimiento similar a la insulina”. el IGF son proteínas con propiedades semejantes a la insulina y a la vez promotoras del crecimiento (Botella et al., 1995).

La hormona del crecimiento (GH) o también llamada somatotropina (ST) es sintetizada por la hipófisis e interactúa con los receptores ubicados dentro del hígado y el ovario, cuerpo lúteo (CL) y folículos (F). Dentro del hígado, ST causa la síntesis y secreción de IGF-I. El receptor ST primario en el hígado es el receptor ST 1A. El factor de crecimiento similar a la insulina-I puede viajar a través de la sangre y afectar la función ovárica IGF-I endocrino, La somatotropina también puede actuar directamente sobre el ovario a través de los receptores ST ováricos (receptores ST 1B y 1C). El ovario produce IGF-I (IGF ovárico) que pueden complementar el IGF-I de fuentes endocrinas principalmente del hígado. establece que las acciones de IGF-I en el ovario son causadas por IGF-I endocrino y ovárico. Varias condiciones fisiológicas (caja) se asocian con la disminución de la síntesis y secreción de IGF-I por el hígado y las disminuciones en sangre de IGF-I pueden influir potencialmente en la función ovárica a través de un mecanismo endocrino (Figura 9) (Lucy, 2000). En bovinos de la raza Holstein x Japanese black F1 el IGF-I que se encuentra en el líquido folicular ovárico es derivado principalmente por el hígado generando una acción endocrina (Sudo et al., 2007) igualmente ocurre en equinos (Salazar et al., 2014).

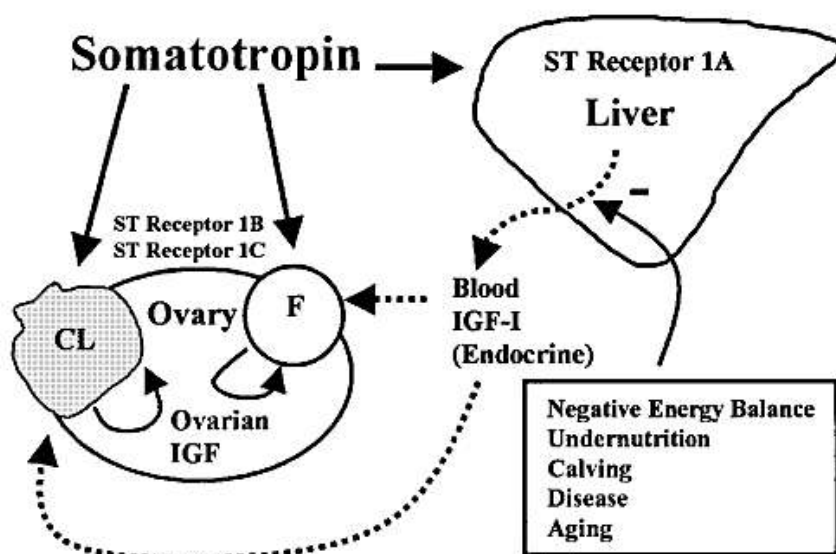


Figura 9. Liberación de IGF-I por el hígado y transporte hacia el ovario

Una vez liberado del hígado, el IGF-I viaja a través de la sangre y actúa sobre tejidos distantes, incluidos los del tracto reproductivo. Fuente: Lucy (2000).

En el ovario se han identificados el IGF-I y el IGF-II. La acción se encuentra regulada por un sistema formado por 6 proteínas, IGFBP (siglas en inglés de proteínas de unión del factor de crecimiento tipo insulínico). En el ovario se han descrito solamente las proteínas 2 y 4 (Monget et al., 1996). El sistema de factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) juega un papel clave en el crecimiento folicular y la regresión, el IGF son creados por las células de la granulosa y en menor medida en la teca (Watson et al., 2004). Son quizás los factores intraováricos mejor caracterizados. Estas proteínas (IGFBP) regulan la acción del IGF impidiendo la unión a sus receptores, ya que únicamente el IGF libre tiene acción biológica. La acción del IGF consiste en estimular la proliferación de las células de la granulosa, la síntesis de hormonas esteroideas y también la producción de inhibinas y activinas. En otras palabras, amplifica la respuesta desencadenada por la FSH. La acción de IGF está regulada por la enzima proteolítica PAPP-A,

por sus siglas proteína plasmática asociada a la preñez, ya que aumenta la bioactividad de la IGF al degradar las proteínas de unión (Gerard et al. 2004).

4.2.8.2.1 Factor de crecimiento similar a la Insulina tipo I (IGF-I).

Los IGFs son polipéptidos aislados de suero, cercanamente emparentados y que comparten un 62% de la secuencia de aminoácidos con un peso molecular bajo, de aproximadamente 7 KDa. Específicamente, el IGF-I es un polipéptido monocatenario de 70 residuos de aminoácidos unidos por tres puentes disulfuro. El IGF-I muestra una homología obvia con la proinsulina: las posiciones 1 a 29 son homólogas a la cadena B de la insulina y las posiciones 42 a 62 a la cadena A de la insulina. Un péptido de "conexión" acortado con 12 residuos (posiciones 30 a 41) en comparación con 30 a 35 en la proinsulina no muestra homología con el péptido de proinsulina C.

Una secuencia de octapéptidos en el extremo COOH-terminal también es una característica que no se encuentra en la proinsulina 51 (Figura 10) (Svoboda & VanWyk, 1985). La familia de los factores de crecimiento insulínico, se componen de dos tipos: el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I y tipo II (IGF-I e IGF-II respectivamente). Los miembros de esta familia se relacionan por la secuencia y tiene efectos metabólicos similares a los que presenta la insulina (Rechler & Nissley, 1991). Su actividad de multiplicación estimulante difiere en solo 5 residuos de aminoácidos del factor de crecimiento similar a la insulina tipo II; además, la somatomedina-C (Sm-C) y factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) son péptidos idénticos (Svoboda & VanWyk, 1985).

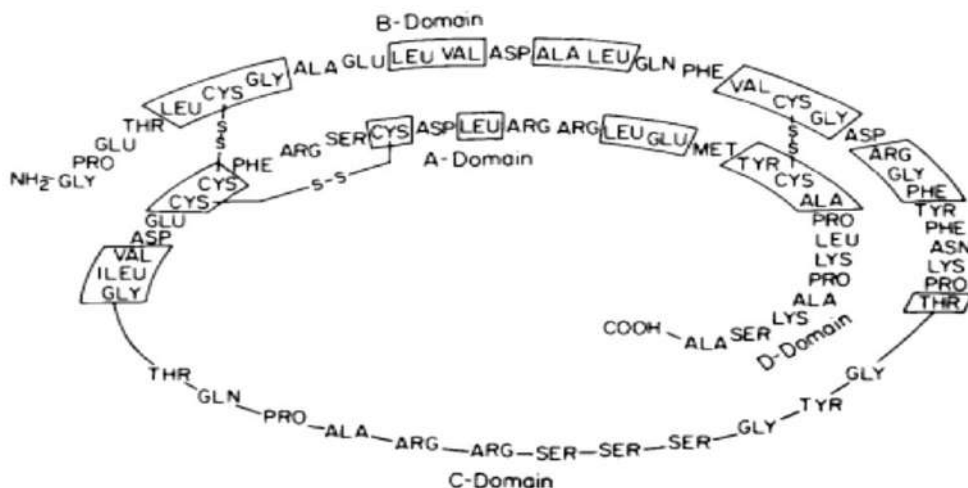


Figura 10. Secuencia de aminoácidos de IGF-I

las cajas indican aminoácidos idénticos a la proinsulina humano, Fuente: Svoboda & VanWyk (1985)

4.2.8.2.2 Función de la IGF en el desarrollo folicular

El IGF-I parece tener múltiples funciones en la regulación del folículo, actuando aditivamente con la FSH como regulador autocrino de la proliferación de células de la granulosa, sinérgicamente con la FSH en la inducción de la actividad esteroidogénica de las células cúmulo, y en ausencia de FSH como regulador paracrino de la proliferación de células cúmulo en pequeños folículos antrales (Armstrong et al., 1996).

Las acciones biológicas de los IGF no se limitan a la mitogénesis. También pueden inducir la diferenciación o promover la expresión de funciones diferenciadas. La respuesta biológica precisa está determinada por el estado de desarrollo de la célula, así como por la presencia de otras hormonas y factores de crecimiento (Rechler & Nissley, 1991). El IGF-I está involucrado en la regulación del desarrollo folicular ovárico y se comporta en el ovario como un amplificador natural de las acciones ejercidas por la FSH (Hsu et al, 1987) y que la producción y acción del IGF-I está estimulada por la presencia de hormonas gonadotrópicas y ováricas (Hammond et al., 1985). Las acciones de los IGF-I contribuyen a la regulación celular y estimulan la síntesis de proteínas a través de su activación de receptores de superficie celular específicos, principalmente el receptor

de IGF-I, que son homólogos a los receptores de insulina y activan las cascadas de fosforilación. La estabilidad de los IGF y su interacción con sus receptores están mediados por proteínas de unión a IGF específicas (IGF-BP) que se encuentran en la circulación y en los líquidos extracelulares (Schmid, 1995; LeRoith et al., 1992). Las concentraciones altas de E2 en el líquido folicular son distintivos de folículos dominantes y preovulatorios se asocian con concentraciones más bajas de proteínas de unión de IGF (IGFBP-2,-4 y -5), que previenen la unión de IGF al receptor.

El análisis de la secuencia temporal de cambios en E2, IGFBPs de bajo peso, IGF libre y PAPP-A en el líquido folicular sugiere que el aumento de PAPP-A es el indicador bioquímico más temprano detectado para el futuro folículo dominante, ya que la selección folicular posee cambios progresivos que comienza con la adquisición de PAPP-A, lo que conduce a una disminución de IGFBP-4 y-5 y a un aumento de IGF libre, que sinergiza con el FSH para aumentar la producción de E2 (Figura 11) (Fortune et al., 2004). La expresión de PAPP-A en las células de la granulosa puede contribuir a la producción de IGF-I libre para desarrollarse a la fase preovulatoria. Por lo tanto, la expresión de PAPP-A estimulada por FSH es un factor clave para el sistema IGF en el desarrollo folicular bovino (Sudo et al., 2007)

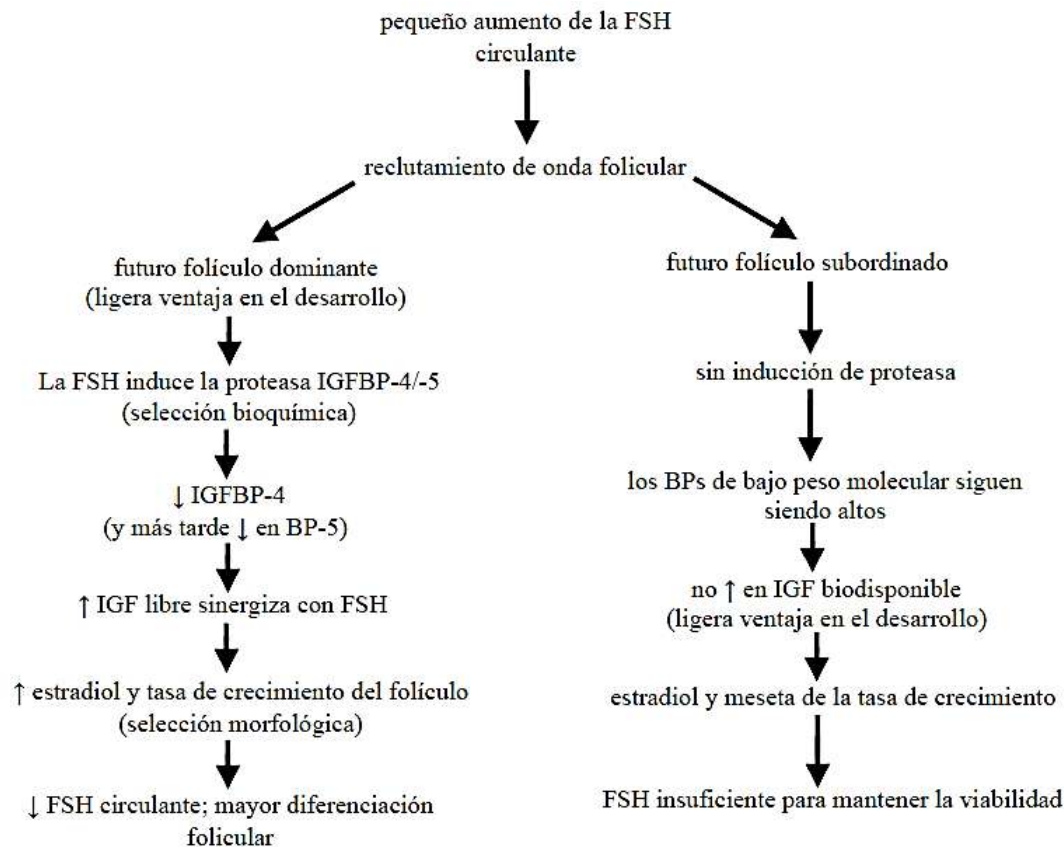


Figura 11. Secuencia sugerida de eventos durante la selección del folículo dominante en el bovino este modelo sugiere que un evento crítico de "selección bioquímica" es la inducción por FSH de una proteasa para IGFBP-4 en un folículo de una cohorte y que la selección bioquímica conduce rápidamente a la "selección morfológica" y una mayor diferenciación del folículo dominante. Fuente: Fortune et al. (2004)

La LH adquiere una importancia clave en la estimulación de la esteroidogénesis tecal. Esta acción de la LH se incrementa aún más por una acción paracrina de las altas cantidades de inhibina producida por las células de la granulosa, así como por la alta biodisponibilidad de los IGF (debido a las cantidades reducidas de sus proteínas de unión. La alta producción de andrógenos por las células de la teca junto con la alta actividad de la aromatasa en las células de la granulosa diferenciadas antes durante la fase folicular, da como resultado una alta producción de estradiol por parte del folículo preovulatorio (Figura 12) (Driancourt & Thuel, 1998).

