

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA**



**“EFECTO DE LA ADICIÓN DE KIT LIGAND Y/O bpV (HOpic)  
SOBRE LA ACTIVACIÓN Y SOBREVIVENCIA *IN VITRO* DE  
FOLÍCULOS PREANTRALES DE ALPACAS”**

Presentada por:

**GONZALO ALONSO ROJAS GUERRA**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**INGENIERO ZOOTECNISTA**

Lima – Perú

**2022**

---

**La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)**

## Document Information

<b>Analyzed document</b>	TESIS ROJAS FINAL.pdf (D149004665)
<b>Submitted</b>	11/8/2022 2:20:00 AM
<b>Submitted by</b>	Edwin mellisho
<b>Submitter email</b>	emellisho@lamolina.edu.pe
<b>Similarity</b>	5%
<b>Analysis address</b>	emellisho.unalm@analysis.arkund.com

## Sources included in the report

<b>SA</b>	<b>Mera Correa Israel...docx</b> Document Mera Correa Israel...docx (D46452399)		<b>3</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://doi.org/10.1530/REP-12-0233">https://doi.org/10.1530/REP-12-0233</a> Fetched: 11/8/2022 2:20:00 AM		<b>4</b>
<b>SA</b>	<b>DEL_CASTILLO_LIMA_WD51190_20221020_3102_c062.pdf</b> Document DEL_CASTILLO_LIMA_WD51190_20221020_3102_c062.pdf (D146977923)		<b>9</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://doi.org/10.1530/REP-06-0161">https://doi.org/10.1530/REP-06-0161</a> Fetched: 11/8/2022 2:21:00 AM		<b>5</b>
<b>SA</b>	<b>TESIS CORREGIDA.docx</b> Document TESIS CORREGIDA.docx (D54968041)		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>TESIS TRANSFERENCIA SARAGURO CLOJAN FINAL.doc</b> Document TESIS TRANSFERENCIA SARAGURO CLOJAN FINAL.doc (D111642956)		<b>2</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://doi.org/10.1242/jcs.03105">https://doi.org/10.1242/jcs.03105</a> Fetched: 11/8/2022 2:20:00 AM		<b>2</b>
<b>SA</b>	<b>Paula García. La razón 2D-4D como biomarcador de reserva ovárica y de respuesta a la estimulación en ciclos de FIV.pdf</b> Document Paula García. La razón 2D-4D como biomarcador de reserva ovárica y de respuesta a la estimulación en ciclos de FIV.pdf (D140194394)		<b>1</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://scholar.google.com/citations?user=f9quhwgAAAAJ&amp;hl=en">https://scholar.google.com/citations?user=f9quhwgAAAAJ&amp;hl=en</a> Fetched: 11/5/2021 4:45:20 PM		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>Asunta_Martínez_Dinámica_y_selección_folicular.pdf</b> Document Asunta_Martínez_Dinámica_y_selección_folicular.pdf (D99103675)		<b>2</b>
<b>SA</b>	<b>Universidad Nacional Agraria La Molina / tesis doct 20.0_Delo.pdf</b> Document tesis doct 20.0_Delo.pdf (D145085482) Submitted by: hvivanco-mackie@lamolina.edu.pe Receiver: hvivancomackie.unalm@analysis.arkund.com		<b>3</b>

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA  
FACULTAD DE ZOOTECNIA**

**“EFECTO DE LA ADICIÓN DE KIT LIGAND Y/O bpV (HOpic)  
SOBRE LA ACTIVACIÓN Y SOBREVIVENCIA *IN VITRO* DE  
FOLÍCULOS PREANTRALES DE ALPACAS”**

Presentado por:

**GONZALO ALONSO ROJAS GUERRA**

**TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE INGENIERO ZOOTECNISTA**

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

---

Ing. Enrique Alvarado Malca  
Presidente

---

Ing. Amalia Gallegos Cardenas  
Miembro

---

Ing. Próspero Cabrera Villanueva  
Miembro

---

Dr. Edwin Mellisho Salas  
Asesor

---

Mg. Sc. Deysi Dipaz Berrocal  
Co asesora

## DEDICATORIA

*A Dios, por guiarme y protegerme durante toda mi vida; quien me da fuerzas día tras día para superar toda dificultad que en la vida se presenta.*

*A mis queridos padres: Raul Rojas y Aida Guerra, quienes lo han dado todo por mí. Las palabras ni acciones serían suficientes para agradecerles por tanto amor y paciencia. “Con, por y para ellos”. ¡Los amo!*

*De manera muy especial a mis hermanos Melissa y Raúl, porque tengo la certeza que sus éxitos futuros superarán las metas que he alcanzado.*

## AGRADECIMIENTOS

A PROCIENCIA -CONCYTEC por su apoyo en el financiamiento de esta tesis, en el marco de la convocatoria Proyecto Investigación Básica, 2019-01 [Contrato N° 385-2019-FONDECYT]

Al PhD. Edwin Mellisho, mi asesor y profesor, por el apoyo constante, paciencia, tiempo y los conocimientos brindados para la elaboración de la tesis y formación profesional.

A la PhD (c). Deysi Dipaz, quien me capacitó, brindó sus conocimientos y apoyo constante durante desarrollo del presente trabajo de investigación.

A la Ing. Amalia Gallegos, mi profesora y amiga quien me ha aconsejado a lo largo de mi vida universitaria.

A mis estimados compañeros de Post Grado de la UNALM: “Emma Matamba”, “Carmina Vargas”, “Camilo Mamani”, “Katherine Sanchez”, “Misael Rodriguez” y “Jhorghy Vega” por todo su apoyo y experiencias brindadas para poder culminar mi trabajo de investigación.

A mis estimados compañeros molineros: “Alba Huaranga”, “Angelica Zegarra”, “José Cusipaucar”, “Maria Huauya”, “Lesia Tello”, “Jorge Toscano”, “Jim Palomino” y “Sofia Minaya” y por toda la motivación brindada y notable cooperación durante el proceso de ejecución de la experimentación.

# ÍNDICE GENERAL

I	INTRODUCCIÓN .....	1
II	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
	2.1 Ovogénesis .....	3
	2.2 Foliculogénesis .....	5
	2.2.1. Primordiales (dormantes).....	5
	2.2.2. Primarios .....	6
	2.2.3. Secundarios .....	7
	2.2.4. Terciarios.....	8
	2.3 Activación y Crecimiento folicular .....	9
	2.3.1. Activación de folículos primordiales .....	9
	2.3.2. Crecimiento de folículos primarios.....	11
	2.4 Control <i>in vitro</i> de la activación y crecimiento folicular.....	13
	2.4.1. Estimuladores de activación folicular <i>in vitro</i> .....	13
	2.4.2. Estimuladores de crecimiento folicular <i>in vitro</i> .....	15
III	METODOLOGÍA .....	17
	3.1 Lugar.....	17
	3.2 Diseño Experimental .....	17
	3.3 Recuperacion y preparación del tejido ovárico de alpaca .....	18
	3.4 Cultivo <i>in vitro</i> de fragmento ovárico de alpaca .....	18
	3.5 Procesamiento histológico.....	20
	3.6 Variables a evaluar .....	22
	3.7 Análisis estadístico .....	22
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
V	CONCLUSIONES .....	28
VI	RECOMENDACIONES .....	29
VII	BIBLIOGRAFÍA.....	30
VIII	ANEXOS.....	41

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios sobre activación folicular <i>in vitro</i> usando bpV y/o Kit Ligand en diferentes especies en los últimos 10 años .....	14
Tabla 2. Estudios sobre crecimiento folicular <i>in vitro</i> usando factores de crecimiento en diferentes especies .....	16
Tabla 3. Descripción de los tratamientos por suplementos al medio de cultivo .....	19
Tabla 4. Distribución del promedio de los folículos preantrales normales y anormales en ovarios de alpaca según tratamientos. ....	24

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la ovogénesis de los mamíferos desde la ovogonia hasta el óvulo maduro.....	4
Figura 2. Representación esquemática del crecimiento, capacitación y maduración de los ovocitos bovinos a través de la foliculogénesis.....	4
Figura 3. Representación esquemática de las etapas de la foliculogénesis de los mamíferos y su dependencia de gonadotropinas .....	5
Figura 4. Diagrama esquemático y Fotomicrografía de un folículo primordial.....	6
Figura 5. Diagrama esquemático y Fotomicrografía de un folículo primario.....	7
Figura 6. Diagrama esquemático y Fotomicrografía de un folículo secundario. ....	8
Figura 7. Diagrama esquemático y Fotomicrografía de un folículo terciario. ....	9
Figura 8. Diagrama de activación del folículo primordial en el ovario de mamífero. ....	10
Figura 9. Diagrama de la vía de señalización de PI3K en el ovocito de los folículos primordiales.....	11
Figura 10. Vías de señalización del crecimiento del folículo primario.....	12
Figura 11. Interacciones de GDF9, BMP15 y Kit Ligand durante el desarrollo de ovocitos y folículos .....	15
Figura 12. Diseño experimental para evaluar los efectos de bpV (HOpic) y/o Kit Ligand en la activación y sobrevivencia de folículos preantrales de alpaca .....	17
Figura 13. Corte de fragmentos corticales de ovario de alpaca.....	18
Figura 14. Incubador Portatil CO2 Labmix.....	19
Figura 15. Placa de cultivo de 24 pocillos con medio de cultivo y muestras correspondientes a cada tratamiento.....	20
Figura 16. de Batería de tinción Hematoxilina y Eosina.....	20
Figura 17. Microfotografías de las categorías foliculares preantrales normales encontradas en la corteza ovárica de alpaca .....	21
Figura 18. Microfotografías de los folículos preantrales anormales de alpacas.....	22

