

Factores de crecimiento epidermal e insulínico en fluido folicular ovárico de la alpaca

Epidermal and insulin growth factors infollicular fluid of alpaca ovary

Juan Valladares¹, Duriel Mamani¹, P. Walter Bravo^{1*}

¹ Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco, Perú.

*Autor correspondiente: P- Walter Bravo, pedro.bravo@unsaac.edu.pe

RESUMEN

Las concentraciones del factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento insulínico (IGF-I) fueron determinados en folículos ováricos de alpacas durante diferentes fases de su desarrollo. Dieciséis alpacas hembras fueron ecografiadas para determinar pequeños folículos (4-5 mm), folículos ovulatorios (7-10 mm), y folículos en regresión (12-6 mm). Cinco alpacas de cada grupo fueron sacrificadas para colectar el fluido folicular. Las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su análisis por el método ELISA. La concentración de EGF fue diferente ($P < 0.05$) siendo 3.9, 3.7 y 0.9 pg/mL para pequeños, ovulatorios y en regresión, respectivamente. La concentración de IGF fue similar para los tres tamaños de folículos ováricos, siendo 1.3, 1.3 y 1.5 ng/mL para folículos pequeños, ovulatorios y en regresión. En conclusión, EGF varió de acuerdo al tamaño folicular, no así IGF que no varió de acuerdo con el tamaño folicular ovárico.

Palabras clave: factor crecimiento, epidermal, insulínico, folículo antral, alpaca.

ABSTRACT

The concentrations of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor (IGF) were determined in alpaca ovarian follicular fluid of different phases of development. Fifteen female alpacas were ultrasound 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 by ELISA method. The EGF concentrations differed ($P < 0.05$), 3.9, 3.7, and 0.9 pg/mL for small, ovulatory, and regressing follicles, respectively. The IGF 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.

Key words: growth factor, epidermal, insulinic, antral follicle, alpaca.

INTRODUCCIÓN

Los factores de crecimiento son péptidos involucrados en el crecimiento celular y tisular. Ellos son reconocidos por su rol en el desarrollo reproductivo así como actividades reproductivas (Alan & Kulak, 2021). Ellos son también parte del líquido folicular que se forma por transudación de las células teca y granulosa de los folículos ováricos (Guerreiro et al., 2018). Uno de los factores más estudiado es el factor insulínico I y que está presente en concentraciones sustanciales en cerdas (Hsu et al., 1987), y vacas (Rivera & Fortune, 2003). En general, están involucrados en la activación de la meiosis (May et al., 1988). El factor epidermal está también presente en folículos ováricos y pueden participar en la proliferación de las células granulosa (Bendell & Dorrington, 1990). Aún más, el factor epidermal constituye un enlace entre la hormona folículo estimulante y la diferenciación de la célula granulosa (Feng et al., 1987). En conjunto, estos dos factores están asociados en el crecimiento folicular, maduración folicular y maduración del ovocito.

Los ovarios de alpacas desarrollan folículos en forma de onda durante la fase folicular del ciclo ovárico. Una onda es iniciada cuando un grupo de pequeños folículos, 3 a 5 mm, inician su crecimiento, luego un solo folículo dominante se vuelve ovulatorio con 7 a 12 mm en diámetro, y si la cópula no ocurre el mismo folículo empieza a regresionar y desaparece (Bravo et al., 1989). Esta sucesión de crecimiento y atresia es alternada en 85% de los casos entre los ovarios derecho e izquierdo. Funcionalmente, se reconocen, pequeños folículos (3-5 mm), folículos ovulatorios (7-12 mm) y folículos en regresión (12-6 mm).

De igual manera en alpacas, las gonadotropinas de la pituitaria y los esteroides gonadales han sido asociadas a la presencia de folículos ováricos. La hormona folículo estimulante está asociada levemente con folículos ovulatorios en la llama, una especie parecida a la alpaca. La hormona luteinizante se reporta en concentraciones basales durante la

fase folicular del ciclo ovárico (Bravo et al., 1990a) y solamente se eleva después de la cópula y en la presencia de estradiol 17- β (Bravo et al., 1990b). Sin embargo, en Camélidos Sudamericanos no existen reportes de los factores de crecimiento epidermal e insulínico y muy en especial durante las tres fases del desarrollo folicular, y este es el principal objetivo de este estudio.

METODOLOGÍA

Este estudio consideró 15 alpacas adultas con historia reproductiva que fueron mantenidas en pasturas naturales en el centro experimental La Raya, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, y que está a 4200 msnm.