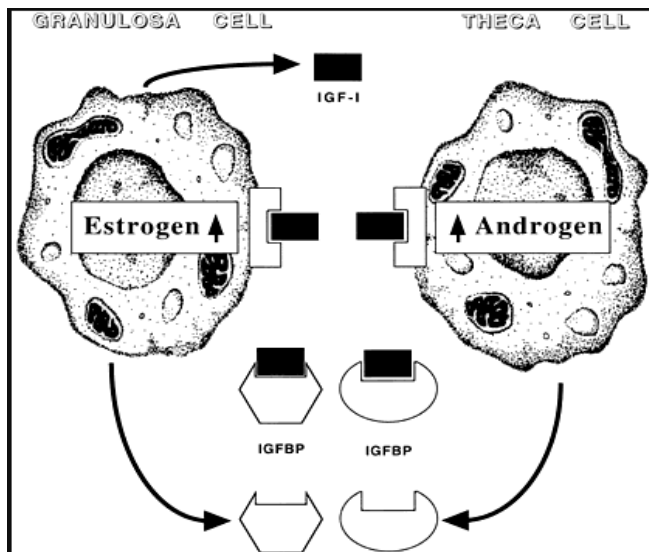


Figura 12. El sistema factor de crecimiento insulínico tipo I IGF-I intraovárico
IGFBP (proteínas de unión de IGF-I). Fuente: Evron et al. (2015)

Un estudio ha demostrado que el IGF-I tiene un efecto positivo sobre la maduración de ovocitos porcinos in vitro y sobre el desarrollo embrionario previo a la implantación, lo que sugiere un papel fisiológico para IGF-I in vivo. El efecto in vivo de IGF-I puede ser indirecto a través de la estimulación autocrina de cúmulos o células de la granulosa dando como resultado una maduración mejorada de los ovocitos y la fertilización.

Los resultados mostraron que la velocidad de escisión de los ovocitos se estimulaba notablemente de una manera dependiente de la dosis mediante la adición de IGF-I al medio de maduración del ovocito y que el desarrollo de embriones más allá de la etapa de ocho células se mejoró mediante la adición del IGF-I, alcanzando un máximo de 22% a 200 ng/ml de IGF-I (Xia et al., 1994) Así mismo, otro estudio señala que la adición de IGF-I junto a gonadotropinas en el medio de maduración de ovocitos bovinos, favorece la maduración in vitro de ovocitos y el posterior desarrollo embrionario, incrementando el número de mórulas y blastocistos (Herrler et al., 1992)

4.2.9 Análisis de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA)

4.2.9.1 Pruebas de análisis de inmunoadsorción ligada a enzimas en microplaca

Entre las pruebas de inmunoanálisis de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA). Al igual que otras pruebas de unión primaria, el ELISA. Se emplea para detectar y medir tanto anticuerpos como antígenos, poseen una sensibilidad y especificidad satisfactorias. La forma más común de ELISA se utiliza para detectar y cuantificar anticuerpos específicos se utilizan micropocillos de poliestireno con una cantidad de 96 pocillos (Tizard, 2018)

4.2.9.2 Técnica de ELISA Tipo Sándwich

Se utiliza para identificar un antígeno específico. Los pocillos son recubiertos con un anticuerpo específico (anticuerpo de captura). Después se añade la solución de antígeno a ser analizado a cada pocillo y el anticuerpo de captura se acoplará al antígeno presente en la solución problema. Después de lavar, se adiciona un anticuerpo específico que también se acopla al antígeno (anticuerpo de detección). Tras el lavado para eliminar el anticuerpo sin acoplar, se añade la antiglobulina marcada con una enzima y el sustrato. En este análisis, el grado de color de la reacción se relaciona directamente con la cantidad de antígeno unido. Estas pruebas implican la formación de capas de anticuerpo – antígeno – anticuerpo, se denomina ELISA tipo sándwich (Tizard, 2018).

CAPÍTULO V

MATERIALES Y METODOS

5 Materiales

5.1 Materiales de campo

- Soga
- Pintura
- Poncho de lluvia
- Gel ecográfico
- Tableros más fichas de seguimiento ecográfico
- Brete para alpaca

5.2 Material biológico

- Alpacas hembras
- Ovarios
- Líquido folicular ovárico

5.3 Material de laboratorio

- Riñoneras
- Jeringas 1 mL y 3 mL
- Tubos eppendorf 0.5 mL y 1.5 mL
- Regla vernier
- Cooler de tecnopor
- Gradilla
- Tubos de ensayo
- Vasos precipitados

- Pipeta multicanal
- Pipetas 1000 uL, 100 uL
- Kit ELISA EGF
- Kit ELISA IGF-I
- Papel toalla

5.4 Material de oficina

- Papel bond
- Lápices
- Marcadores indelebles
- Lapiceros
- Cinta masking tape
- Engrapador
- Tinta de impresora
- Laptop
- Archivadores
- Disco duro

5.5 Equipos

- Ecógrafo ALOKA®
- Transductor transrectal 7.5MHz
- Espectrofotómetro ThermoFisher SCIENTIFIC
- Congeladora ClimasLAB
- Vortex

5.6 Metodología

5.6.1 Metodología de campo

El estudio de campo se realizó con animales del Centro Experimental La Raya de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), ubicado a una altitud promedio de 4135 m.s.n.m. Se utilizó 15 alpacas hembras adultas de raza Huacaya en edad reproductiva, aisladas de alpacas machos, libres de enfermedades y sin tratamiento farmacológico alguno. Los animales fueron pastoreados en pastos naturales de 7 a 8 horas diarias, con acceso al agua *ad libitum*, estos animales fueron seleccionados en temporada de empadre que se realiza entre los meses de enero a marzo 2022.

Se realizó una evaluación ecográfica de desarrollo folicular ovárico a todas las alpacas del estudio, utilizando un ecógrafo de marca ALOKA® equipado con un transductor transrectal de 7.5MHz. Los animales fueron marcados con numeración sucesiva del 1-15 con pintura acrílica a la altura de la paleta en ambos lados para facilitar su identificación. El seguimiento ecográfico se realizó 2 veces por semana durante 15 días (duración de una onda folicular). Se volvió a realizar un nuevo seguimiento ecográfico a una segunda onda folicular este protocolo nos sirvió para poder detectar los tamaños foliculares. Seguidamente se seleccionó 1 o 2 animales que posean los tamaños foliculares (folículos pequeños 4-5mm, ovulatorios 7-10mm y regresión 12-6mm) para poder beneficiarlas. Así sucesivamente cada vez se realizaba el seguimiento ecográfico.

5.6.1.1 Metodología ecográfica

Se utilizó el modo B para la ecografía con una partición de la pantalla el lado izquierdo perteneciendo para el ovario izquierdo (OI) y el lado derecho para el ovario derecho (OD). Se inmovilizó al animal dentro de un brete y se procedió a lubricar el recto con gel ecográfico y se insertó el transductor. Se procedió a la identificación de la vejiga y cuernos uterinos. Seguidamente

se buscó los ovarios. Los ovarios fueron identificados por la presencia de folículos redondos y no ecogénicos, se congeló la imagen y se midió el diámetro folicular usando la regla milimétrica del ecógrafo (caliper) y luego se pasó al lado derecho. Repetimos los pasos anteriores hasta identificar el ovario derecho con folículos, se procedió a tomar la fotografía para la documentación. Se soltó al animal del brete. Se realizó los pasos anteriores para todos los animales.

5.6.1.1.1 Conformación de grupo

Los animales fueron divididos en tres grupos de acuerdo a su tamaño folicular. G1 (n=5) conformada por alpacas que a la ecografía y al momento del beneficio, poseen el tamaño folicular pequeño 4-5mm. G2 (n=5) poseen tamaño folicular ovulatorio 7-10mm y G3 poseen tamaño folicular en regresión 12 - 6mm.

5.6.1.1.2 Obtención de ovarios

El beneficio se realizó de acuerdo a las recomendaciones de Gil (2013) que indica desde la recepción, aturdimiento, degüello sangría, evisceración y enfriamiento de la canal, en el proceso de evisceración se priorizo la extirpación del útero con los ovarios sin dañarlos, los cuales se transporto en riñoneras al laboratorio para poder diseccionarla del saco ovárico y exponer a los folículos y medirlos con una regla Vernier.

5.6.1.1.3 Aspiración de líquido folicular

Con la ayuda de jeringas descartables se aspiró el líquido folicular de pequeños folículos, folículos ovulatorios y regresión. La introducción de la aguja se realizó por el parénquima ovárico y no por el mismo folículo. Ya que posee una presión ejercida por el líquido folicular y al introducirla directamente se produciría la explosión del folículo. El líquido obtenido se colocó en tubos eppendorf de 0.5 mL y 1.5 mL se mantuvo en cooler de Tecnopor con gel refrigerante a -10°C para luego ser transportados a la congeladora que se encuentra en el laboratorio de Anatomía

Veterinaria en el distrito de Marangani y poder almacenarlos a -20°C hasta su procesamiento para determinar el EGF y IGF.

5.6.2 Metodología en laboratorio

La determinación de la concentración de EGF e IGF-I se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Microscopía y Cromatografía de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria-Canchis de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ubicada en el distrito de Marangani a una altitud promedio 3 760 m.s.n.m. Se siguió el protocolo del fabricante Sigma-Aldrich del kit ELISA EGF de ratón y el kit ELISA IGF-I humano.

5.6.2.1 Análisis de concentración de factores de crecimiento epidermal e insulínico

Se procedió a retirar las muestras de la congeladora y dejar descongelar lentamente a temperatura de laboratorio durante la noche. Al día siguiente por la mañana se procedió a seleccionar los tubos eppendorf agrupándolos de acuerdo a su identificación de tamaño folicular.

a. Preparación de reactivos para EGF

Preparación de la solución tampón

El reactivo tampón se diluyó con agua destilada antes de usarlo para poder ser una solución tampón.

Dilución de muestra

se utilizó la solución tampón para poder diluir nuestras muestras y la preparación de las muestras estándar.

Preparación del estándar

Se agregó 400 μL de la solución tampón en el vial donde se encontraba la muestra estándar de EGF, se disolvió bien el polvo homogenizando suavemente para realizar un preparado de 50 ng/mL.

Se adicionó 16 μL del estándar EGF ya preparado a un tubo de ensayo que contiene 984 μL de la solución tampón, en el cual preparamos una muestra estándar de 800 pg/mL de concentración de EGF siendo la concentración más alta, a partir de esta concentración se realizó una serie de diluciones (Figura 13) homogenizando antes de la siguiente transferencia, la solución tampón sirvió como muestra estándar con una concentración de 0 pg/mL .