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Fragmentos corticales de ovario de alpaca .....	41
Anexo 2. Procesamiento histológico de las muestras usando microtomo (Leica) .....	41
Anexo 3. Lectura de muestras en programa Labscope (ZEISS) .....	42
Anexo 4. Distribución de las medias de la proporción de los estadios de desarrollo de los folículos preantrales normales y anormales en ovarios de alpaca según tratamientos.....	43
Anexo 5. Análisis de varianza para las diferencias entre medias de los tratamientos según proporción de los estadios de desarrollo de los folículos preantrales en ovarios de alpaca	44
Anexo 6. Prueba de Tukey para comparaciones apareadas de medias de los tratamientos según estadio primordial en ovarios de alpaca .....	45
Anexo 7. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre medias de los tratamientos según estadio intermedio en ovarios de alpaca.....	45
Anexo 8. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre medias de los tratamientos según estadio primario en ovarios de alpaca .....	46
Anexo 9. Tukey para comparaciones múltiples entre medias de los tratamientos según estadio secundario en ovarios de alpaca .....	46
Anexo 10. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre medias de los tratamientos según porcentaje de folículos morfológicamente anormales.....	47

## RESUMEN

En los mamíferos, la foliculogénesis comienza en la etapa fetal y es un proceso complejo y dinámico que involucra la quiescencia, activación, crecimiento, la migración folicular basado en las interacciones con las células de la granulosa. En fetos de último tercio en alpacas se estima una población de folículos preantral de 80 000, que representa la reserva ovárica que será utilizada a lo largo de la vida reproductiva. Los mecanismos intraováricos que activan una pequeña cantidad de folículos primordiales es un proceso progresivo y altamente regulado. Siendo la alpaca una especie oriunda y de importancia económica en el Perú, los estudios que permitan la maximizar la conservación de germoplasma son de importancia para la ciencia. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la adición de Kit Ligand (KL) (100 ng/mL) y/o bpV (HOpic) (10  $\mu$ M) sobre la activación y sobrevivencia *in vitro* de folículos preantrales de alpaca. Se cultivaron fragmentos corticales ováricos de 11 alpacas adultas durante 24 h en medio de cultivo de tejidos ( $\alpha$ -MEM+; Minimum Essential Medium) suplementado con bpV y KL o la asociación de ambos. En cada tratamiento dos fragmentos se fijaron en paraformaldehído (4% en PBS) antes y después de cultivo a 4° C para la histología clásica. Los tejidos se deshidrataron en alcohol, se aclararon con xileno y se incluyeron en parafina, y fue seccionado en serie a 7  $\mu$ m con un micrótopo rotatorio (Leica). Las secciones histológicas se montaron y tiñeron con hematoxilina-eosina. Los folículos preantrales se clasificaron según su etapa de desarrollo primordial, primario y secundario. Nuestros resultados muestran una reducción de folículos primordiales (reserva) en más del 50% en tejido folicular cultivado *in vitro* en  $\alpha$ -MEM+ o suplementado con bpV y/o KL versus el control (no cultivado). Asimismo, un incremento >25% de folículos primarios en tejido folicular cultivado *in vitro* en  $\alpha$ -MEM+ o suplementado con bpV y/o KL versus el control. Sin embargo, la tasa de sobrevivencia folicular evidencio un descenso del 20% en los tejidos cultivados, a excepción del tratamiento  $\alpha$ -MEM+ suplementado con asociación de bpV y KL. En conclusión, la suplementación conjunta de bpV (10  $\mu$ M) y KL (100 ng/mL) promovió la activación de folículos primordiales y mantuvo la sobrevivencia luego del cultivo *in vitro* de tejido ovárico de alpaca.

**Palabras clave:** Folículos preantrales, activación folicular, sobrevivencia folicular, histología.

## ABSTRACT

In mammals, folliculogenesis begins in the fetal stage and is a complex and dynamic process involving quiescence, activation, growth, and follicular migration based on interactions with granulosa cells. In fetuses of the last third in alpacas, a population of preantral follicles is estimated at 80,000, which represents the ovarian reserve that will be used throughout reproductive life. The intraovarian mechanisms that activate a small number of primordial follicles is a progressive and highly regulated process. Since the alpaca is a native species of economic importance in Peru, studies that allow maximizing the conservation of germplasm are important for science. Therefore, the objective of the study was to evaluate the effect of the addition of Kit Ligand (KL) (100 ng/mL) and/or bpV (HOpic) (10  $\mu$ M) on the in vitro activation and survival of alpaca preantral follicles. Ovarian cortical fragments from 11 adult alpacas were cultured for 24 h in tissue culture medium ( $\alpha$ -MEM+; Minimum Essential Medium) supplemented with bpV and KL or the combination of both. In each treatment two fragments were fixed in paraformaldehyde (4% in PBS) before and after culture at 4°C for classical histology. The tissue was dehydrated in alcohol, cleared with xylene and embedded in paraffin, and serially sectioned at 7  $\mu$ m with a rotary microtome (Leica). Histological sections were mounted and stained with hematoxylin-eosin. Preantral follicles were classified according to their stage of primordial, primary, and secondary development. Our results show a reduction of primordial (reserve) follicles by more than 50% in follicular tissue cultured in vitro in  $\alpha$ -MEM+ or supplemented with bpV and/or KL versus the control (uncultured). Likewise, a >25% increase in primary follicles in follicular tissue cultured in vitro in  $\alpha$ -MEM+ or supplemented with bpV and/or KL versus control. However, the follicular survival rate showed a decrease of 20% in the cultured tissues, except for the  $\alpha$ -MEM+ treatment supplemented with an association of bpV and KL. In conclusion, the joint supplementation of bpV (10  $\mu$ M) and KL (100 ng/mL) promoted the activation of primordial follicles and maintained survival after in vitro culture of alpaca ovarian tissue.

**Keywords:** Preantral follicles, follicular activation, follicular survival, histology.

## I INTRODUCCIÓN

Durante la vida reproductiva de los mamíferos, los folículos preantrales representan la principal reserva ovárica (Alves et al., 2018; Dipaz-Berrocal et al., 2020). Varios estudios han descrito la población de folículos preantrales en la corteza ovárica en humanos (Gougeon y Chainy, 1987) y otras especies de interés zootécnico (Silva-Santos et al., 2011; Lundy et al., 1999; Lucci et al., 2001), siendo los folículos primordiales las que más predominan.

La mayoría de los folículos primordiales ováricos se mantienen en reposo (Kim, 2012), solo algunos de estos se activan para salir de la reserva ovárica y desarrollarse a etapas foliculares posteriores (Cordeiro et al., 2015). En muchas especies, existe una activación espontánea de los folículos primordiales (Braw-Tal y Yossefi, 1997; Hovatta et al., 1999; Silva et al., 2004; Haag et al., 2013), la cual también conlleva a una pérdida gradual de folículos que no llegan a activarse (Fortune, 2003). Estos últimos contribuyen al envejecimiento reproductivo femenino a la vez que resulta en un desaprovechamiento del material genético (Adhikari y Liu, 2009). En este contexto, la alpaca es una especie que constituye un recurso genético de gran importancia social, económica, cultural y científica para el Perú y para algunos países de la Región Andina. Por lo tanto, los estudios que permitan la conservación y mejoramiento de esta especie son de importancia nacional.

Frente a este problema, el cultivo de folículos *in vitro* permite el uso futuro de una gran cantidad de ovocitos inmaduros encerrados en folículos preantrales (De Figueiredo et al., 2019), siendo este un modelo de estudio donde se puede aprovechar para ensayar estimuladores potenciales que maximicen la activación folicular (Fortune, 2003). Por lo tanto, el uso *in vitro* de productos farmacéuticos estimuladores de las vías de activación folicular, presentan una oportunidad para minimizar la pérdida de los folículos primordiales, salvaguardando este material genético que se pierde *in vivo* de forma natural.