La ecografía de los ovarios fue realizada con un ecógrafo Aloka 500 de uso veterinario y con un transductor rectal lineal prostático de 7.5 MHz. La ecografía se usó una vez por semana para determinar los tres tipos funcionales de folículos ováricos por una fase folicular completa. Luego las hembras fueron divididas en tres grupos con cinco hembras en cada grupo. Los grupos fueron: hembras con folículos pequeños (3-5 mm), hembras con folículos ovulatorios (7-12 mm), y hembras con folículos en regresión (11-7 mm). Las hembras fueron sacrificadas siguiendo el protocolo de tratamiento humano de la estación experimental y los ovarios fueron aislados inmediatamente para llevarlos al laboratorio. El tamaño folicular fue medido con una regla Vernier y confirmó lo evaluado por ecografía. Su fluido fue aspirado introduciendo la aguja 21G por la base del folículo. El fluido fue congelado y almacenado en tubos Eppendorf de 1.5 mL a -20 °C hasta su análisis.

Los factores de crecimiento epidermal e insulínico fueron determinados por el método ELISA de Sigma laboratorios. El protocolo seguido fue recomendado por el vendedor. La validez del ensayo fue por paralelismo de la curva standard con una

dilución seriada de una muestra de folículo ovulatorio y que se muestra en la Figura 1.

Los coeficientes de variación dentro del ensayo fueron menos del 5% por cada factor de crecimiento. Los datos fueron analizados usando el programa estadístico Number Crunching Statistical System (Layton, UT, USA), por el método general de análisis de varianza. Los promedios fueron comparados por la prueba de Tukey con una significancia de 0.05.

RESULTADOS

No existió desacuerdo entre los diámetros de folículos ováricos medidos por ecografía y con la regla Vernier. El acuerdo entre diámetro de los folículos ováricos medidos por ecografía y al momento del sacrificio animal se muestran en la Tabla 1.

Los promedios y errores standard de los promedios de los factores de crecimiento epidermal e insulínico se presentan en el Tabla 2 y Figura 2.

Tabla 1. Diámetro de los folículos ováricos (mm) determinados por dos métodos, ecografía in-vivo, y con regla Vernier, después del sacrificio, en alpacas con diferentes tamaños foliculares. Pearson $X^2_{25,10} = 0.99$.

Tamaño	Ecografía	Regla Vernier
Pequeños	4	4
	5	4.9
	3	3
	4	4.1
	5	5
Ovulatorios	8	8
	10	10
	9	9
	8	8
	11	11
Regresión	7	7
	5	5
	6	6
	6	6
	5	5

DISCUSIÓN

La concentración del factor de crecimiento epidermal fue similar entre folículos pequeños y ovulatorios, sin embargo, menores en folículos en regresión. Esta diferencia podría indicar la acción de este factor, mayor cuando los folículos son pequeños y ovulatorios, y menor cuando los folículos están en regresión. La presencia de este factor también puede indicar que su acción es manifiesta a nivel de las células granulosas de la pared folicular que acompañan al ovocito, y como ha sido demostrado en ovejas (Monget & Monniaux, 1995), y cerdas (Hsu et al., 1987). De igual manera también puede afectar la selección del folículo dominante (Mazerbourg & Monget, 2018).

El factor de crecimiento insulínico a sido extensivamente estudiado en una variedad de especies como la oveja, cerda, y aún en humanos. En todos esos trabajos ha sido asociado a la activación de la mitosis de las células granulosas y tecales. En cerdas (Veldhuis et al., 1986), vacas (Rutter & Manns, 1991; Rivera & Fortune, 2003), y ovejas (Monget et al., 1993) no se encontró una relación exacta con el tamaño folicular. En contraste, una relación negativa ha sido reportado en cerdas (Howard & Ford, 1992). Esta diferencia puede ser atribuida a las diferentes especies en el lugar de síntesis de IGF en el

ovario. En el presente estudio, las concentraciones del factor insulínico fue similar para folículos pequeños, ovulatorios y en regresión lo que sugiere una falta de relación entre este factor de crecimiento y el tamaño del folículo. Un solo reporte del factor insulínico fue encontrado en alpacas, pero no se hizo referencia al estado de desarrollo folicular (Pacheco & Coila, 2010). De igual manera, no se encontró una relación entre el factor insulínico y tamaño folicular en camellas (El-Barh et al., 2015).