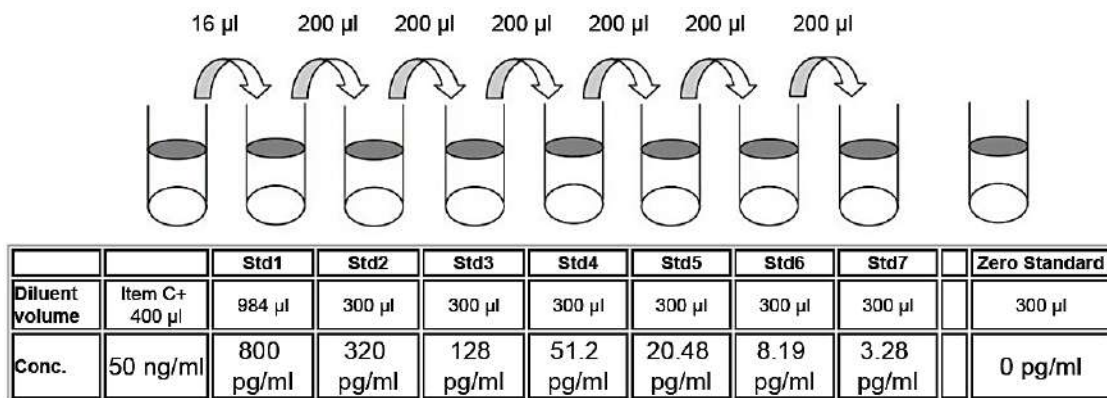


Figura 13. Dilución de las muestras estándar EGF

Preparación del anticuerpo de detección biotilado

Se homogenizó suavemente el vial que contiene el anticuerpo de detección biotilado antes de usarlo, se le agregó 100 μL de solución tampón con la pipeta aspiramos y devolvimos suavemente para homogenizar la mezcla (esta mezcla se utilizara en el paso 4 del procedimiento ELISA tipo sándwich) pág. 50.

Dilución de HRP-concentrado de estreptavidina

Se homogenizó brevemente el vial de concentrado de HRP-estreptavidina y se aspiró con la pipeta hacia arriba y hacia abajo para mezclar suavemente antes de usar, ya que se pueden formar precipitados. El concentrado de HRP-estreptavidina fue agregado 50 μL a un tubo de ensayo con 10 mL de solución tampón, así preparamos una solución de HRP-estreptavidina diluida 200 veces.

Una vez terminada la dilución de los estándares y preparación de los reactivos se procedió a seguir el siguiente procedimiento de ELISA tipo sándwich.

5.6.2.2 Procedimiento de ELISA tipo sándwich para EGF

1. Todos los reactivos y muestras estuvieron a temperatura ambiente (18 - 25 °C) antes de usarlos (Ilustración 1).

	1	2	3	4
A	STD1(800)	H10928	H10657	H1776
B	STD2(320)	H8207	H8449	H1776
C	STD3(128)	H8799	H7122	H9667
D	STD4(51.2)	H10684	H7122	H10116
E	STD5(20.48)	H10684	H4610	H8794
F	STD6(8.19)	H10312	H11171	H8794
G	STD7(3.28)	H10811	H11120	H6359
H	0 (0)	H8485	H3530	

Ilustración 1. Distribución de muestras en los pocillos de EGF las letras de la A – H corresponden a la denominación de la fila y los números de 1 – 4 corresponden a la denominación de la columna. La identificación de la alpaca se por su arete, el color verde indica folículos pequeños (4-5mm), el color amarillo indica folículos ovulatorios (7-10mm) y el color celeste indica folículos en regresión 12 mm - 6mm. La columna 1 pertenecen a los estándares de EGF (STD) concentración pg/mL establecidos por el protocolo.

2. Se agregó 100 µL de cada estándar y se muestreo en los pocillos apropiados. Se cubrió los pocillos y se incubo durante 2,5 horas a temperatura ambiente con agitación suave.

3. Se desechó la solución y se lavó 4 veces con solución tampón de lavado. Se Lavo llenando cada pocillo con tampón de lavado (300 µL) usando una pipeta multicanal. Después del último lavado, se eliminó cualquier resto de tampón de lavado decantando. Se invirtió la placa y con ligeros golpes secamos contra toallas de papel limpias.

4. Se agregó 100 µL del anticuerpo de detección a cada pocillo. Se cubrió los pocillos y se incubo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave.

5. Se desechó la solución. Se repitió el procedimiento de lavado como en el paso 3.

6. Se agregó 100 µL de solución de estreptavidina preparada a cada pocillo y se cubrió los pocillos y se incubo durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.

7. Se desechó la solución. Se repitió el lavado como en el paso 3.

8. Se agregó 100 μL de reactivo de sustrato de un solo paso TMB a cada pocillo y se cubrió los pocillos, se incubo durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación suave.

9. Se agregó 50 μL de solución de parada a cada pocillo. Inmediatamente se Llevó los pocillos para su lectura de la absorbancia a 450 nm (Sigma-Aldrich, 2022).

10. Se procedió a ordenar los datos de los estándares con su respectiva lectura de absorbancia (Tabla 2).

Estándar (STD) pg/mL(Y)	Densidad óptica	Densidad óptica corregida(X)
800	1.545	1.472
320	1.092	1.019
128	0.544	0.471
51.2	0.265	0.192
20.48	0.177	0.104
8.19	0.109	0.036
3.28	0.075	0.002
0	0.073	0

Tabla 2. Concentración de los estándares EGF la densidad óptica corregida resulto de los valores de la densidad óptica > 3 pg/mL. menos el resultado de la densidad óptica del estándar 0.

11. Se obtuvo la ecuación $y = 485.26x - 33.535$ de los datos de los estándares, donde el eje “Y” concentración de los estándares en pg/mL y eje “X” densidad óptica corregida (Figura 14). El cálculo de la concentración para EGF de nuestras muestras se obtuvieron usando la ecuación y reemplazando “x” por el valor de la absorbancia de EGF de nuestras muestras (Anexo 13,14 y 15).

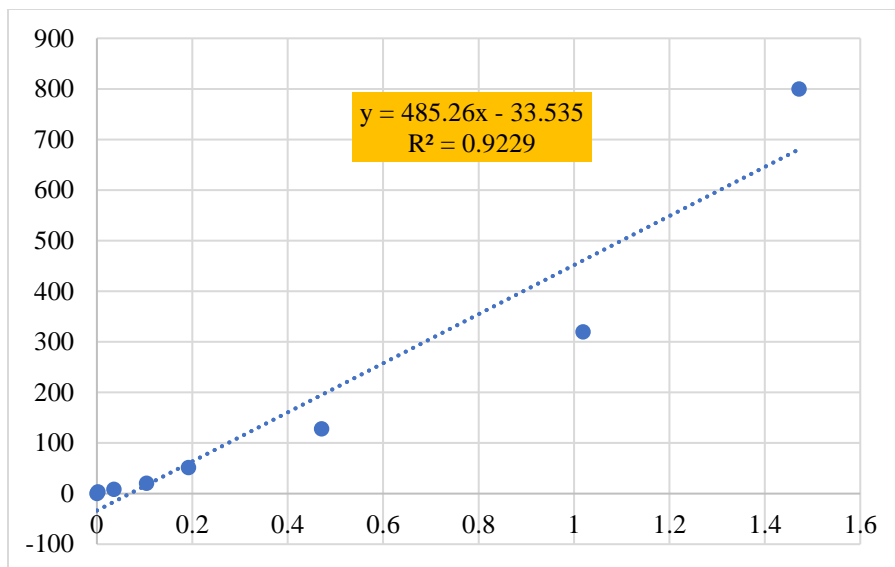


Figura 14. Regresión lineal simple EGF Esta curva estándar de concentración de EGF frente a densidad óptica lo utilizamos para estimar las concentraciones de EGF en el líquido folicular de los folículos presentes en los ovarios de la alpaca.

12. Se calculo el valor mínimo detectable de acuerdo al protocolo del fabricante del kit EGF, el cual indica que se debe aumentar dos desviaciones estándar de las muestras. Siendo 0.013 nm, el cual se sumará a nuestras densidades ópticas menores de 0.070nm. esto para poder recuperar los valores negativos de algunas muestras, ya que algunas concentraciones salen negativas.

b. Preparación de reactivos para IGF-I

Preparación de la solución tampón

Este reactivo viene listo para usar.

Dilución de muestra

La solución tampón se utilizó para la dilución de nuestras muestras y para la preparación de las muestras estándar.

Preparación del estándar

Se Homogenizó brevemente el vial que contiene la muestra estándar. Se Agregó 400 uL de la solución tampón en la muestra estándar y así se realizó un preparado de muestra estándar de 100 ng/mL.

Retiramos 150 uL del preparado de muestra estándar IGF-I y lo transferimos a un tubo con 350 uL de la solución tampón que se encuentra en un tubo de ensayo, este tubo de ensayo tiene una concentración de muestra estándar de 30 ng/mL y a partir de este producimos una serie de diluciones (Figura 15). Se mezcló cada tubo antes de la próxima transferencia. La solución tampón nos sirvió como estándar cero (0 ng/mL)

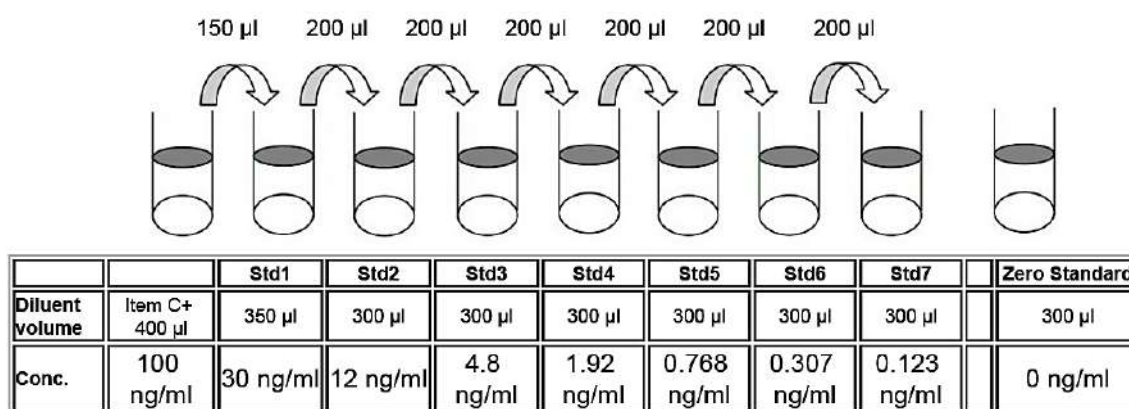


Figura 15. Dilución de las muestras Estándar IGF-1

Preparación del anticuerpo de detección biotinilado.

Se homogenizó el vial de detección de anticuerpos antes de usarlo y se Agregó 100 uL de solución tampón en el vial para preparar un concentrado de anticuerpos de detección. Este preparado se usó en el procedimiento de ELISA tipo sándwich en el paso 4 (pág.54).

Dilución de HRP-concentrado de estreptavidina

Se homogenizó el vial de concentrado de HRP-estreptavidina y se utilizó una pipeta para mezclar suavemente antes de usarlo, ya que se pueden formar precipitados se realizó la dilución con la solución tampón.

Una vez terminada la preparación de los estándares se procedió a seguir el siguiente procedimiento de ensayo de sándwich.

5.6.2.3 Procedimiento de ELISA tipo sándwich IGF-I

1. Todos los reactivos y muestras estuvieron a temperatura ambiente (18 - 25 °C) antes de usarlos. Se realizó el análisis por duplicado (Ilustración 2).

	1	2	3	4	5	6	7
A	STD1(30)	STD5(0.768)	H10928	H10684	H8485	H11120	H8794
B	STD1(30)	STD5(0.768)	H8207	H10684	H8485	H3530	H8794
C	STD2(12)	STD6(0.307)	H8207	H10312	H10657	H1776	H8794
D	STD2(12)	STD6(0.307)	H8207	H10312	H8449	H1776	H8794
E	STD3(4.8)	STD7(0.123)	H8799	H10312	H7122	H1776	H9088
F	STD3(4.8)	STD7(0.123)	H8799	H10811	H7122	H9667	H9088
G	STD4(1.92)	0(0)	H8799	H6359	H4610	H10116	
H	STD4(1.92)	0(0)	H10684	H6359	H11171	H10116	

Ilustración 2. Distribución de muestras en los pocillos de IGF Las letras de la A – H corresponden a la denominación de la fila y los números de 1 – 7 corresponden a la denominación de la columna. La identificación del animal es por su arete, el color verde indica folículos pequeños (4-5mm), el color amarillo indica folículos ovulatorios (7-10mm) y el color celeste indica folículos en regresión 12 mm - 6mm. Las columnas 1- 2 pertenecen a los estándares (STD) concentración ng/mL.

2. Se agregó 100 uL de cada estándar y se muestreo en los pocillos apropiados y se cubrió los pocillos luego se incubo durante 2,5 horas a temperatura ambiente con agitando suavemente.

3. Se desechó la solución y se lavó 4 veces con solución de lavado. Se Lavó llenando cada pocillo con solución tampón (300 uL) y se usó una pipeta multicanal. Después del último lavado, se eliminó cualquier resto de tampón de lavado decantando. Se Invierto la placa y secamos contra papel toalla con ligeros golpes.