Estimuladores como los bisperoxovanadios (bpV), son moléculas inhibitoras de PTEN que promueven la vía fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa / fosfatidilinositol- 3-kinasa

/ proteína quinasa B (PTEN/PI3K/AKT) (Schmid et al., 2004), la vía principal de señalización que coordina la activación, el crecimiento y la diferenciación de los folículos (Reddy et al., 2008; Jagarlamudi et al., 2009; Adhikari y Liu, 2009; Fort et al., 2019). De la misma forma, Kit-Ligand y relación con su receptor (kit), mantienen una función fundamental al promover la activación a través de la vía PI3K/AKT (John et al., 2009; Kim y Kurita, 2018). Además, Li et al. (2010) informaron que la adición de un inhibidor de PTEN y un activador PI3K en tejido ovárico da como resultado la activación del folículo primordial hacia los folículos preovulatorios. Sin embargo, a pesar de la importancia de la interacción entre el inhibidor de PTEN y Kit-Ligand, solo se ha reportado su eficacia para la activación *in vitro* de folículos primordiales en ovejas (Adib et al., 2019).

Por lo tanto se presenta una oportunidad de extrapolar los conocimientos de activación del folículo primordial a otras especies de interés zootécnico, tales como la alpaca, ya que no existen reportes previos de cultivo *in vitro* de folículos preantrales en esta especie. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de Kit Ligand y/o bpV (HOpic) sobre la activación y sobrevivencia *in vitro* de folículos preantrales de alpaca.

## II REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Ovogénesis

La ovogénesis es un proceso complejo en los mamíferos que conduce a la producción de ovocitos funcionales, los cuales dependen del folículo ovárico y la interacción entre el ovocito y las células foliculares circundantes, siendo esta asociación importante para el proceso de activación, crecimiento y maduración de los ovocitos (Li et al., 2018).

El proceso de formación de ovocitos se origina de células germinales primordiales que proliferan por mitosis originando ovogonias, estas últimas crecen para formar ovocitos primarios que entran en meiosis (Zhai et al., 2019). Los ovocitos progresan a través de las etapas de la profase I de la meiosis (leptoteno, cigoteno y paquiteno) y se detienen en la etapa de diploteno. Los ovocitos permanecen detenidos en la etapa de diploteno y la meiosis no se reanuda hasta justo antes de la ovulación en respuesta a un aumento de la hormona luteinizante (Pepling, 2013).

Al empezar la etapa reproductiva (pubertad), el ovocito primario completa la primera división meiótica, lo que da como resultado la formación del ovocito secundario y el primer cuerpo polar, una pequeña célula no funcional que posteriormente degenera. La segunda división meiótica comienza inmediatamente con la ovulación y se completa si ocurre la fecundación, lo que conduce a la creación del cigoto con extrusión del segundo cuerpo polar (McLenan et al., 2015)(Figura 1).

Paralelo al crecimiento ovocitario ocurre la foliculogénesis (Figura 2), donde las células del estroma ovárico (pregranulosas) rodean el ovocito primario para formar los folículos primordiales. La formación de folículos ocurre antes del nacimiento en humanos (durante el segundo trimestre del desarrollo fetal) e inmediatamente después del nacimiento en ratones (Pepling, 2006).

Los ovocitos primarios dentro de los folículos primordiales permanecen latentes hasta la pubertad y luego se activan como un conjunto de folículos reclutados continuamente. Los

folículos primordiales dan lugar a folículos primarios en los que el ovocito aumenta de tamaño y las células de la granulosa aplanadas se convierten en células foliculares cuboidales. (Zhai et al., 2019). A medida que los folículos maduran, los ovocitos primarios forman la zona pelúcida y las células de la granulosa cuboidales adquieren capas adicionales, lo que indica la progresión a la etapa secundaria. Varios factores producidos por los ovocitos y las células de la granulosa y teca, como lo son el Factor de Crecimiento Diferencial 9 (GDF-9) y la proteína morfogenética ósea 15 (BMP-15), son importantes para la progresión de los folículos primarios a secundarios (Gazdag et al., 2009).

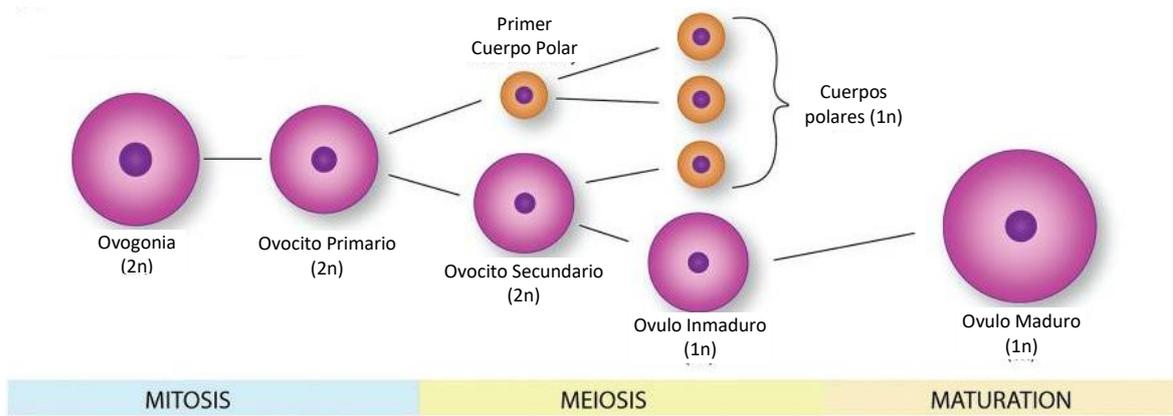


Figura 1. Representación esquemática de la ovogénesis de los mamíferos desde la ovogonia hasta el óvulo maduro (Adaptado de Preston et al., 2019)

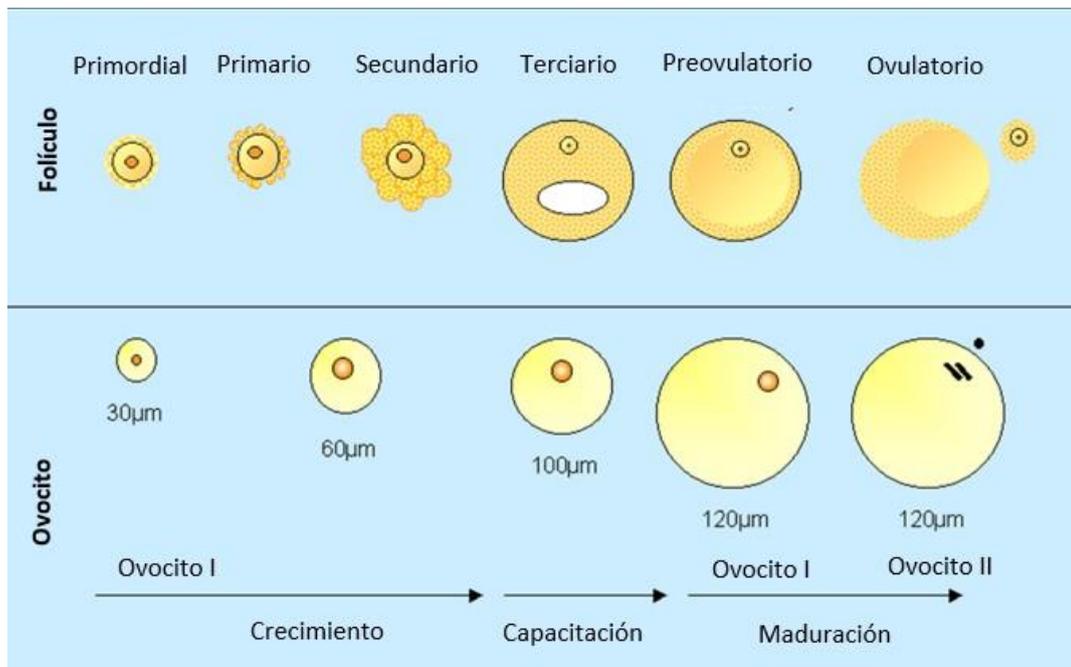


Figura 2. Representación esquemática del crecimiento, capacitación y maduración de los ovocitos bovinos a través de la foliculogénesis (Adaptado de Mermillod et al., 1999)

## 2.2 Foliculogénesis

La foliculogénesis es un el proceso largo y complejo que comprende el desarrollo de los folículos ováricos a partir de una reserva ovárica (folículos primordiales) que se establecieron en la etapa fetal y que termina con la ovulación o la atresia folicular (Monniaux et al., 2019). Los folículos ováricos contienen un ovocito y podemos diferenciarlos en dos grupos, los folículos dormantes (folículos primordiales) y los folículos en crecimiento (primarios, secundarios, terciarios y ovulatorios). A su vez, los folículos en crecimiento se pueden clasificar en dos fases: (i) la fase de crecimiento temprano (preantral) que comprenden los folículos primarios y secundarios, la cual presenta un crecimiento folicular independiente de gonadotropinas; y (ii) la fase de crecimiento tardía (antral) que comprende los folículos terciarios y preovulatorios, la cual presenta dependencia de gonadotropinas para el crecimiento folicular (Findlay et al., 2019). Todos los estadios del folículo se presentan en la figura 3.