En la alpaca, los resultados de este reporte sugieren fuertemente que el factor epidérmico podría ser implicado en las acciones del factor insulínico de otras especies. De igual manera en este estudio un enfoque sistemático fue usado para determinar el estado del tamaño folicular con una diferencia clara entre los folículos ováricos. Esto constituye una ventaja para entender mejor las acciones de los dos factores epidermal e insulínico.

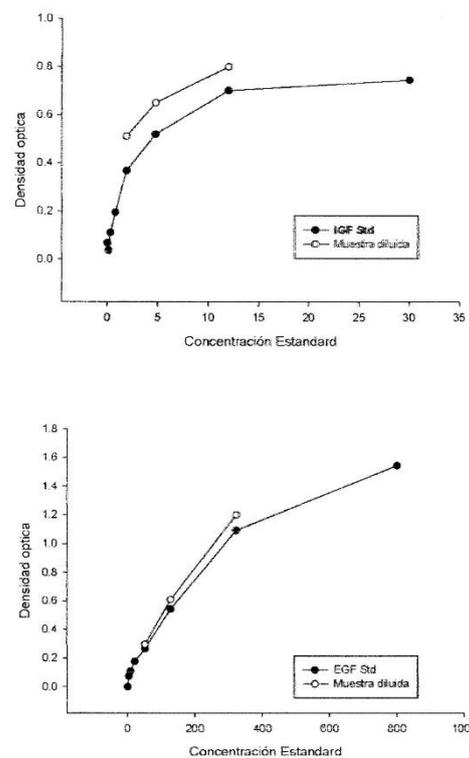


Figura 1. Comparación por paralelismo de las curvas estándar del factor de crecimiento insulínico (panel superior), y del factor de crecimiento epidérmico (panel inferior) con muestras de líquido folicular ovárico de alpacas.

CONCLUSIONES

El factor de crecimiento epidermal fue mayor en folículos pequeños y ovulatorios que en folículos en regresión. El factor insulínico fue similar entre folículos pequeños, ovulatorios y en regresión. El factor epidermal estuvo presente en menores concentraciones que el factor insulínico.

AGRADECIMIENTOS

Al programa de fortalecimiento de la investigación “YACHAYNINCHIS WIÑARINANPAQ” de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco por financiar parte de este estudio a Juan Valladares como tesis de pre-grado.

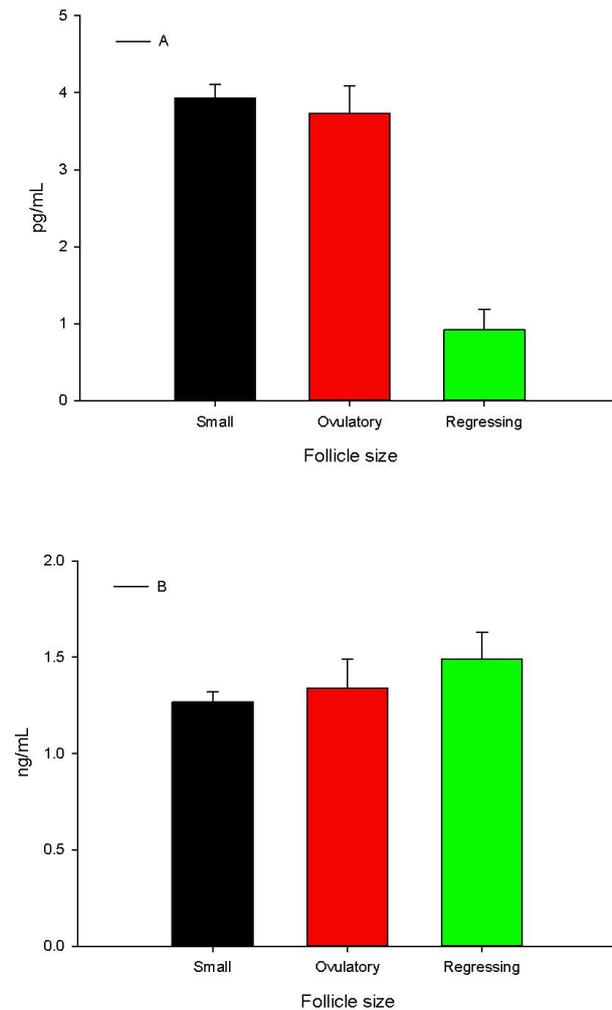


Figura 2. Concentraciones de factores de crecimiento epidermal (A) e insulínico (B) en fluido folicular ovárico en folículos pequeños, ovulatorios y en regresión de alpacas. Nota: Las unidades de medida por cada factor de crecimiento

Tabla 2. Promedio \pm error standard del promedio para los factores epidermal e insulínico en líquido folicular ovárico de alpacas durante la fase folicular del ciclo ovárico. Letras diferentes indica significancia estadística por la prueba de Tukey, por filas.