4. Se agregó 100 uL de Anticuerpo de Detección preparado a cada pocillo. Se Cubrió los pocillos y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente agitando suavemente.

5. Se desechó la solución y se repitió el procedimiento de lavado como en el paso 3.

6. Se agregó 100 uL de solución de estreptavidina preparada a cada pocillo y cubrimos los pocillos y se incubo durante 45 minutos a temperatura ambiente agitando suavemente.

7. Se desechó la solución y se repitió el lavado como en el paso 3.

8. Se agregó 100 uL de reactivo de sustrato de un solo paso TMB (artículo H) a cada pocillo y se cubrió los pocillos e incubamos durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad agitando suavemente.

9. Se agregó 50 uL de solución de parada a cada pocillo. Inmediatamente se llevó los pocillos para su lectura de la absorbancia a 450 nm (Sigma-Aldrich, 2022).

10. Se procedió a ordenar los datos de los estándares con su respectiva lectura de absorbancia como se realizó en duplicado se procedió a sacar el promedio de la densidad óptica luego se restó con el promedio del estándar 0 para obtener un valor real de densidad óptica (Tabla 3).

Estándar (STD) ng/mL(Y)	Densidad óptica	Promedio densidad óptica	Densidad óptica corregida(X)
30	0.813	0.812	0.745
	0.811		
12	0.768	0.768	0.701
	0.768		
4.8	0.572	0.5855	0.5185
	0.599		
1.92	0.413	0.434	0.367
	0.455		
0.768	0.271	0.2615	0.1945
	0.252		
0.307	0.162	0.1775	0.1105
	0.193		
0.123	0.105	0.1035	0.0365
	0.102		
0	0.067	0.067	
	0.067		

Tabla 3. Concentración de las muestras estándar del kit IGF-I

11. Se obtuvo la ecuación $y = 28.714x - 3.3544$ de regresión lineal simple de los datos de los estándares, donde el eje “Y” concentración de los estándares en ng/mL y eje “X” valor real (Figura 16). La concentración para IGF-I de nuestras muestras se obtuvieron usando la ecuación y reemplazando “x” por el valor de la absorbancia de IGF-I de nuestras muestras (Anexo13,14 y 15)

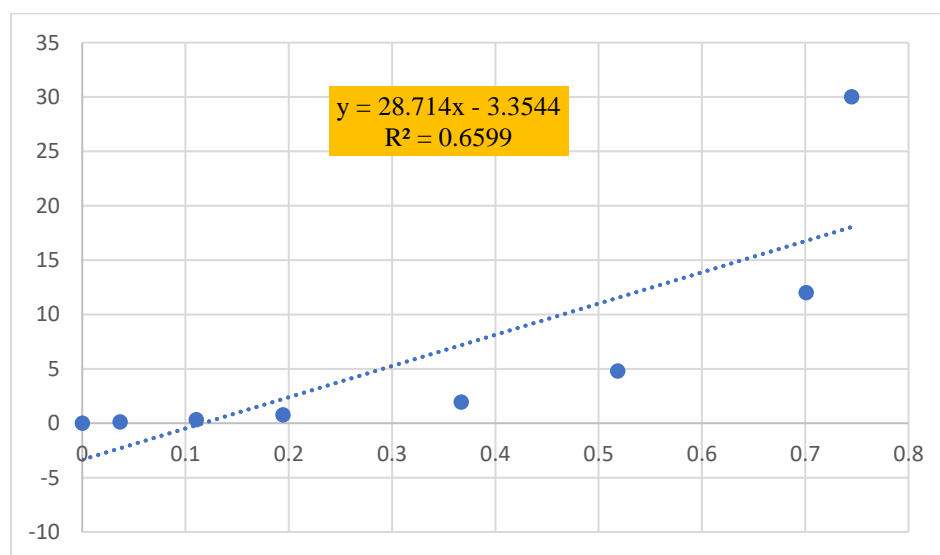


Figura 16. Regresión lineal simple IGF-I. Esta curva estándar de concentración de IGF-I frente a densidad óptica lo utilizamos para estimar las concentraciones de muestras de líquido folicular de los folículos presentes en los ovarios de la alpaca.

12. Se calculo el valor mínimo detectable de acuerdo al protocolo del fabricante del kit IGF-I, el cual indica que se debe aumentar dos desviaciones estándar de las muestras, siendo 0.0936nm el cual se sumara a nuestras densidades ópticas menores de 0.155nm. esto para poder recuperar las concentraciones negativas de algunas muestras.

5.7 Diseño Experimental

5.7.1 Análisis estadístico de datos

Los datos de los estándares del kit de ELISA EGF e IGF-I, y niveles de absorbancia de las muestras de líquido folicular fueron sometidos a la ecuación de regresión lineal simple. Utilizando el Software Microsoft Excel. Estos resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y para comparar medias se utilizó la prueba de Tukey, utilizando el paquete estadístico NCSS (Number Crunching Statistical System) Layton, UT, USA Anexo (16 y 17). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$ para EGF y para IGF-I.

CAPITULO VI
RESULTADOS Y DISCUSION

6 Resultados

6.1 Resultados EGF

Al realizar un análisis comparativo de las concentraciones de EGF de folículos pequeños, ovulatorios y en regresión los resultados evidencian que la mayor concentración de EGF se encuentra en folículos pequeños y no habiendo una diferencia con folículos ovulatorios, pero si existiendo diferencia significativa ($p < 0.05$) en relación con folículos en regresión, esto se representa en la Tabla 4 y Figura 17.

n	Factor de crecimiento	Medidas de tendencia central	Folículos pequeños (4 – 5mm)	Folículos ovulatorios (7 – 10 mm)	Folículos en regresión (12 – 6mm)	P valor
		\bar{x}	3.927072 ^b	3.732968 ^b	0.91846 ^a	0.000008*
15	EGF pg/mL	DE	0.405998	0.797364	0.594320	
		CV%	10.338431	21.360042	64.708283	
		EE	0.181568	0.356592	0.265788	

Tabla 4. Concentración de EGF en el líquido folicular ovárico de alpaca en folículos pequeños, ovulatorios y regresión. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre los diferentes momentos del desarrollo folicular, diferencia significativa $p < 0.05$ *. promedio (\bar{x}), desviación estándar (DE), coeficiente de variación en porcentaje (CV%) y error estándar (EE).

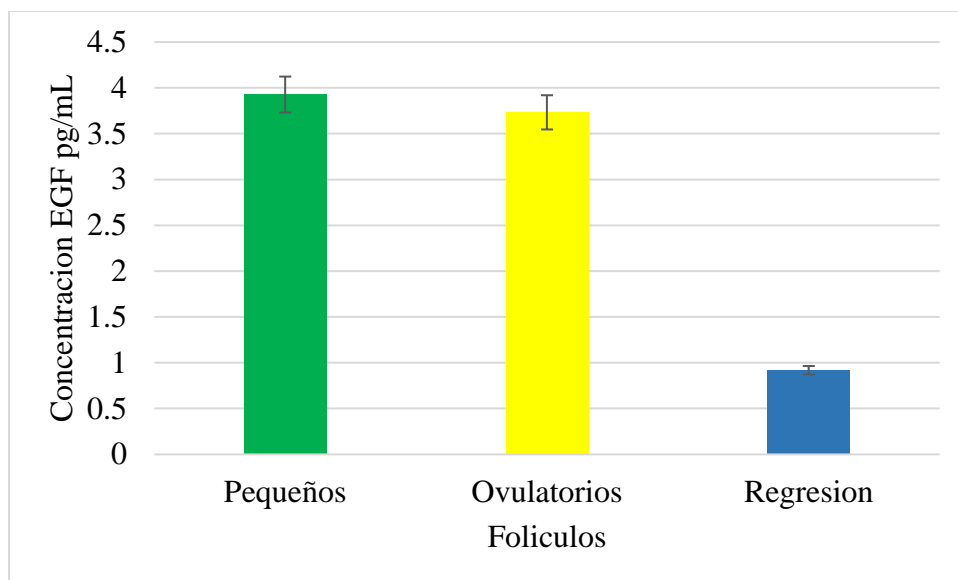


Figura 17. Concentración de EGF en el líquido folicular ovárico de alpacas en folículos pequeños, ovulatorios y en regresión. Cada tiempo de desarrollo folicular tiene determinada concentración, siendo mayor en pequeños, en la etapa ovulatoria existe una ligera disminución y en la etapa de regresión existe una marcada disminución de la concentración de EGF.

6.2 Resultados IGF-I

Al realizar un análisis comparativo de las concentraciones de IGF-I de folículos pequeños, ovulatorios y en regresión los resultados evidencian que estadísticamente no existe una diferencia significativa entre los grupos de estudio ya que ($p > 0.05$) esto se representa en la Tabla 5 y Figura 18.

n	Factor de crecimiento	Medidas de tendencia central	Folículos pequeños (4 – 5mm)	Folículos ovulatorios (7 – 10 mm)	Folículos en regresión (12 – 6mm)	P valor
		\bar{x}	1.274297 ^a	1.337468 ^a	1.498266 ^a	0.4413
15	IGF-I	DE	0.119431	0.328898	0.325242	
	ng/mL	CV%	9.372299	24.591065	21.707914	
		EE	0.053411	0.147087	0.145453	

Tabla 5. Concentración de IGF-I en el líquido folicular ovárico de alpaca en folículos pequeños, ovulatorios y en regresión. Letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre los diferentes

momentos del desarrollo folicular, $p > 0.05$. promedio (\bar{x}), desviación estándar (DE), coeficiente de variación en porcentaje (CV%) y error estándar (EE).

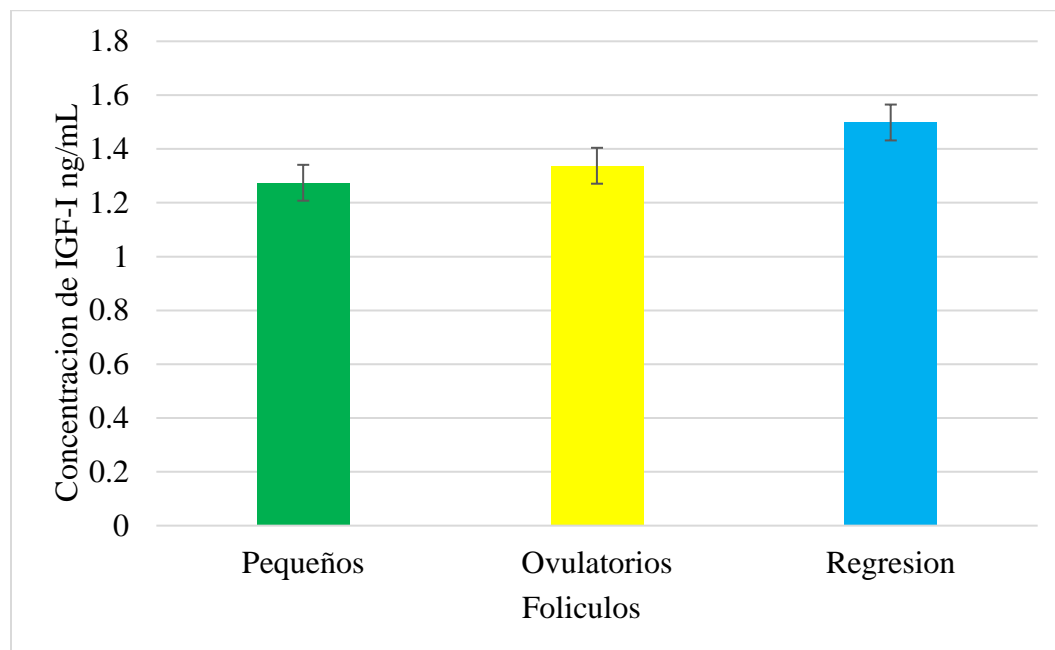


Figura 18. Concentración de IGF-I en los tres diferentes tiempos del desarrollo folicular ovárico de alpacas

6.3 Discusión

6.3.1 Determinar la concentración de EGF en el líquido folicular de folículos pequeños (4-5mm), folículos ovulatorios (7-10mm) y folículos en regresión (12-6mm)

Los resultados del presente estudio, son los primeros reportes en la determinación de la concentración del EGF en líquido folicular de alpacas. En referencia a los tres estadios foliculares se observa que entre folículos pequeños y ovulatorios no existe diferencia significativa, mientras que en folículos en regresión frente a estos dos estadios hay diferencia significativa $p < 0.05$. Estudios realizados por Hsu et al, (1987) reportó una alta concentración de EGF en folículos pequeños de porcinos con una diferencia significativa $p < 0.01$, con folículos ovulatorios. Lo que significa que el EGF es sintetizado en pequeños folículos antrales y el EGF actúa como un importante regulador paracrino y/o autocrino del desarrollo de folículos con diámetros inferiores

de 5-6 mm y que estimula la maduración de los ovocitos y la expansión de las células del cúmulus (Westergaard et al., 1990).