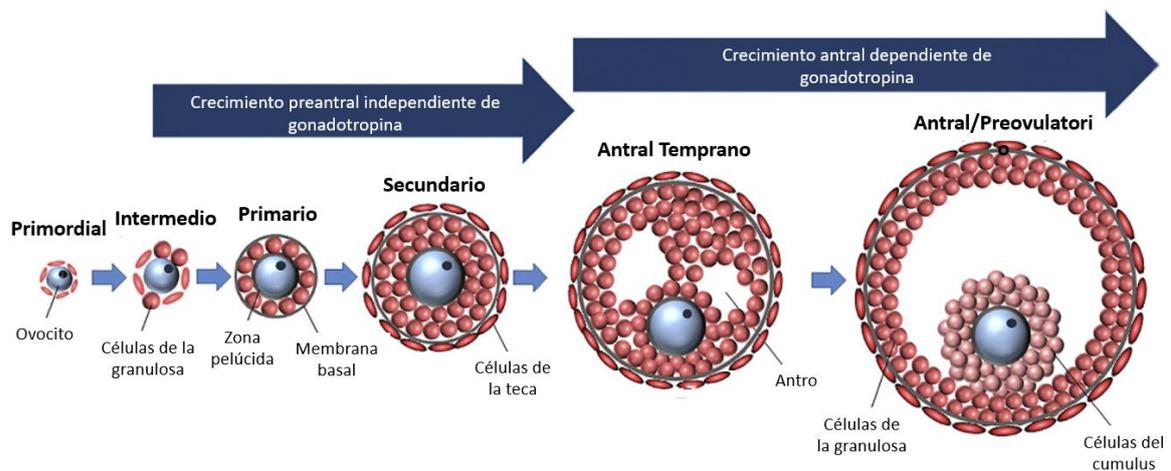


Figura 3. Representación esquemática de las etapas de la foliculogénesis de los mamíferos y su dependencia de gonadotropinas (Adaptado de Findlay et al., 2019)

### 2.2.1 Primordiales (dormantes)

Son folículos que albergan un pequeño ovocito detenido en la etapa de profase I de la meiosis y rodeado de células de la granulosa aplanadas (Conti y Chang, 2015) (Figura 4). Los ovocitos dentro de los folículos primordiales permanecen inactivos y se mantienen en este estado hasta morir o recibir señales de activación o inhibición de algún factor regulador negativo (Cordeiro et al., 2015).

Los folículos primordiales representan la reserva ovárica, no obstante, existen muchos más folículos primordiales que los necesarios para la ovulación, dado que estos pasan por una selección para su activación o muerte (Findlay et al., 2019). Un estricto control regula el proceso de activación folicular y así mantener la fertilidad durante la vida reproductiva (Gougeon, 1996). La muerte temprana de los folículos primordiales está relacionada con un número defectuoso de células de la granulosa aplanadas (Tilly, 2001) y/o fragmentación de ADN (Bristol-Gould et al., 2006).

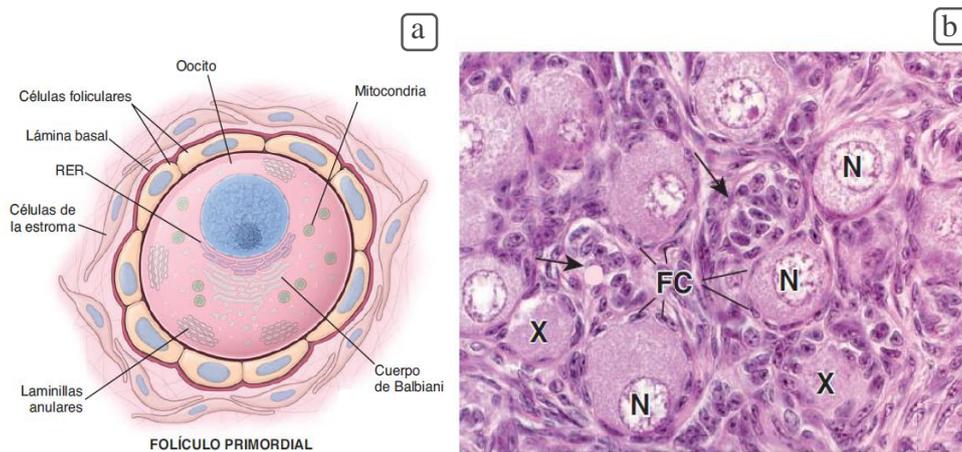


Figura 4. Folículo primordial. a. Diagrama esquemático de un folículo primordial. El ovocito está rodeado muy de cerca por una capa simple de células foliculares aplanadas. b. Fotomicrografía de folículos primordiales con los ovocitos rodeados por una capa simple de células foliculares aplanadas (FC). A menudo, el núcleo (N) del ovocito se encuentra en una posición excéntrica. Se señalan dos ovocitos en los cuales el núcleo no está incluido en el plano de corte (X) (Ross y Pawlina, 2007).

### 2.2.2 Primarios

Los folículos primarios están constituidos por una capa de células de la granulosa cuboidales (Meredith et al., 2000) con presencia de zona pelúcida, que rodea al ovocito (Epifano et al., 1995) (Figura 5). Estos folículos derivan del grupo de folículos primordiales que lograron activarse (Fortune et al., 2011). Para el mantenimiento de la supervivencia y desarrollo de los folículos primarios, son esenciales las señales autocrinas y paracrinas entre el ovocito y las células de la granulosa circundantes (Hornick et al. 2013). En particular, la interacción de Kit Ligand con su receptor kit cumple un papel fundamental en el desarrollo y supervivencia del folículo primario (Yoshida et al, 1997).

En esta etapa los ovocitos comienzan a producir GDF-9 y BMP-15, ligandos de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), los cuales ejercen efectos proliferativos en las células de la granulosa (Gilchrist et al., 2006; Otsuka y Shimasaki, 2002).

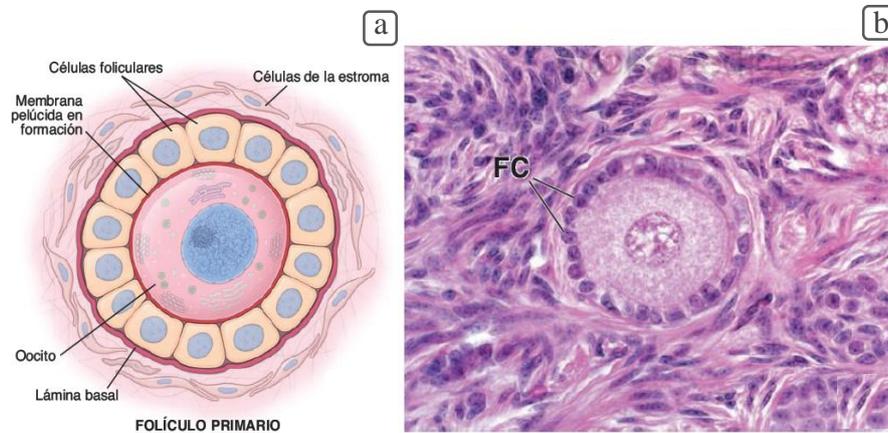


Figura 5. Folículo primario. a. Dibujo esquemático de un folículo primario. Una capa simple de células foliculares cúbicas rodea el ovocito en crecimiento. b. Fotomicrografía del folículo primario con una capa de células foliculares cuboidales (FC) bien definida que rodea el ovocito. (Ross y Pawlina, 2007)

### 2.2.3 Secundarios

Los folículos secundarios son más grandes que los folículos primarios y están constituidos por un ovocito primario encerrado por su zona pelúcida y rodeada por varias capas de células de la granulosa, además a partir de la segunda o tercera capa de células de la granulosa se presenta una capa de células de la teca y una lámina basal que divide estos dos tipos de células somáticas (Findlay, 2003) (Figura 6). Asimismo, durante la transición hacia la etapa secundaria las células de la granulosa se multiplican por interacción de muchas vías de señalización altamente interactivas, además los ovocitos experimentan un incremento en su volumen y finalmente, ocurre el reclutamiento y la organización de las células tecaes, las cuales son indispensables para la esteroidogénesis (Prasasya y Mayo, 2019)

La producción de **GDF-9** por parte del ovocito continúa en la etapa primaria y secundaria, estimulando la proliferación de las células de la granulosa y crecimiento de folículos a etapas posteriores (Fenwick et al., 2013). Además, GDF-9 participa también en el reclutamiento de

células de la teca (Juengel et al., 2005) la cual se forma justo fuera de la lámina basal que se encuentra alrededor de las células de la granulosa más externas (Magoffin, 2005).