Factor crecimiento	Pequeños folículos	Folículos ovulatorios	Folículos en regresión	Valor P
Epidermal, pg/mL	3.93 ± 0.2^b	3.73 ± 0.4^b	0.92 ± 0.2^a	0.000008
Insulínico, ng/mL	1.27 ± 0.1^a	1.34 ± 0.1^a	1.49 ± 0.1^a	0.4413

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alan, E., Kulak, Y. (2021). The immunoeexpression patterns of fibroblast growth factors in the pregnant and postpartum rat ovary. *Reprod. Fertil. Dev.* 33, 817-830. doi: 10.1071/RD21025.
- Bendell, J.J., Dorrington, J. H. (1990). Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *Endocrinology*, 127, 533-540.
- Bravo, P.W., Sumar, J., (1989). Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* 21, 271–281.
- Bravo, P. W., Fowler, M. E., Stabenfeldt, G. H., Lasley, B. L. (1990a). Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biology Reproduction*, 43, 579-585.
- Bravo, P.W., Fowler, M.E., Stabenfeldt, G.H., Lasley, B.L. (1990b). Endocrine responses in the llama to copulation. *Theriogenology*, 33: 891-899.
- El-Bahr, S.M., Ghoneim, I., Waheed, M. (2015). Biochemical and hormonal analysis of follicular fluid and serum of female dromedary camels (*Camelus dromedarius*) with different sized ovarian follicles. *Anim Reprod Sci.* 159. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2015.06.002
- Feng, P., Knecht, M., & Catt, K. (1987). Hormonal control of epidermal growth factor receptors by gonadotropins during

- granulosa cell differentiation. *Endocrinology*, 120, 1121–1126. doi:10.1210/endo-120-3-1121
- Guerreiro, T.M., Guerreiro, R.F., Gonçalves, C.F.O.R., Melo, D.N. de Oliveira, E.O., Lima, J.A. (2018). A metabolomic overview of follicular fluid in cows. *Front. Vet. Sci.* 10.3389/FVETS.2018.00010/BIBTEX
- Howard, H.J. Ford, I.I. (1992). Relationship among concentrations of steroids, inhibin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-binding proteins during follicular development in weaned sows. *Biology of Reproduction* 47, 193-201.
- 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 biophysical research communications*, 147, 242–247. Doi: 10.1016/s0006-291x(87)80112-2
- 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, 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
- Monget, P., Monniaux, D. (1995). Growth factors and the control of folliculogenesis. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 49, 321–333.
- Monget, P., Monniaux, D., Pisselet, C., Durand, P. (1993). Changes in insulin-like growth factor I, IGF-II, and their binding proteins during growth and atresia of ovine follicles. *Endocrinology* 132, 1438-1446. DOI 10.12/endo 132.4.7681760.
- Pacheco, J. y Coila, P. (2010). Composición del fluido folicular de alpaca (*Vicugna pacos*) en diferentes estadios de desarrollo. *Archivos de Zootecnia*, 59, 451-454.
- Rivera, G.M., Fortune, J.E. (2003). Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins - 4 and -5 in bovine follicular fluid, implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology*. 144, 2977- 2987.
- Rutter, L.M., Manns, J.G. (1991). Insulin-like growth factor I in follicular development and function in postpartum beef cows *Journal of Animal Science* 69, 1140-1146.
- Samoto, T., Maruo, T., Ladines-Llave, C.A., Matsuo, H., Deguchi, J., Barnea, E.R., Mochizuki, M. (1993). Insulin receptor expression in follicular and stromal compartments of the human ovary over the course of follicle growth, regression and atresia. *Endocr J.* 1993. 40, 715-26. doi: 10.1507/endo.40.715.
- Veldhuis, J., Rodgers, R.I., Furlanetto, R.W. (1986). Synergistic actions of estradiol and the insulin-like growth factor, somatomedin-C, on swine ovarian (granulosa) cells. *Endocrinology*, 119, 530-538.
- Westergaard, L. G., Andersen, C. Y. (1989). Epidermal growth factor (EGF) in human preovulatory follicles. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 4, 257–260. Doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136883.

Presentado: 17/04/2024

Aceptado: 14/05/2024

Publicado: 08/07/2024