De modo que las diferencias en la concentración de EGF pueden atribuirse a que en las células del complejo cumulo ovocitario (COCs) de pequeños folículos de porcinos y ovinos tienen poca capacidad para regular y responder a la señalización de EGF, a medida que el ovocito progresa en la capacitación ovocitaria este produce potentes factores paracrinos que permiten la funcionalidad del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidermal) y las COCs adquieren la capacidad de responder al EGF (Ritter et al., 2015 y Rouhollahi et al., 2020) al igual que puede suceder en alpacas ya que una concentración más elevada se encuentra en folículos pequeños, y a medida que el folículo pasa a ser ovulatorio las concentraciones disminuyen, esto ya que los receptores están más adaptados para transmitir la señal de EGF y el EGF libre en líquido folicular disminuirá, como indica Hsieh et al., (2009) que el EGF es importante en la amplificación inicial de la LH, ayudando a la maduración del ovocito. Lo que puede suceder en alpacas ya que el EGF disminuye su concentración en folículos ovulatorios, esto ya que actúa amplificando la LH inicial en el folículo ovulatorio. Ya que la LH se encuentra en concentraciones basales y el pico de LH se dará por la copula (Bravo et al., 1990b)

Por otra parte la FSH y los factores paracrinos secretados por los ovocitos cooperan para establecer la funcionalidad del receptor de EGF en las células del cúmulo (Sugimura et al., 2018), estos factores paracrinos secretados por el ovocito son el BMP15 (proteína morfogenética ósea 15) GDF9 (factor de diferenciación de crecimiento 9) los cuales son secretados en baja cantidad por los ovocitos que se encuentran en folículos pequeños, estos aumentarían en folículos grandes para que las células del cúmulo puedan proliferarse y expandirse (Sugimura et al., 2015; Sugimura et

al., 2018 y Richani & Gilchrist, 2018). Lo que, en alpacas el EGF mejora la obtención de ovocitos competentes (Huamaní, 2022).

En el caso de folículos en regresión de la alpaca, las células del COCs poseen suficientes EGFR en el cual el EGF se encuentra unido generando una función antiapoptótica en estas, así como indica Flores et al., (2005) que el EGF ayuda a la supervivencia de las células de la granulosa evitando la apoptosis, esto explicaría la baja concentración de EGF en líquido folicular de folículos en regresión. Por lo tanto, la disminución de la concentración de EGF en el folículo en regresión de alpacas sería por el mismo proceso de regresión, ya que se degeneran irreversiblemente las células del COCs, granulosa y tecales, que es un proceso paulatino, que se extiende por todo el folículo por el cual este pierde su integridad y funcionalidad (Rosales & Guzmán, 2008). En la actualidad no se toma en cuenta el tamaño folicular al momento de seleccionar un ovocito para cultivos *in vitro*, entonces existe una alta probabilidad de que se obtenga ovocitos de alpacas viables para los cultivos *in vitro* al tomar en cuenta los tamaños foliculares que van de 4 mm hasta los 10 mm (Huamaní, 2022)

Por lo tanto, podemos asumir que las diferencias en la concentración entre los diferentes tamaños foliculares implican una regulación local de su actividad (Reeka et al., 1998) y que el EGF actúa en el mecanismo molecular de maduración de ovocitos (Richani & Gilchrist, 2018).

6.3.2 Determinar la concentración de IGF-I en el líquido folicular de folículos pequeños (4-5mm), folículos ovulatorios (7-10mm) y folículos en regresión (12-6mm)

Los resultados del presente estudio, son los primeros reportes en la determinación de la concentración de IGF-I en líquido folicular de alpacas. No se encontró diferencias significativas en cuanto a la concentración de IGF-I entre los grupos de folículos pequeños, ovulatorios y en regresión ($p > 0.05$), lo que coincide con El-Bahr et al, (2015) reporto concentraciones de IGF-I en

dromedarios en diferentes tamaños foliculares, en los cuales no observo diferencia significativa. De modo similar Ghoneim et al, (2012) reporto concentraciones de IGF-I en dromedarios en los cuales no encontró diferencia significativa entre los diferentes tamaños foliculares. Del mismo modo Monget et al, (1993), quienes indican que las concentraciones de IGF-I en ovinos no variaron significativamente ni con el tamaño ni con el grado de atresia del folículo. En consecuencia, el IGF-I participa en la selección del folículo dominante, lo que sugiere que en ovinos y alpacas el IGF-I juega un papel importante en la selección del folículo dominante (Mazerbourg & Monget, 2018).

Sin embargo, Hammond et al., (1985) trabajando con cerdos, encontraron una mayor concentración de IGF-I en folículos preovulatorios respecto a folículos pequeños ($p < 0.05$), esta diferencia podría atribuirse a que en cerdos las células de la granulosa de los folículos más grandes expresan más marcadores de maduración, como el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-I) y, por lo tanto, están más diferenciadas (Costermans et al., 2019). al igual que sucede en otras especies como bovinos de leche (Echternkamp et al., 1994); bovinos de carne (Sudo et al., 2007) y yeguas (Spicer et al., 2005).

De lo anterior resulta que, las concentraciones de las proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP) tipo 2 (IGFBP-2) y tipo 4 (IGFBP-4) en el líquido folicular disminuyen fuertemente durante el crecimiento folicular, lo que lleva a un aumento de la biodisponibilidad del IGF, la disminución de estas IGFBP se debe a una disminución en la expresión del ARNm (IGFBP-2) y a un aumento en la degradación proteolítica por PAPP-A en el líquido folicular (IGFBP-2, IGFBP-4 e IGFBP-5) (Mazerbourg & Monget, 2018). Entonces la biodisponibilidad de IGF-I hará que exista un aumento del estradiol, esto por la capacidad del IGF-I de crear sinergia con la FSH para promover el desarrollo folicular y la síntesis de estradiol, lo

que sucede también en dromedarios (Fortune et al., 2004; Kafi et al., 2014). la expresión de PAPP-A estimulada por FSH es un factor clave para el sistema IGF-I en el desarrollo folicular bovino, el IGF-I aumenta la liberación de LH estimulada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Lenz et al., 2007; Sudo et al., 2007). lo que no sucede en alpacas ya que estas tienen un tipo de ovulación inducida y la liberación de LH se dará por la copula (Bravo et al., 1990b).

Sin embargo, en todos los casos, las diferencias entre los niveles de IGF-I en los diversos tamaños foliculares y en su líquido folicular son pequeñas, y las concentraciones de IGF-I en el líquido folicular medidas están siempre dentro del rango de las que han demostrado ser eficaces para estimular la proliferación y la esteroidogénesis en las células de la granulosa in vitro (Monget et al., 2002)

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7 Conclusiones

1. El factor de crecimiento epidermal (EGF) se encuentra en una concentración mayor en líquido folicular de folículos pequeños y ovulatorios sin diferencia significativa, en el caso de folículos en regresión la concentración de EGF es baja comparado con los folículos pequeños y ovulatorios.
2. La concentración del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) en el líquido folicular ovárico de alpacas es similar en folículos pequeños, ovulatorios y en regresión sin cambios notables, no habiendo diferencia significativa.

7.1 Recomendaciones

1. Replicar el estudio con una muestra mayor para observar si existe variación en las concentraciones de EGF e IGF-I y realizar la comparación de las concentraciones en el líquido folicular y sangre, esto para saber si la síntesis de estos factores de crecimiento se puede dar en otros órganos o son sintetizados netamente por células del folículo, en alpacas.
2. Realizar un estudio en las proteínas de unión a la IGF-I IGFBPs en el líquido folicular de alpacas en folículos pequeños, ovulatorios y regresión
3. Realizar estudios utilizando los EGF e IGF-I en el enriquecimiento de medios de cultivo de maduración *in vitro* de ovocitos y que funciones desempeñan en el desarrollo y maduración de ovocitos, en alpacas.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFIA

- Aba M.A. 2014. Anatomy and physiology of reproduction in the female llama and alpaca. Llama and alpaca care. *Reproduction* (1), 140-146.
- Aba, M.A., 1995. Studies on the Reproductive Endocrinology of Llamas and Alpacas from Mating Throughout Early Pregnancy. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Adams, G. P., Griffin, P. G., & Ginther, O. J. (1989). In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus, and cervix in llamas. *Biology of Reproduction*, 41(3), 551–558. Doi:10.1095/biolreprod41.3.551
- Adams, G. P., Sumar, J., & Ginther, O. J. (1990). Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 90(2), 535–545. Doi:10.1530/jrf.0.0900535
- Ambekar, A. S., Nirujogi, R. S., Srikanth, S. M., Chavan, S., Kelkar, D. S., Hinduja, I., Mukherjee, S. (2013). Proteomic analysis of human follicular fluid: A new perspective towards understanding folliculogenesis. *Journal of Proteomics*, 87. 68–77. doi: 10.1016/j.jprot.2013.05.017
- Andric, N., & Ascoli, M. (2008). The luteinizing hormone receptor-activated extracellularly regulated kinase-1/2 cascade stimulates epiregulin release from granulosa cells. *Endocrinology*, 149(11), 5549–5556. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0618>
- Armstrong, D. T., Xia, P., de Gannes, G., Tekpetey, F. R., & Khamsi, F. (1996). Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. *Biology of reproduction*, 54(2), 331–338. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.2.331>
- Beg, M. A., & Ginther, O. J. (2006). Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction* (Cambridge, England), 132(3), 365–377. Doi: 10.1530/rep.1.01233

- Beg, M. A., Bergfelt, D. R., Kot, K., & Ginther, O. J. (2002). Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biology of Reproduction*, 66(1), 120–126. Doi:10.1095/biolreprod66.1.120
- Bendell, J. J., & Dorrington, J. H. (1990). Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *Endocrinology*, 127, 533-540.
- Bevers, M. M., Dieleman, S. J., van den Hurk, R., & Izadyar, F. (1997). Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, (47)(1). 13–22. doi:10.1016/s0093-691x(96)00335-4
- Boonstra, J., Rijken, P., Humbel, B., Cremers, F., Verkleij, A., & van Bergen en Henegouwen, P. (1995). The epidermal growth factor. *Cell Biology International*, 19(5), 413–430. Doi:10.1006/cbir.1995.1086
- Botella Llusiá, J. (1995). *El Ovario: Fisiología y Patología*. Ediciones Díaz de Santos.
- Bravo P. W, Fowler M. E, Stabenfeldt G. H, Lasley B. L. (1990a). Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biology Reproduction*, 43(4). 579-585.
- Bravo W, Fowler ME, Stabenfeldt GH, Lasley BL. 1990b. Endocrine responses in the llama to copulation. *Theriogenology*. 33: 891-899.
- Bravo, PW, Sumar, J., (1989). Examen laparoscópico del ovario actividad en alpacas. *Anim. Reprod. Sci*, 21. 271-281.
- Braw-Tal, R. (2002). The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1–2), 11–18. Doi:10.1016/s0303-7207(01)00699-2
- Bustinza, V. (2001). La alpaca conocimiento del gran potencial andino. *Universidad nacional del Altiplano*, 177-180.
- Carpenter, G., & Wahl, M. I. (1991). The Epidermal Growth Factor Family. *Peptide Growth Factors and Their Receptors I*, 69–171. Doi:10.1007/978-1-4612-3210-0_4
- Carpenter, G., & Cohen, S. (1979). Epidermal growth factor. *Annual Review of Biochemistry*, 48(1), 193–216. Doi:10.1146/annurev.bi.48.070179.001205
- Chaves, M. G., Aba, M., Agüero, A., Egey, J., Berestin, V., & Rutter, B. (2002). Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. *Animal Reproduction Science*, 69(1–2), 37–46. Doi:10.1016/s0378-4320(01)00173-7