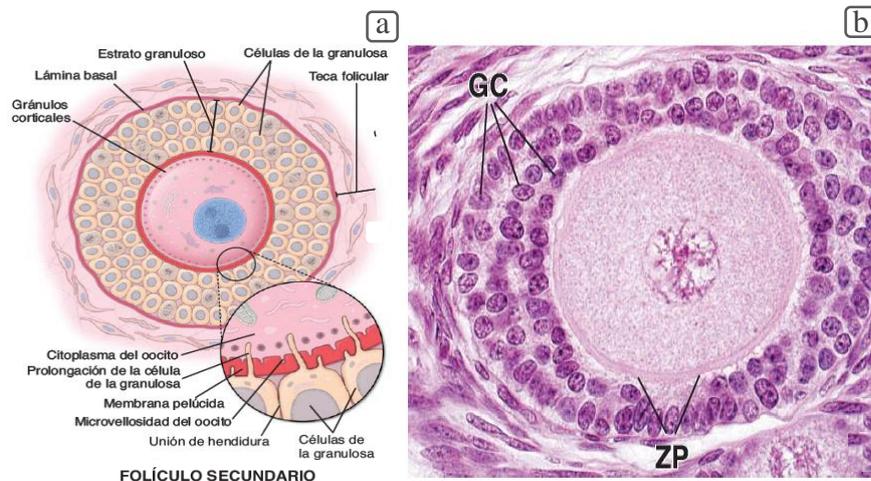


Figura 6. Folículo secundario. a. Dibujo esquemático de un folículo secundario que muestra una acumulación multiestratificada de células de la granulosa (diferenciadas a partir de células foliculares) que rodean el ovocito. b. Fotomicrografía del folículo secundario con múltiples capas de células de la granulosa (GC) que rodean el ovocito primario. La membrana pelúcida (ZP) está presente entre el ovocito y las células foliculares (Ross y Pawlina, 2007).

#### 2.2.4 Terciarios

La formación de folículos terciarios se asocia con la proliferación continua de células de la teca y la granulosa, mayor vascularización de la teca y mayor agrandamiento de los ovocitos (Cheon, 2012) (Figura 7). Es en esta etapa en la cual el ovario funciona como un órgano endocrino debido al aumento de la abundancia de transcritos para el receptor de FSH (FSHR) dentro de las células de la granulosa, que tras la traducción a FSHR provoca que los folículos respondan a la FSH circulante (Camp et al., 1991). Después de la pubertad, la FSH previene la atresia temprana del folículo antral al regular la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa (Hunzicker-Dunn y Maizels, 2006). Además, debido a la influencia de la FSH, se reduce el ciclo celular de las células de la granulosa y por lo tanto el periodo de duplicación de estas células pasa de siete días, que se requería en la etapa preantral, a solo unas 24 horas (Hirshfield, 1991).

Las características de la maduración de las células de la granulosa en respuesta a la señalización de FSH incluyen la expresión de genes implicados en la biosíntesis de esteroides, que conducen a una mayor producción de estradiol y progesterona, y la expresión del receptor de membrana para LH (Richards, 1980).

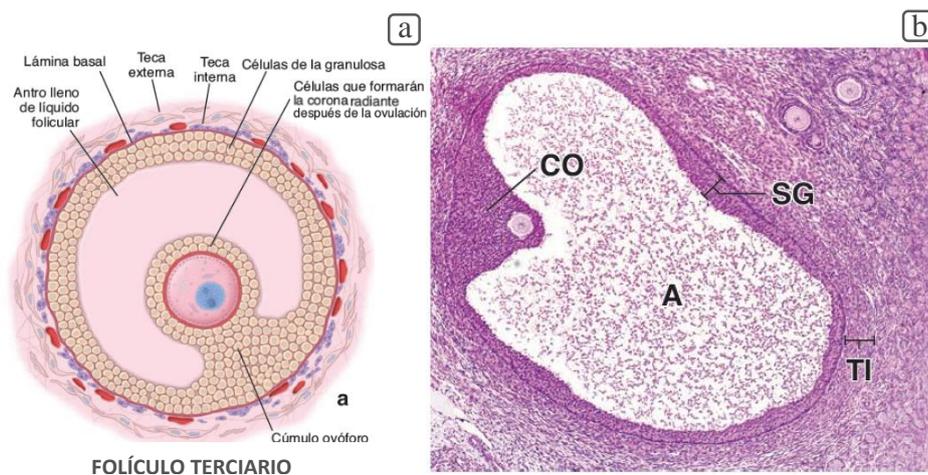


Figura 7. Folículo terciario. a. Dibujo esquemático de un folículo terciario con un gran antro que contiene un ovocito incluido dentro del cúmulo ovífero. b. Fotomicrografía de un folículo terciario. Nótese el gran antro (A) lleno de líquido y el cúmulo ovífero (CO) que contiene al ovocito. Las células restantes que rodean la luz del antro forman la membrana granulosa (el estrato granuloso, SG). La superficie del ovario es visible sobre la derecha. TI, teca interna (Ross y Pawlina, 2007).

## 2.3 Activación y crecimiento folicular

### 2.3.1 Activación de folículos primordiales

La activación folicular se refiere al proceso por el cual los folículos primordiales dejan de ser dormantes e ingresan al grupo de folículos en crecimiento (Reddy et al. 2010) y puede darse tan pronto se forman los folículos primordiales, aunque la mayoría pasa meses o años en estado inactivo (Hirshfield, 1991). Esta activación se encuentra regulada por un equilibrio entre factores estimuladores y reguladores (Adhikari y Liu, 2009), originados en ovocito, folículos adyacentes y células somáticas (Guzel y Oktem, 2017). El diagrama más más aceptado para esquematizar la activación folicular se presenta en la Figura 8, donde a través de la activación de mTORC1 en las células de la granulosa aplanadas, se logra la proliferación de las mismas y su diferenciación de células aplanadas hacia células de la granulosa cuboidales, al mismo tiempo promueve la expresión de Kit Ligand donde este último se une posteriormente al receptor KIT en la superficie del ovocito, lo que da como resultado la activación la señalización de la vía PI3K dentro del ovocito (Zhang y Liu, 2015).

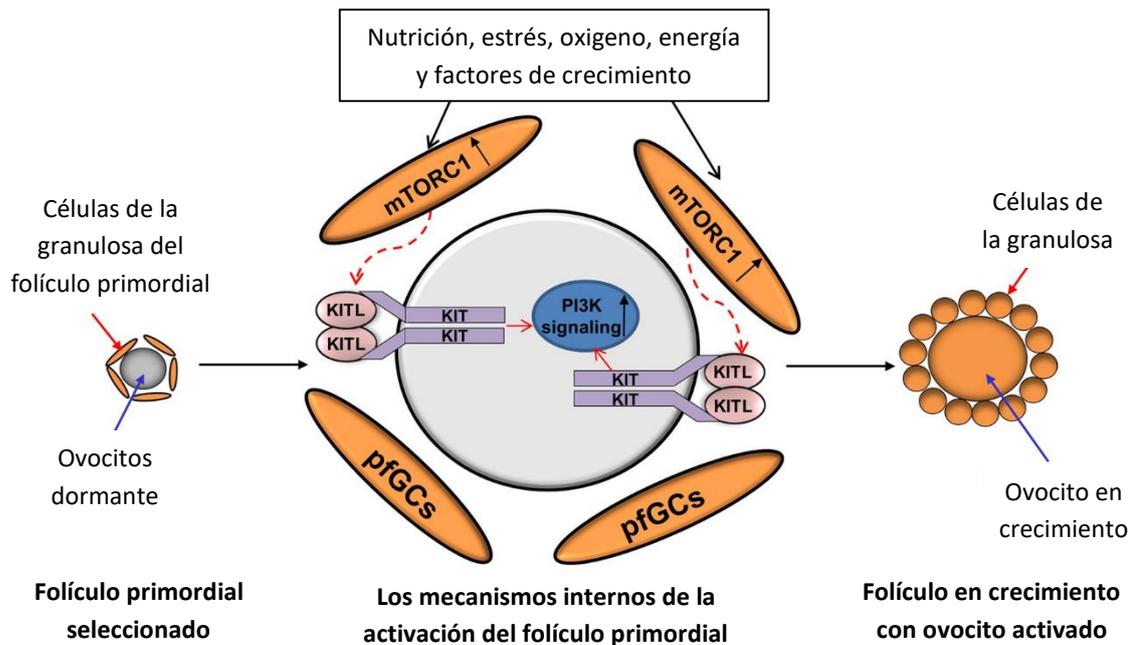


Figura 8. Diagrama de activación del folículo primordial en el ovario de mamífero (Adaptado Zhang y Liu, 2015).

La vía PI3K es la vía intracelular principal que coordina la activación, el crecimiento y la diferenciación de los folículos a través de la activación de la transcripción génica o la síntesis de proteínas (Reddy et al, 2008; Jagarlamudi et al, 2009; Adhikari y Liu, 2009; Fort *et al.*, 2019). Esta vía se encuentra regulada por un balance entre PI3K y PTEN), los cuales al recibir estímulos que favorezcan un desbalance positivo hacia PI3K, da inicio a una cascada de señalización para la activación de los ovocitos en el folículo primordial (Kim y Kurita, 2018). La producción de Kit Ligand en las células de la pregranulosa y su interacción con su receptor c-kit en el ovocito, ejercen una señal que estimula la señalización de PI3K (Driancourt et al., 2000; Li et al., 2020). Este desbalance positivo hacia PI3K generará que éste catalice la fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) hacia fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), a su vez PIP3 ancla la quinasa 1 dependiente de fosfoinosítido (PKD1) a la membrana plasmática que a su vez fosforila y activa la proteína quinasa B (PKB o AKT) (Prasasya y Mayo, 2019). Esta AKT fosforilada tiene muchos objetivos diferentes, sin embargo, su acción sobre FOXO3 es la más importante por encontrarse en el núcleo de los ovocitos manteniendo la dormancia del folículo primordial, pero cuando es fosforilado por AKT este sale del núcleo conduciendo a la activación del folículo primordial (John et al., 2008; Reddy et al., 2008; Castrillon et al., 2003) (Figura 9).



producidas respectivamente por los ovocitos y las células de la granulosa (Oktem y Urman, 2010)

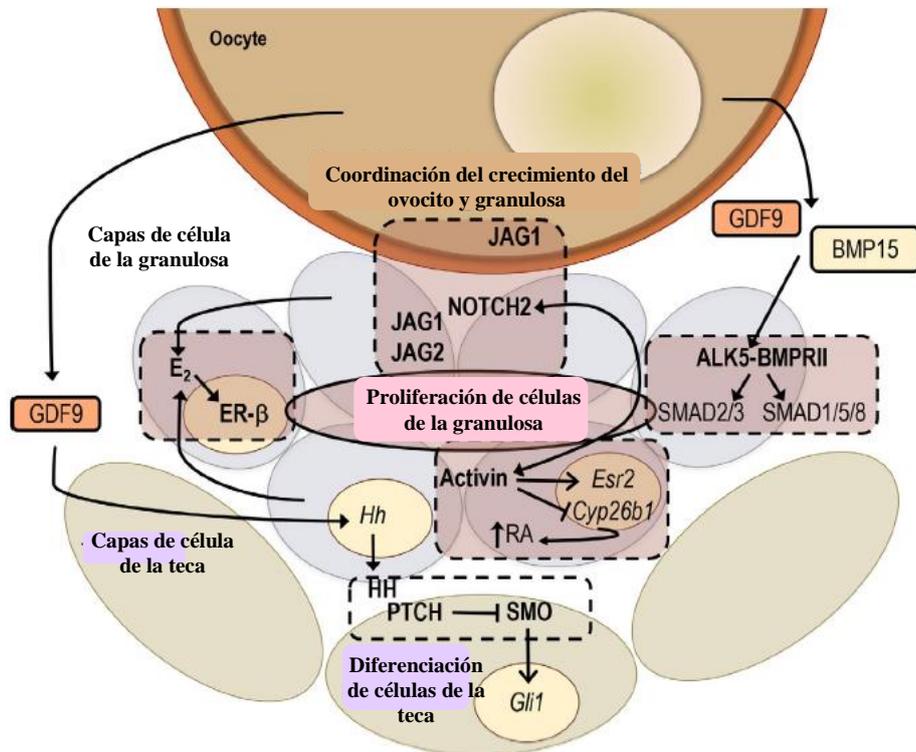


Figura 10. Vías de señalización del crecimiento del folículo primario (Adaptado de Prasasya y Mayo, 2019)

La comunicación entre las células de la granulosa para regular la proliferación de las mismas se da de forma paracrina por los ligandos TGF- $\beta$  los cuales estimulan la proliferación de las células de la granulosa en ratones o la inhiben en especies zootécnicas como bovinos, ovinos y porcinos (Juengel y McNatty, 2005). Otro ligando importante secretado por las células de la granulosa es la activina la cual ejerce efectos proliferativos sobre las mismas (Li et al., 1995). Tanto los ligandos TGF- $\beta$  como las activinas ejercen la acción proliferativa a través de la vía de señalización SMAD, la cual actúa en el núcleo como activador de genes de la proliferación de células de la granulosa (McGee y Raj, 2015).

Así como para la activación folicular, la función del kit Ligand y su receptor kit se caracteriza por la mediación de la interacción entre las células de la granulosa y el ovocito, mejorando el crecimiento (Packer et al., 1994) y supervivencia del ovocito (Moniruzzaman et al. 2007; John et al. 2009). A su vez, el crecimiento del ovocito en el folículo primario produce los ligandos GDF-9 y BMP-15 los cuales están estrechamente relacionados entre sí y tienen

acción cooperativa sobre las células de la granulosa estimulando su proliferación (Gilchrist et al., 2006). Además, se ha identificado que particularmente GDF-9 induce la diferenciación de las células de la granulosa a células de la teca (Liu et al. 2015).

## **2.4 Control *in vitro* de la activación y crecimiento folicular**

### **2.4.1 Estimuladores de activación folicular *in vitro***

En los últimos 10 años se han realizado estudios sobre la activación *in vitro* de los folículos primordiales usando diferentes niveles de bpV (HOpic) y/o Kit Ligand (KL) en diferentes especies de interés zootécnico como los bovinos (Spence et al., 2013; Maidarti et al., 2019), porcinos (Raffel et al., 2019) y ovinos (Adib et al., 2019); así como en ratones (Li et al. 2010; Adhikari et al., 2012; Kawamura et al., 2013; Morohaku et al., 2013) y seres humanos (McLaughlin et al., 2014; Novella-Maestre et al, 2015; Grosbois y Demeestere, 2018), obteniendo en todos los estudios una activación de los folículos primordiales en las primeras 24-48 horas. Tal como se muestra en el Tabla 1.

Tabla 1. Estudios sobre activación folicular *in vitro* usando bpV y/o Kit Ligand en diferentes especies en los últimos 10 años

Autor y Año	Especie	Dosis	Conclusión
Kawamura et al., 2013	ratón	30 $\mu$ M de bpV (HOpic) + 150 $\mu$ g/ml de 740YP	Se observo activación folicular y promovió el desarrollo de los folículos hasta la etapa antral
Spence et al., 2013	bovino	1, 10 o 100 mM de bpV (HOpic)	Se evidencio activación del folículo primordial en todas las dosis de bpV, sin embargo la sobrevivencia de los folículos fue muy baja
McLaughlin et al., 2014	humano	No cultivado, Control Cultivado sin bpV (HOpic) y Cultivo con 1 $\mu$ M de bpV (HOpic)	Se observo activación y crecimiento en el tratamiento con bpV. Posteriormente al aislarlos hubo poca sobrevivencia
Novella-Maestre et al, 2015	humano	100 $\mu$ M de bpV (pic)	Se observó un aumento de folículos activados y un crecimiento mayor a sus etapas posteriores.
Grosbois y Demeestere, 2018	humano	30 $\mu$ M de bpV (HOpic) + 150 $\mu$ g/ml de 740YP	Se demostró el efecto de bpV y 740YP contribuyendo a la activación de folículos primordiales.
Maidarti et al., 2019	bovino	1 y 10 $\mu$ M de bpV (HOpic)	Ambas dosis de bpV activaron los folículos primordiales y promovieron su crecimiento.
Raffel et al., 2019	porcino	No cultivado, Control cultivado, cultivado con 1 $\mu$ M de bpV (HOpic)	Se observó un efecto positivo sobre la activación y crecimiento folicular en el cultivo con bpV (HOpic)
Adib et al., 2019	oveja	T0: control, T1: 15 $\mu$ M de bpV (HOpic), T2: 100ng/ml de KL, T3: 15 $\mu$ M de bpV (HOpic) + 100ng/ml de KL	Se demostró un efecto sinérgico entre bpV y Kit Ligand al promover la activación, crecimiento y supervivencia de los folículos hasta la etapa secundaria.

## 2.4.2 Estimuladores de crecimiento folicular *in vitro*

En cuanto a los factores que influyen en el crecimiento del folículo primario, algunos estudios *in vitro* han demostrado que IGF-1 (Brito et al., 2012) y BMP-15 (Lima et al., 2012) en caprinos, FGF-2 (Sun y Li., 2013), GDF-9 (Vasconcelos et al., 2013) y Activina A (Silva et al., 2014) en bovinos; y Activina A en ratones (Tanaka et al., 2019) estimulan el crecimiento de ovocitos y la transición de folículos primarios a secundarios y superiores. Tal como se muestra en la Tabla 2.

En los últimos años se ha esclarecido la función sobre el crecimiento folicular de 2 factores de crecimiento más importantes como lo son GDF-9 y BMP15, los cuales son secretados por los ovocitos y tienen como objetivo las células de la granulosa.

Se ha demostrado que la interacción de GDF-9 como BMP-15 controla la expresión de Kit Ligand, el cual es esencial para el crecimiento de los ovocitos (Sanfins et al., 2018). Se ha demostrado que BMP-15 estimula su expresión de Kit Ligand, mientras que GDF-9 inhibe su expresión (Gilchrist et al., 2008). Las interacciones entre GDF-9, BMP-15 y Kit Ligand están reguladas por la FSH, la cual regula los niveles de expresión de estos factores (Thomas y Vanderhyden, 2006). Si bien Kit Ligand, GDF-9 y BMP-15 pueden desempeñar diferentes funciones durante el desarrollo folicular, también existen interacciones significativas entre estos factores las cuales se presentan a continuación en la Figura 11.