- Chun, S. Y., Eisenhauer, K. M., Minami, S., Billig, H., Perlas, E., & Hsueh, A. J. (1996). Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*, 137(4), 1447–1456. Doi:10.1210/endo.137.4.8625923
- Combelles, C. M. (2013). The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, 56(10-11-12), 819–831.
- Costermans, N. G. J., Keijer, J., van Schothorst, E. M., Kemp, B., Keshtkar, S., Bunschoten, A., Soede, N. M., & Teerds, K. J. (2019). In ovaries with high or low variation in follicle size, granulosa cells of antral follicles exhibit distinct size-related processes. *Molecular human reproduction*, 25(10), 614–624. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaz042>
- Das, K., Phipps, W. R., Hensleigh, H. C., & Tagatz, G. E. (1992). Epidermal growth factor in human follicular fluid stimulates mouse oocyte maturation in vitro. *Fertility and sterility*, 57(4), 895–901. Doi: 10.1016/s0015-0282(16)54977-2
- Donadeu, F., & Ginther, O. (2002). Changes in concentrations of Follicular fluid factors during follicle selection in mares. *Biology of Reproduction*, 66, 1111-1118. doi:10.1095/biolreprod66.4.1111
- Driancourt, M. A., & Thuel, B. (1998). Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. *Reproduction, nutrition, development*, 38(4), 345–362. Doi: 10.1051/rnd:19980401
- Ebner, T., Moser, M., & Tews, G. (2006). Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reproductive Biomedicine Online*, 12(4), 507–512. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)62006-8](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)62006-8)
- Echternkamp, S. E., Howard, H. J., Roberts, A. J., Grizzle, J., & Wise, T. (1994). Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. *Biology of reproduction*, 51(5), 971–981. Doi: 10.1095/biolreprod51.5.971
- Edwards, R. G. (1974). Follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, 37(1), 189–219. Doi:10.1530/jrf.0.0370189

- El-Bahr, S.M., Ghoneim, I.M., and Waheed, M.M. (2015). Biochemical and hormonal analysis of the follicular fluid and serum of dromedary females (*Camelus dromedarius*) with ovarian follicles of different sizes. *Animal Reproduction Science*, 159, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.06.002>
- Espinoza V, J. L., Ortega Pérez, R., Palacios Espinosa, A., Valencia Mendez, J., & Aréchiga Flores, C. F. (2007). Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos. *Interciencia*, 32(2), 93-99.
- Evron, A., Blumenfeld, Z., Adashi, EY y Kol, S. (2015). El papel de los factores de crecimiento en la función y el desarrollo ovárico. *La Biblioteca Global de Medicina de la Mujer*. <https://doi.org/10.3843/glowm.10288>
- Fahiminiya, S., & Gérard, N. (2010). Follicular fluid in mammals. *Gynecology, Obstetrics & Fertility*, 38 (6), 402–404. doi: 10.1016/j.gyobfe.2010.04.010
- Feng, P., Knecht, M., & Catt, K. (1987). Hormonal control of epidermal growth factor receptors by gonadotropins during granulosa cell differentiation. *Endocrinology*, 120(3), 1121–1126. doi:10.1210/endo-120-3-1121
- Fernandez, A. (2003). Dinamica folicular funcionamiento y regulacion. Departamento de reproduccion animal Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Field, S. L., Dasgupta, T., Cummings, M., & Orsi, N. M. (2014). Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation: Cytokines in Folliculogenesis. *Molecular Reproduction and Development*, 81(4), 284–314. <https://doi.org/10.1002/mrd.22285>
- Findlay, J. K. (1993). An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biology of Reproduction*, 48(1), 15–23. Doi:10.1095/biolreprod48.1.15
- Flores, I. F., Rosas, C., Romano, M. C., Pérez, M. (2005). Apoptosis y atresia folicular Un binomio esencial en el desarrollo ovárico. *Medigraphic.com, vet mex*. 36(1), 87- 103.
- Fortune, J. E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*, 50(2), 225–232. Doi:10.1095/biolreprod50.2.225
- Fortune, J. E., Rivera, G. M., & Yang, M. Y. (2004). Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal reproduction science*, 82-83, 109–126. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.031>

- Fortune, J. E., Rivera, G. M., Evans, A. C., & Turzillo, A. M. (2001). Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction*, 65(3), 648–654. Doi:10.1095/biolreprod65.3.648
- García S, A., Castejón Montijano, F., De la Cruz Palomino, L. F., Gonzales Gallegos, J., & Murillo López de Sinales, D. M. (2018). *FISIOLOGIA VETERINARIA*. Madrid: TEBAR FLORES.
- Gérard, N., Delpuech, T., Oxvig, C., Overgaard, M. T., & Monget, P. (2004). Proteolytic degradation of IGF-binding protein (IGFBP)-2 in equine ovarian follicles: involvement of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and association with dominant but not subordinated follicles. *The Journal of Endocrinology*, 182(3), 457–466. Doi:10.1677/joe.0.1820457
- 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 (^1H NMR). *Reproduction*, 124(2), 241–248. Doi:10.1530/rep.0.1240241
- 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 (^1H NMR). *Reproduction*, 124(2), 241–248. Doi:10.1530/rep.0.1240241
- Gigli, I., Russo, A., & Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *Investigación veterinaria*, 183-204.
- Gil, B., Isabel, M. (2013). Propuesta de un matadero de alpacas y planta de elaboración de charqui mediante el uso de las tecnologías apropiadas para el distrito de Cotaruse (departamento de Apurímac, Perú). Universidad de Valladolid.
- Gilbert, S. F. (2005). *Biología del desarrollo*. Ed. Médica Panamericana.
- Ginther, O. J. (1992). *Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects*. Cross Plains, Wis: Equiservices.
- Ginther, O. J., Bergfelt, D. R., Kulick, L. J., & Kot, K. (1998). Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. *Theriogenology*, 50(4), 507–519. Doi:10.1016/s0093-691x(98)00157-5

- Ginther, O. J., Knopf, L., & Kastelic, J. P. (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, 87(1), 223–230. Doi:10.1530/jrf.0.0870223
- Ginther, O. J., Wiltbank, M. C., Fricke, P. M., Gibbons, J. R., & Kot, K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, 55(6), 1187–1194. Doi:10.1095/biolreprod55.6.1187
- Glister, C., Tannetta, D. S., Groome, N. P., & Knight, P. G. (2001). Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 65(4), 1020–1028. Doi:10.1095/biolreprod65.4.1020
- Guillén, C. Y., (2018). Efecto de factores de crecimiento sobre la tasa de maduración de ovocitos y desarrollo embrionario in vitro de alpaca [tesis pre grado, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2841>
- Ghoneim, I.M., Waheed, MM, El-Bahr, SM, Alhaider, A.K., and Al-Eknah, MM (2013). Comparison of some biochemical and hormonal components of large follicles and preovulatory follicles in camels (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*, 79(4), 647–652.
- Gong, J. G., Bramley, T. A., Wilmut, I., & Webb, R. (1993). Effect of recombinant bovine somatotropin on the super ovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biology of Reproduction*, 48(5), 1141–1149. Doi:10.1095/biolreprod48.5.1141
- Gore-Langton, R.E. and Armstrong, D.T. (1994) Follicular Steroidogenesis and Its Control. In: Knobil, E. and Neill, J.D., Eds., the *Physiology of Reproduction*, 2nd Edition, Raven Press, Ltd., New York, 571-627.
- Gosden, R. G., Hunter, R. H., Telfer, E., Torrance, C., & Brown, N. (1988). Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82(2), 813–825. Doi:10.1530/jrf.0.0820813
- Gospodarowicz, D., & Moran, J. S. (1976). Growth factors in mammalian cell culture. *Annual Review of Biochemistry*, 45(1), 531–558. Doi:10.1146/annurev.bi.45.070176.002531
- Hafez, E. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales domésticos*. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana editores.

- Hammond, J. M., Baranao, J. L., Skaleris, D., Knight, A. B., Romanus, J. A., & Rechler, M. M. (1985). Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 117(6), 2553–2555. Doi: 10.1210/endo-117-6-2553
- Hammond, J. M., Baranao, J. L., Skaleris, D., Knight, A. B., Romanus, J. A., & Rechler, M. M. (1985). Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 117(6), 2553–2555. Doi:10.1210/endo-117-6-2553
- Hammond, J. M., Hsu, C. J., Mondschein, J. S., & Canning, S. F. (1988). Paracrine and autocrine functions of growth factors in the ovarian follicle. *J. Anim. Sci.* (66), 21-31.
- Hammond, J. M., Mondschein, J. S., Samaras, S. E., & Canning, S. F. (1991). The ovarian insulin-like growth factors, a local amplification mechanism for steroidogenesis and hormone action. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 40(1–3), 411–416. doi:10.1016/0960-0760(91)90209-n
- Hanco, E., Llacsá, J., Quispe, Y., Pérez D, M., Luque M, N., Pérez G, U. (2015). Dinámica folicular ovárica en alpacas de la raza Suri (*Vicugna pacos*). *SPERMOVA*. 5. 51-54. Doi: 10.18548/asp/0002.11.
- Herrler, A., Lucas-Hahn, A, Niemann, H. (1992). Effects of insulin-like growth factor-I on in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 37(6), 1213-24.
- Hill, D. J. (1989). Growth factors and their cellular actions. *Reproduction*, 85(2), 723-734.
- Hsu, C. J., & Hammond, J. M. (1987). Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology*, 120(1), 198–207. Doi:10.1210/endo-120-1-198
- Hsu, C. J., Holmes, S. D., & Hammond, J. M. (1987). Ovarian epidermal growth factor-like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochemical and biophysical research communications*, 147(1), 242–247. Doi: 10.1016/s0006-291x(87)80112-2
- Hsieh, M., Zamah, A. M., & Conti, M. (2009). Epidermal growth factor-like growth factors in the follicular fluid: role in oocyte development and maturation. *Seminars in reproductive medicine*, 27(1), 52–61. Doi: 10.1055/s-0028-1108010

- Huamaní Mallma, D. D. (2022). Influencia de los medios y proporción hormonal en el fluido folicular sobre la competencia de ovocitos de alpaca in vitro [tesis doctoral, Universidad Nacional Agraria la Molina]. Repositorio Institucional UNALM. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/5612>
- Hutt, K. J., & Albertini, D. F. (2007). An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reproductive Biomedicine Online*, 14(6), 758–764. Doi:10.1016/s1472-6483(10)60679-7
- Inoue, Y., Miyamoto, S., Fukami, T., Shiota, K., Yotsumoto, F., & Kawarabayashi, T. (2009). Amphiregulin is much more abundantly expressed than transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor in human follicular fluid obtained from patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertility and sterility*, 91(4), 1035–1041. Doi:10.1016/j.fertnstert.2008.01.014
- Ireland, J. J., Mihm, M., Austin, E., Diskin, M. G., & Roche, J. F. (2000). Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1648–1658. Doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75033-8
- Kafi, M., Mesbah, S. F., Davoodian, N., & Kadivar, A. (2014). Fine Structures of the Oocyte in Relation to Serum, Follicular Fluid Steroid Hormones and IGF-I in the Ovulatory-Sized Follicles in One-Humped Camel (*Camelus dromedarius*). *Avicenna journal of medical biotechnology*, 6(1), 57–61.
- Kunwar, P. S., Siekhaus, D. E., & Lehmann, R. (2006). In vivo migration: a germ cell perspective. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22(1), 237–265. doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.103337
- Lenz, M. I., Ramírez Benavides, G. F., y Uribe Velásquez, L. F. (2007). Papel del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) en la regulación de la función ovárica. *Biosalud*, 6, 149, 159. Recuperado a partir de <https://revistasojs.ucaldas.edu.co/index.php/biosalud/article/view/5851>.
- LeRoith, D., McGuinness, M., Shemer, J., Stannard, B., Lanau, F., Faria, T. N., Kato, H., Werner, H., Adamo, M., & Roberts, C. T., Jr. (1992). Insulin-like growth factors. *Neurosignals*, 1(4), 173–181. Doi:10.1159/000109323

- Li, Y., Liu, Q., Chen, Q., Yan, X., & Li, N. (2016). Insulin-like growth factor 1 promotes cumulus cell expansion and nuclear maturation of oocytes via Pi3K/Akt pathway. *Ijcep.Com*. <http://www.ijcep.com/files/ijcep0040089.pdf>
- Lucy M. C. (2000). Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *Journal of dairy science*, 83(7), 1635–1647. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75032-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75032-6)
- May, J. V., Frost, J. P., & Schomberg, D. W. (1988). Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and transforming growth factor-beta on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation. *Endocrinology*, 123(1), 168–179. Doi:10.1210/endo-123-1-168
- Mazerbourg, S. & Monget, P. (2018). Proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina y proteasas IGFBP: un sistema dinámico que regula la foliculogénesis ovárica. *Fronteras en Endocrinología*, 9. doi:10.3389/fendo.2018.00134
- McNatty, K. P., Smith, D. M., Makris, A., Osathanondh, R., & Ryan, K. J. (1979). The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 49(6), 851–860. Doi:10.1210/jcem-49-6-851
- Monget, P., & Monniaux, D. (1995). Growth factors and the control of folliculogenesis. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 49, 321–333.
- Monget, P., Besnard, N., Huet, C., Pisselet, C., & Monniaux, D. (1996). Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. *Hormone Research*, 45(3–5), 211–217. Doi:10.1159/000184790
- Monget, P., Monniaux, D., Pisselet, C., & Durand, P. (1993). Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology*, 132(4), 1438–1446. Doi: 10.1210/endo.132.4.7681760
- Monget, P., Fabre, S., Mulsant, P., Lecerf, F., Elsen, J. M., Mazerbourg, S., Pisselet, C., & Monniaux, D. (2002). Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic animal endocrinology*, 23(1-2), 139–154. Doi:10.1016/s0739-7240(02)00152-2