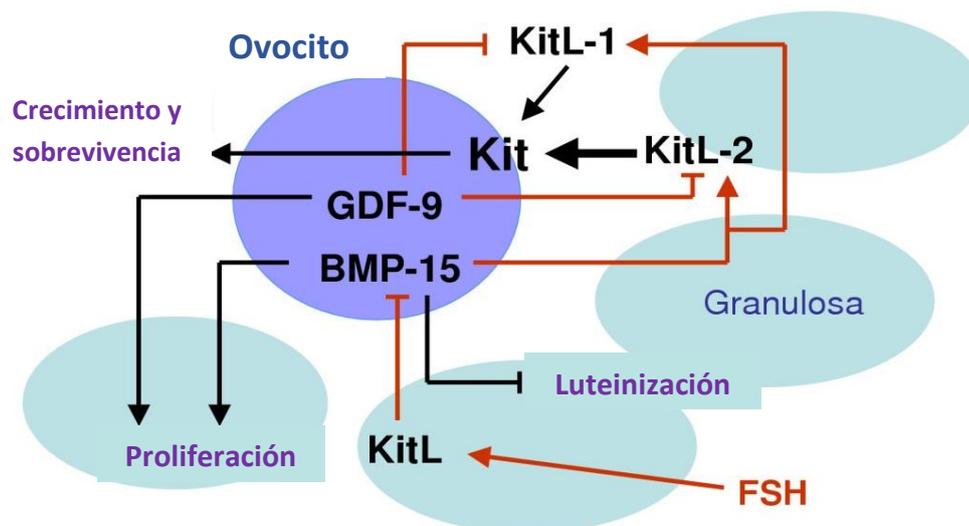


Figura 11. Interacciones de GDF9, BMP15 y Kit Ligand durante el desarrollo de ovocitos y folículos (Adaptado de Thomas y Vanderhyden, 2006)

Tabla 2. Estudios sobre crecimiento folicular in vitro usando factores de crecimiento en diferentes especies

Autor y Año	Revista	Especie	Factor de crecimiento	Conclusión
Brito et al., 2012	Research in Veterinary Science, 93(2), 729-732	caprino	IGF-1	Mejora el crecimiento del folículo, la formación del antro, la supervivencia
Lima et al., 2012	Cell and tissue research, 348(1), 225-238	caprino	BMP-15	Influye positivamente en la formación del antro, el crecimiento del folículo y mantiene la ultraestructura folicular
Sun y Li., 2013	Reproductive biology, 13(3), 221-228	bovino	FGF-2	Aumenta la supervivencia y el crecimiento de los folículos, apoya el crecimiento y la maduración de los folículos in vitro
Vasconcelos et al., 2013	Reproduction, Fertility and Development, 25(8), 1194-1203.	bovino	GDF-9	Promueve el crecimiento folicular, la formación del antro
Silva et al., 2014	Livestock Science, 160, 199-207	bovino	Activina A	Promueve la proliferación de células de la granulosa, la formación del antro y el mantenimiento de la morfología del ovocito
Tanaka et al., 2019	The Journal of Medical Investigation, 66(1.2), 165-171.	ratón	Activina A	Se aceleró el crecimiento de los folículos preantrales, aumentando su tamaño, estadio morfológico y síntesis de estradiol

### III METODOLOGÍA

#### 3.1 Lugar

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional de Huancavelica y en el Laboratorio de Histología y Citología del Centro de Investigación en Tecnología de Embriones (CIETE) perteneciente al Programa de Investigación en Mejoramiento Animal de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

#### 3.2 Diseño Experimental

Se usaron los ovarios de 11 alpacas adultas donde cada par de ovarios se dividió en 10 fragmentos corticales. Dos de las diez piezas fueron tomadas para ser parte del tratamiento control no cultivado, estas se fijaron inmediatamente en paraformaldehído 4% y se procedieron a procesar mediante histología clásica. El resto de piezas se dividió en dos piezas por tratamiento y se cultivaron *in vitro* por 24 horas. Posterior al cultivo, los fragmentos fueron también fijados en paraformaldehído y finalmente procesadas mediante histología clásica (Figura 12).

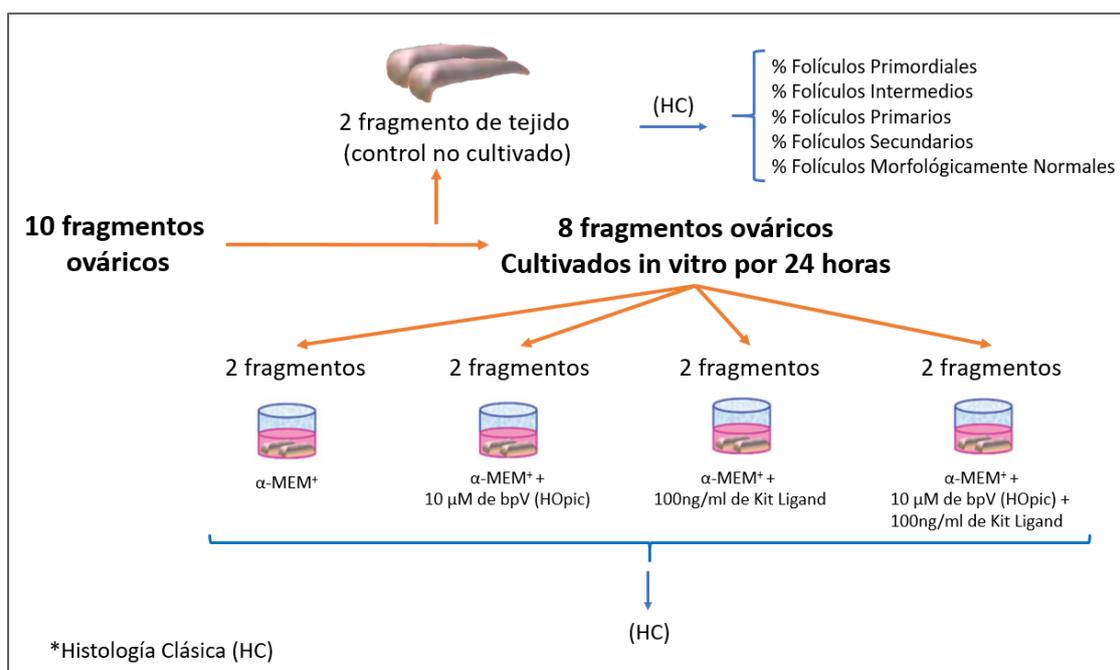


Figura 12. Diseño experimental para evaluar los efectos de bpV (HOpic) y/o Kit Ligand en la activación y supervivencia de folículos preantrales de alpaca

### 3.3 Recuperación y preparación del tejido ovárico de alpaca

Se obtuvieron ovarios de 11 alpacas adultas procedentes del camal municipal de Huancavelica, éstos se lavaron con alcohol al 70% seguido por dos lavados con Medio Mínimo Esencial ( $\alpha$ -MEM) (M8042, SIGMA) suplementado con HEPES, 100  $\mu$ g/mL de penicilina y 100  $\mu$ g/mL de estreptomina. Posteriormente, las muestras se transportaron al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional de Huancavelica en tubos de 50 mL a 4°C en el mismo medio. En el laboratorio se separó la corteza de la médula usando un bisturí (Figura 13). Los fragmentos corticales de cada par de ovarios se dividieron en 10 piezas con una dimensión aproximada de 3 x 3 x 1 mm<sup>3</sup> (Anexo 1). Dos de las piezas tomadas al azar fueron fijadas inmediatamente en paraformaldehído como parte del tratamiento control (no cultivado), y el resto se dividió aleatoriamente en cada tratamiento.



Figura 13. Corte de fragmentos corticales de ovario de alpaca

### 3.4 Cultivo *in vitro* de fragmento ovárico de alpaca

Los fragmentos de tejido ovárico en los tratamientos se cultivaron en el medio de cultivo  $\alpha$ -MEM (M8042, SIGMA) suplementado con 1% ITS (10  $\mu$ g/mL insulina, 5  $\mu$ g/mL, 5 ng/mL transferrina), 0.23 mM de piruvato, 2 mM de glutamina y 1.25 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA) el cual fue llamado  $\alpha$ -MEM+. Según cada tratamiento se le adicionó 10  $\mu$ M de bpV (HOpic), 100 ng/mL de Kit Ligand o la asociación de ambos (Tabla 3). Cada medio fue incubado 1 hora antes de su uso. Los fragmentos se cultivaron durante 18 horas a 39 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en el incubador portátil Labmix (WTA, Brasil) (Figura 14) y trasladado en

el mismo incubador hacia el Laboratorio de Histología y Citología donde se traspasó las muestras del incubador portátil hacia una placa de cultivo de 24 pocillos (Figura 15) donde se cultivó por las 6 horas restantes en un incubador convencional. Cada tratamiento se repitió cuatro veces usando el par de ovarios de cuatro animales diferentes.