- Monniaux, D., Huet, C., Besnard, N., Clément, F., Bosc, M., Pisselet, C., Monget, P., & Mariana, J. C. (1997). Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 51, 3–23.
- Monniaux, D., Monget, P., Besnard, N., Huet, C., & Pisselet, C. (1997). Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology*, 47(1), 3–12. Doi:10.1016/s0093-691x(96)00334-2
- Nandi, S., Kumar, V. G., Manjunatha, B. M., & Gupta, P. S. P. (2007). Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size: Biochemical analysis of ovine follicular fluid. *Development, Growth & Differentiation*, 49(1), 61–66. Doi:10.1111/j.1440-169X.2007.00901.x
- Norris, R. P., Freudzon, M., Nikolaev, V. O., & Jaffe, L. A. (2010). Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH. *Reproduction (Cambridge, England)*, 140(5), 655–662. Doi: 10.1530/REP-10-0288
- Salazar-Ortiz, J., Monget, P. & Guillaume, D. La influencia de la nutrición en el sistema del factor de crecimiento similar a la insulina y las concentraciones de hormona del crecimiento, glucosa, insulina, gonadotropinas y progesterona en líquido folicular ovárico y plasma de adultos caballos hembras (*Equus caballus*). *Reprod Biol Endocrinol* 12, 72 (2014) Doi: 10.1186/1477-7827-12-72
- Pacheco, J. y Coila, P. (2010). Composición del fluido folicular de alpaca (*Vicugna pacos*) en diferentes estadios de desarrollo. *Archivos de Zootecnia*, 59 (227), 451-454.
- Park, J. Y., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L., & Conti, M. (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5658), 682–684. Doi: 10.1126/science.1092463
- Park, J.-Y., Su, Y.-Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S.-L. C., & Conti, M. (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5658), 682–684. Doi:10.1126/science.1092463
- Parker, K. L., & Schimmer, B. P. (2006). Embryology and genetics of the mammalian gonads and ducts. In *Knobil and Neill's Physiology* 10

- Peña J, M., Góngora O, A., & Estrada L, J. (2007). Factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación. implicaciones en la producción de embriones bovinos. *rev.mvz córdoba* 12(1): 942-954.
- Rangel, L., Hernández M, J., Boeta, M., Balcázar, A., Cerbon, J. L., Hernández, J., Paramo, R. M., Porras, A., Salgado, B., Valencia, J., Zarco, L. (2018). *Fisiología reproductiva de los animales domésticos* (1^a. ed.). Universidad Nacional Autónoma De México.
- Rechler, M. M., & Nissley, S. P. (1991). Insulin-Like Growth Factors. *Peptide Growth Factors and Their Receptors I*, 263–367. doi:10.1007/978-1-4612-3210-0_6
- Reeka, N., Berg, F. D., & Brucker, C. (1998). Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. *Human reproduction* (Oxford, England), 13(8), 2199–2205. Doi: 10.1093/humrep/13.8.2199
- Revelli, A., Delle Piane, L., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., & Rinaudo, P. (2009). Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 7(1), 40. doi:10.1186/1477-7827-7-40
- Richani, D., & Gilchrist, R. B. (2018). The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Human reproduction update*, 24(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx029>
- Richards, J. S., Jonassen, J. A., Rolfes, A. I., Kersey, K., & Reichert, L. E., Jr. (1979). Adenosine 3',5'-monophosphate, luteinizing hormone receptor, and progesterone during granulosa cell differentiation: effects of estradiol and follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 104(3), 765–773. Doi:10.1210/endo-104-3-765
- Ritter, L. J., Sugimura, S., & Gilchrist, R. B. (2015). Oocyte induction of EGF responsiveness in somatic cells is associated with the acquisition of porcine oocyte developmental competence. *Endocrinology*, 156(6), 2299–2312. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1884>
- Rodgers, R. J., & Irving-Rodgers, H. F. (2010). Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of Reproduction*, 82(6), 1021–1029. Doi:10.1095/biolreprod.109.082941

- Rouhollahi Varnosfaderani, S., Hajian, M., Jafarpour, F., Ghazvini Zadegan, F., & Nasr-Esfahani, M. H. (2020). Granulosa secreted factors improve the developmental competence of cumulus oocyte complexes from small antral follicles in sheep. *Plos one*, 15(3), e0229043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229043>
- Rosales-Torres, A. M., Alonso, I., Vergara, M., Romano, M. C., Castillo-Juárez, H., Avalos, A., Rosado, A., & Gutiérrez, C. G. (2010). Vascular endothelial growth factor isoforms 120, 164 and 205 are reduced with atresia in ovarian follicles of sheep. *Animal Reproduction Science*, 122(1–2), 111–117. Doi:10.1016/j.anireprosci.2010.08.002
- Rosales-Torres, AM, & Guzmán Sánchez, A. (2008). Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. *Técnica Pecuaria en México*, 46 (2), 159-182.
- Salazar-Ortiz, J., Monget, P., & Guillaume, D. (2014). The influence of nutrition on the insulin-like growth factor system and the concentrations of growth hormone, glucose, insulin, gonadotropins and progesterone in ovarian follicular fluid and plasma from adult female horses (*Equus caballus*). *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 12(1), 72. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-72>
- Sánchez, F., & Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(12), 1896–1912. Doi:10.1016/j.bbadis.2012.05.013
- Scheffler, F., Vandecandelaere, A., Soyeux, M., Bosquet, D., Lefranc, E., Copin, H., Devaux, A., Benkhalifa, M., Cabry, R., & Desailoud, R. (2021). Follicular GH and IGF1 levels are associated with oocyte cohort quality: A pilot study. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 793621. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.793621>
- Schmid, C. (1995). Insulin-like growth factors. *Cell Biology International*, 19(5), 445–457. Doi:10.1006/cbir.1995.1088
- Sforza, C., & Forabosco, A. (1998). A morphometric approach to the study of human ovarian organogenesis. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 103, 51–62
- Sigma Aldrich. (2022). Human IGF-I ELISA Kit. Product Number RAB0228, Certificate of Analysis / Protocol.
- Sigma Aldrich. (2022). Mouse EGF ELISA Kit. Product Number RAB0150, Certificate of Analysis / Protocol.

- Spicer, L. J., Santiago, C. A., Davidson, T. R., Bridges, T. S., & Chamberlain, C. S. (2005). Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF)-I during follicular development in mares. *Domestic animal endocrinology*, 29(4), 573–581. Doi: 10.1016/j.domaniend.2005.03.003
- Spicer, LJ, Tucker, KE, Henderson, KA y Duby, RT (1991). Concentraciones de factor de crecimiento similar a la insulina-I en líquido folicular y plasma sanguíneo de yeguas durante el estro temprano y tardío. *Ciencias de la reproducción animal*, 25 (1), 57–65. Doi: 10.1016/0378-4320(91)90008-n
- Stevenson J. S. (2007). Clinical reproductive physiology of the cow. En: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2° ed. USA. Elsevier. pp 258-270.
- Sudo, N., Shimizu, T., Kawashima, C., Kaneko, E., Tetsuka, M., & Miyamoto, A. (2007). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: relationship among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). *Molecular and cellular endocrinology*, 264(1-2), 197–203 Doi: 10.1016/j.mce.2006.10.011
- Sugimura, S., Ritter, L. J., Rose, R. D., Thompson, J. G., Smitz, J., Mottershead, D. G., & Gilchrist, R. B. (2015). Promotion of EGF receptor signaling improves the quality of low developmental competence oocytes. *Developmental biology*, 403(2), 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.05.008>
- Sugimura, S., Richani, D., & Gilchrist, R. B. (2018). Follicular guidance for oocyte developmental competence. *Animal reproduction*, 15(Suppl 1), 721–725. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0035>
- Svoboda M. E., & VanWyk J. J. (1985). Purification of somatomedin-C/insulin-like growth factor I. *Methods Enzymol*, 109. 798-816.
- Tabatabaei, S., Mamoei, M., & Aghaei, A. (2011). Dynamics of ovarian follicular fluid in cattle. *Comparative Clinical Pathology*, 20(6), 591–595. Doi:10.1007/s00580-010-1038-x
- Tarnawski, A. S., & Jones, M. K. (1998). The role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in mucosal protection, adaptation to injury, and ulcer healing: involvement of EGF-R signal transduction pathways. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 27 Suppl 1, S12-20. Doi:10.1097/00004836-199800001-00004

- Tizard, I. R. (2018) *Inmunología veterinaria* (10^a ed.). España: Elsevier.
- Vaughan, J. L., Macmillan, K. L., & D'Occhio, M. J. (2004). Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Animal Reproduction Science*, 80(3–4), 353–361. Doi:10.1016/j.anireprosci.2003.08.002
- Warzych, E., Pawlak, P., Pszczola, M., Cieslak, A., & Lechniak, D. (2017). Prepubertal heifers versus cows-The differences in the follicular environment. *Theriogenology*, 87, 36–47. Doi:10.1016/j.theriogenology.2016.08.007
- Watson, E. D., Bae, S. E., Thomassen, R., Thomson, S. R. M., Woad, K., & Armstrong, D. G. (2004). Insulin-like growth factors-I and-II and insulin-like growth factor-binding protein-2 in dominant equine follicles during spring transition and the ovulatory season. *Reproduction*, 128(3), 321-329.
- Webb, R., Nicholas, B., Gong, J. G., Campbell, B. K., Gutierrez, C. G., Garverick, H. A., & Armstrong, D. G. (2003). Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction Supplement*, 61, 71–90.
- Westergaard, L. G., & Andersen, C. Y. (1989). Epidermal growth factor (EGF) in human preovulatory follicles. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 4(3), 257–260. Doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136883
- Wu, Y., Lin, J., Han, B., Wang, L., Chen, Y., Liu, M., & Huang, J. (2017). Proteomic profiling of follicle fluids after superstimulation in one-month-old lambs. *Reproduction in Domestic Animal*, 53(1), 186–194. Doi:10.1111/rda.13091
- Xia, P., Tekpetey, F. R., & Armstrong, D. T. (1994). Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development in vitro, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. *Molecular Reproduction and Development*, 38(4), 373–379. Doi:10.1002/mrd.1080380404

CAPITULO IX

ANEXOS

Anexo 1. Selección de animales para estudio



Nota. Imagen (1 – 2) majada de alpacas listas para ingresar al empadre. imagen (3 – 4) empadre controlado, se seleccionó hembras que estén receptivas al macho (pero no empadradas). Se realizo en el centro experimental CICAS - la Raya.

Anexo 2. Grupo de estudio en pastoreo



Nota. Este grupo de imágenes (5,6,7,8) corresponden a las alpacas seleccionadas para el estudio en pastoreo.

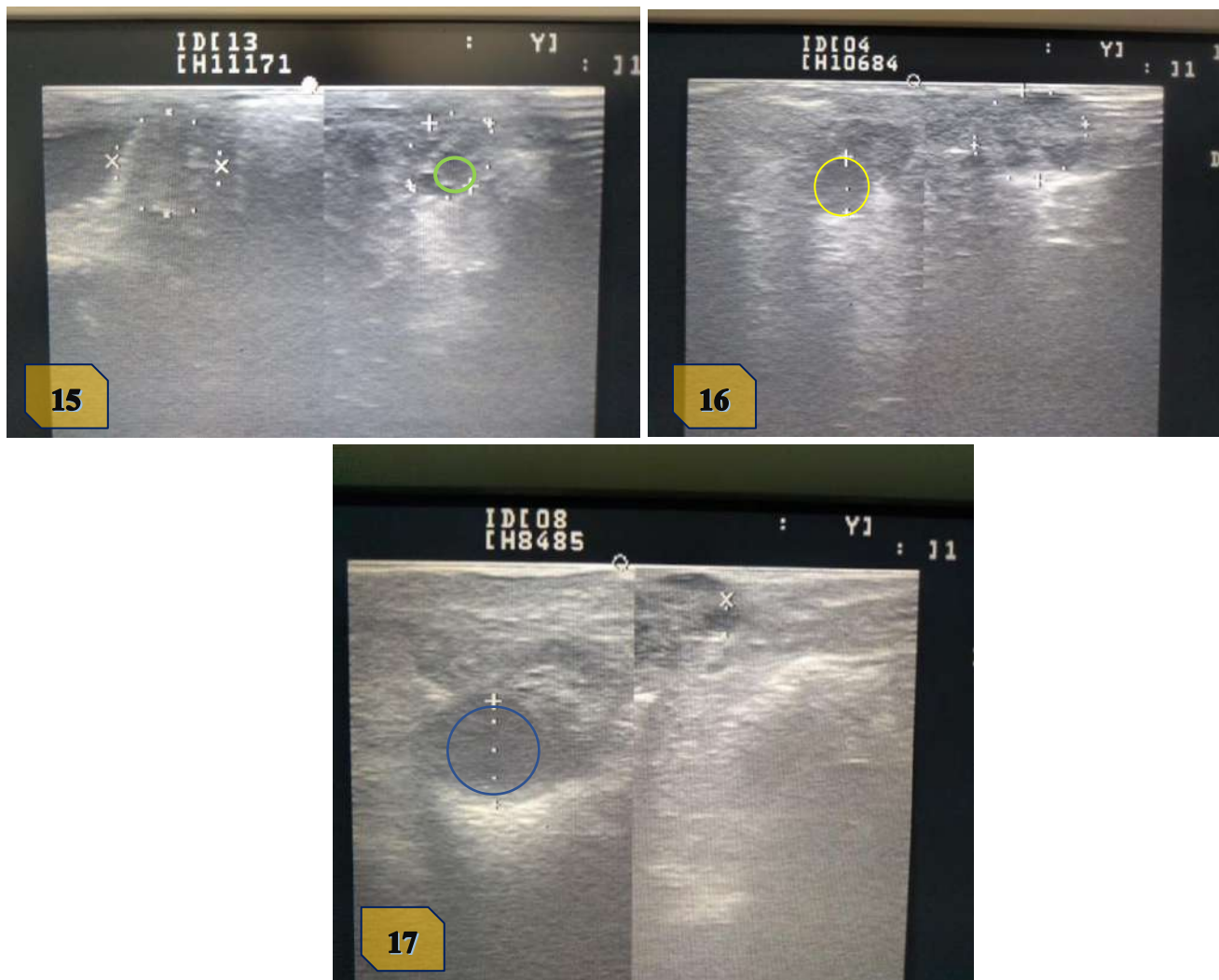
Anexo 3 . Lista de alpacas para estudio

Arete	Fecha de nacimiento	Lugar de procedencia (Majadas ubicadas en cicas – la Raya)	Color
H10928	02 - 20	Cabaña Huaray phiña	Blanca
H10684	12 - 19	Cabaña Huaray phiña	Blanca
H10312	02 - 19	Cabaña Vilcanotapata	Blanca
H10811	01 - 20	Cabaña Vilcanotapata	Blanca
H6359	01 - 14	Cabaña Vilcanotapata	Blanca
H8485	01 - 17	Cabaña Q'omer q'ocha	Blanca
H10657	12 - 19	Cabaña Q'omer q'ocha	Blanca
H8449	01 - 17	Cabaña Q'omer q'ocha	Blanca
H7122	02 - 15	Cabaña Q'omer q'ocha	Blanca
H11171	03 - 20	Cabaña Huara Q'oni	Café claro/ cara blanca
H11120	02 - 20	Cabaña Huara Q'oni	Café oscuro/ cara manchada
H3530	01 - 10	Cabaña Huara Q'oni	LF
H9667	02 - 18	Cabaña H'atun Rumi	Blanca
H10116	01 - 18	Cabaña H'atun Rumi	Blanca
H8794	02 - 17	Cabaña H'atun Rumi	Blanca

Anexo 4 . Seguimiento ecográfico transrectal



Nota. Imagen (9,10 y 11) alpacas siendo llevadas al lugar donde se realizó la ecografía. Imagen (12) ecógrafo ALOKA® equipado con su transductor transrectal 7.5MHz y gel ecográfico. Imagen (13 y 14) ecografía transrectal y ubicación de folículos con su posterior registro de tamaño folicular en las fichas.

Anexo 5. Ecografía de los tamaños foliculares

Nota. La imagen (15) se observa a los ovarios marcados en forma ovalada puntuada, en la circunferencia verde se observa un folículo del grupo de pequeños folículos en el OD, imagen (16) se observa en el círculo amarillo folículo del grupo de ovulatorios en el OI y la imagen (17) en la circunferencia azul se observa folículo en regresión en el OI.

Anexo 6. Proceso para la obtención de líquido folicular ovárico



Nota. Imagen (18) útero completo en bandeja después de realizar la ecografía y encontrar el tamaño folicular adecuado, se observa la regla vernier, jeringas y los tubos eppendorf. Imagen (19) medición del tamaño folicular. Imagen (20) aspiración del líquido folicular.

Anexo 7 . Ficha de seguimiento del crecimiento folicular

SEGUIMIENTO ECOGRAFICO DEL CRECIMIENTO FOLICULAR



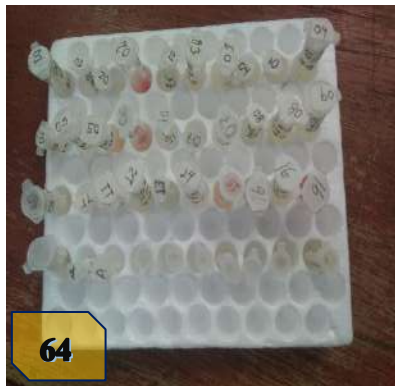
Alpaca: Grupo:

Nº:

Fecha	OI	OD	Observaciones

Nota. En alpaca se coloca el número de arete, N° el número de orden asignado para el arete respectivo. OI corresponde al ovario izquierdo y OD corresponde al ovario derecho.

Anexo 8. Muestras y reactivos



64



65



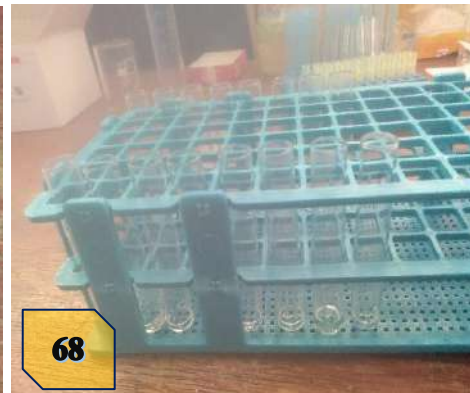
66

Nota. Imagen (64) muestras en descongelación a T° ambiente, imagen (65) Kit ELISA IGF-I humano, imagen (66) Kit ELISA EGF de ratón.

Anexo 9 . Pocillos y estándares



67



68

Nota. Imagen (67) pocillos con anticuerpos de IGF-I, imagen (68) tubos de ensayo con los estándares preparados para IGF-I y en la parte posterior se encuentran los estándares de EGF.

Anexo 10 . Procedimientos del protocolo de los kits



69



70



71

Nota. Imagen (69) pocillos con el reactivo en incubación, imagen (70 – 71) pocillos después de la incubación se procede a realizar el lavado con la pipeta multicanal y solución de lavado.

Anexo 11. Procedimientos del protocolo de los kits ELISA



Nota. Imagen (72) colocando reactivo de sustrato TMB, imagen (73) muestras de IGF-I. en incubación por 30 minutos y tomara esa coloración celeste en la columna de los estándares de acuerdo al grado de concentración se tornará el color, entre mayor concentración exista mayor será la coloración y menor concentración ira disminuyendo el color. Imagen (74) muestras de EGF en incubación con reactivo de sustrato TMB.

Anexo 12. Procedimientos del protocolo de los kits ELISA



Nota. Imagen (75) pocillo de IGF-I con solución de parada, tornara de un color amarillo. Imagen (76) pocillo de EGF con solución de parada, tornara de un color amarillo y se procedió a realizar la lectura con el lector de placas a 450nm.

Anexo 13. Cálculo de la concentración de EGF e IGF-I en la ecuación de regresión simple en folículos pequeños (4-5mm)

Arete	Tamaño Folicular	Lectura de la absorbancia 450nm EGF	Concentración EGF pg/mL	Lectura de la absorbancia 450nm IGF-I	Concentración IGF-I ng/mL
H6359	5.6mm	0.078	4.31528	0.1546	1.08478
H10657	4.2mm	0.077	3.83002	0.1646	1.37192
H11171	5.5mm	0.077	3.83002	0.1596	1.22835
H11120	5mm	0.076	3.34476	0.1636	1.34321
H8794	5mm	0.078	4.31528	0.1636	1.34321

Nota. Los resultados de la absorbancia se reemplazaron en la ecuación de regresión lineal simple de EGF e IGF, tomando el lugar de “x” dándonos un valor estimado de cada tamaño folicular en la columna verde.

Anexo 14. Cálculo de la concentración de EGF e IGF-I en la ecuación de regresión simple en folículos ovulatorios (7-10mm)

Arete	Tamaño Folicular	Lectura 450nm de la absorbancia EGF	Concentración EGF pg/mL	Lectura 450nm de la absorbancia IGF-I	Concentración IGF-I ng/mL
H10928	7mm	0.076	3.34476	0.1576	1.17093
H10684	9mm	0.079	4.80054	0.1566	1.14221
H8494	10mm	0.075	2.8595	0.1616	1.28578
H7122	8.3mm	0.078	4.31528	0.1836	1.91749
H3530	10mm	0.076	3.34476	0.1576	1.17093

Nota. Los resultados de la absorbancia se reemplazaron en la ecuación de regresión lineal simple de EGF e IGF-I, tomando el lugar de “x” dándonos un valor estimado de cada tamaño folicular en la columna amarilla.

Anexo 15. Cálculo de la concentración de EGF e IGF-I en la ecuación de regresión simple en folículos en regresión (12 -6 mm)

Arete	Tamaño Folicular	Lectura de la absorbancia 450nm EGF	Concentración EGF pg/mL	Lectura de la absorbancia 450nm IGF-I	Concentración IGF-I ng/mL
H10312	10mm	0.071	0.91846	0.1606	1.25706
H10811	12mm	0.073	1.88898	0.1846	1.94620
H8485	9mm	0.07	0.4332	0.1616	1.28578
H9667	11mm	0.071	0.91846	0.1776	1.74521
H10116	6mm	0.07	0.4332	0.1606	1.25707

Nota. Los resultados de la absorbancia se reemplazaron en la ecuación de regresión lineal simple EGF e IGF-I tomando el lugar de “x” dándonos un valor estimado en la columna celeste.

Anexo 16. Tabla de análisis de varianza para EGF

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de prueba	(Alfa = 0.05)
Folículo	2	28.35146	14.17573	36.86	0.000008*	1.000000
error	12	4.615355	0.3846129			
total	14					

* término significativo en alfa (alfa =0.05)

Anexo 17. Método de Tukey para EGF

Diferencia poblacional	Diferencia muestral (DM)	Decisión	T - alfa
Fp - Fo	0.194104	NS	1.0456
Fp - Fr	3.008612	SS	
Fo - Fr	2.814508	SS	
Fo - Fp	0.194104	NS	
Fr - Fo	2.814508	SS	
Fr - Fp	3.008612	SS	

Nota. Diferencia no significativa (NS), Diferencia si significativa (SS), si la diferencia muestral $DM > T\alpha$. Folículos pequeños (Fp), Folículos ovulatorios (Fo) y Folículos en regresión (Fr).

Anexo 18.**Test de normalidad Shapiro-Wilk EGF**

	Folículos pequeños	Folículos ovulatorios	Folículos regresión
Estadística - W	0.8810904	0.91372338	0.83273295
p - valor	0.31428141	0.4902857	0.14581493
Alfa	0.05	0.05	0.05
Normalidad	Si	Si	Si

Anexo 19. Tabla de análisis de varianza para IGF-I

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	F tabular	(Alfa = 0.05)
Folículo	2	0.1333481	0.06667407	0.88	0.441290	0.166502
error	12	0.9128795	0.0760733			
total	14					

* término significativo en alfa (alfa =0.05)

Anexo 20. Método de Tukey para IGF-I

Diferencia poblacional	Diferencia muestral	Decisión	T - alfa
Fp - Fo	0.0631708	NS	0.465021
Fp - Fr	0.2239692	NS	
Fo - Fr	0.1607984	NS	
Fo - Fp	0.0631708	NS	
Fr - Fo	0.1607984	NS	
Fr - Fp	0.2239692	NS	

Nota. Diferencia no significativa (NS), Diferencia si significativa (SS), si la diferencia muestral $DM > T\alpha$. Folículos pequeños (Fp), Folículos ovulatorios (Fo) y Folículos en regresión (Fr).

Anexo 21.**Test de normalidad Shapiro-Wilk IGF-I**

	Folículos pequeños	Folículos ovulatorios	Folículos regresión
Estadística - W	0.83729707	0.68135821	0.78378526
p - valor	0.15758815	0.00605032	0.05938258
Alfa	0.05	0.05	0.05
Normalidad	Si	No	Si