Tabla 3. Descripción de los tratamientos por suplementos al medio de cultivo

<b>Tratamiento</b>	<b>Suplementos del medio de cultivo</b>		
	<b>a-MEM+</b>	<b>bpV (HOpic) (10<math>\mu</math>M)</b>	<b>Kit Ligand (100ng/ml)</b>
No Cultivado	-	-	-
Tratamiento 1	X	-	-
Tratamiento 2	X	X	-
Tratamiento 3	X	-	X
Tratamiento 4	X	X	X



Figura 14. Incubador Portatil CO2 Labmix (WTA)

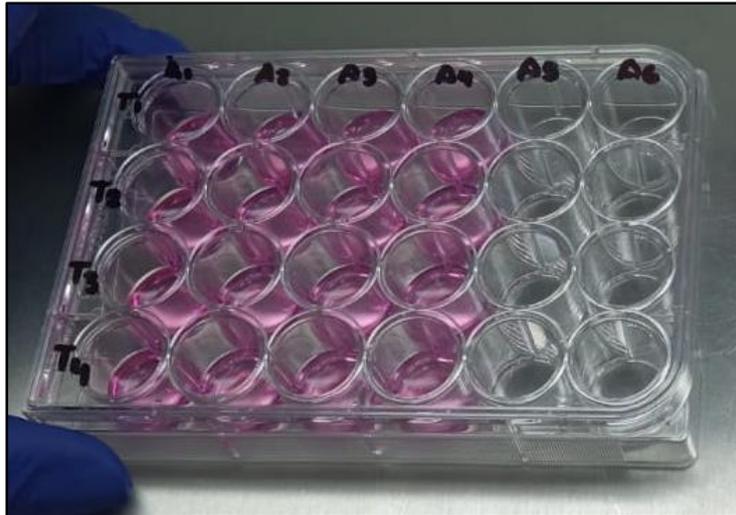


Figura 15. Placa de cultivo de 24 pocillos con medio de cultivo y muestras correspondientes a cada tratamiento

### 3.5 Procesamiento histológico

Después del cultivo, todas las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4%-solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7.4) por 12 horas, luego fueron colocadas en alcohol al 70% hasta su procesamiento. El día del procesamiento los fragmentos ováricos fueron deshidratados en concentraciones ascendentes de alcoholes (80%, 90% y alcohol absoluto). Posteriormente fueron clarificados en lavados sucesivos con xilol. Por último, los fragmentos de tejido ovárico fueron embebidos en parafina y almacenados en refrigeración. Cada bloque de parafina que contiene el fragmento ovárico fue seccionado a un grosor de 7  $\mu\text{m}$  (Anexo 2). Estas secciones se montaron en láminas y teñidas con la coloración Hematoxilina (Figura 16). Para la evaluación, las láminas se observaron con un microscopio óptico (Carl Zeiss Primo Star, Alemania) a aumentos de x100 y x400 para el conteo y clasificación de los folículos (Ferreira et al., 2013, Nascimento et al., 2016) (Anexo 3).



Figura 16. de Batería de tinción Hematoxilina y Eosina

La clasificación del estadio folicular preantral se realizó siguiendo los lineamientos de Silva et al. (2004): folículos con una capa de células de granulosa aplanadas alrededor del ovocito fueron considerados folículos primordiales, los folículos que tuvieron tanto células de la granulosa aplanadas como cuboidales alrededor del ovocito se consideraron folículos intermedios, los folículos con una capa completa de células de la granulosa cuboidales alrededor del ovocito se consideraron folículos primarios y finalmente los folículos con dos o más capas de células de la granulosa cuboidales se clasificaron como folículos secundarios (Figura 17). Sólo fueron considerados los folículos con núcleo visible. Por otro lado, los folículos que presentaron un ovocito con núcleo picnótico, retracción citoplasmática o desorganización de las células de la granulosa fueron considerados como folículos anormales (Figura 18).

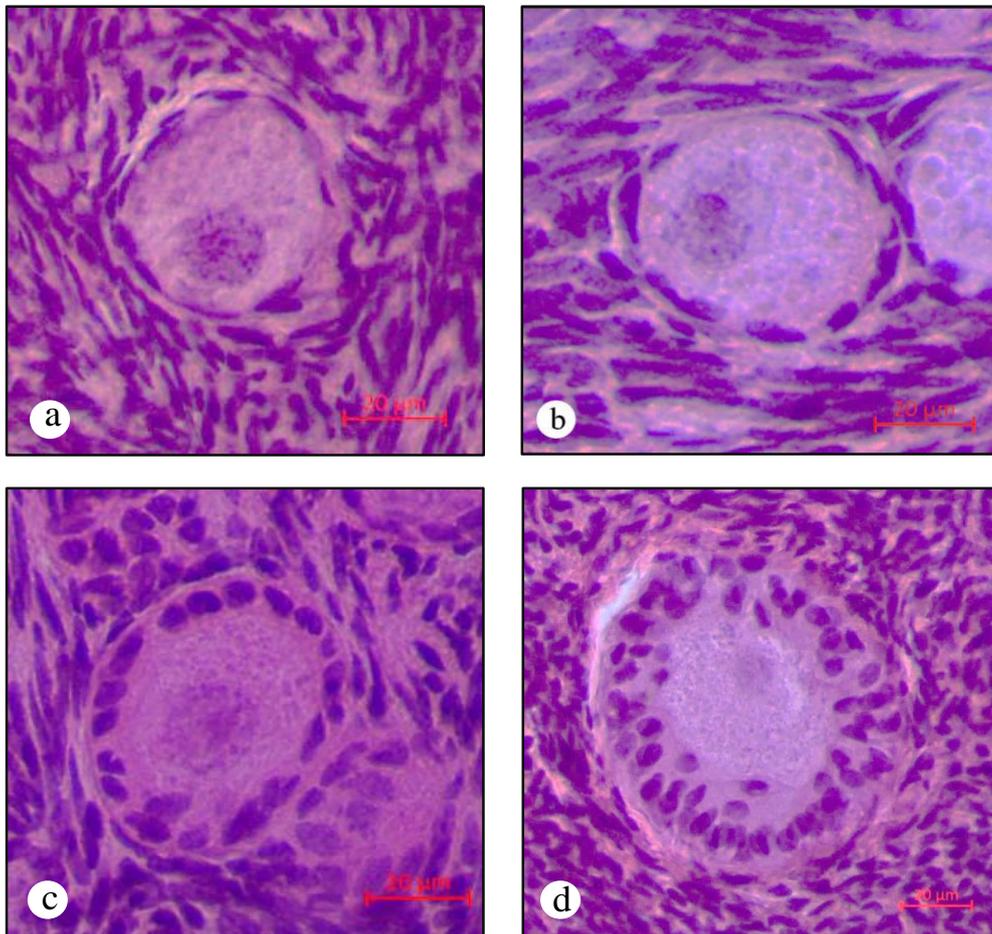


Figura 17. Microfotografías de las categorías foliculares preantrales normales encontradas en la corteza ovárica de alpaca. Folículo primordial (a) folículo intermedio (b) folículo primario (c) y folículo secundario (d).

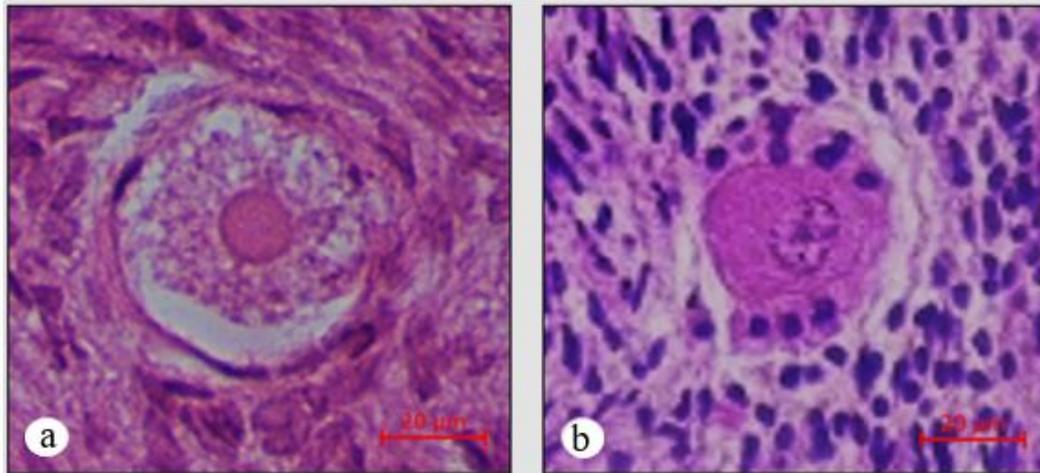


Figura 18. Microfotografías de los folículos preantrales anormales de alpacas. Retracción citoplasmática (a), desorganización de las células de la granulosa (b).

### 3.6 Variables a evaluar

Las variables a evaluar fueron: el porcentaje de folículos morfológicamente normales (sobrevivencia folicular), porcentaje de folículos primordiales, intermedio, primario y secundario (activación y crecimiento folicular). La evaluación de cada tratamiento se realizó en el día 0 (control no cultivado) y después de 24 horas de cultivo.

### 3.7 Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a la prueba Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad y al Test de Levene para la homogeneidad de varianzas, demostrando significancia para estas pruebas. La diferencia entre grupos se analizó mediante análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey. El valor de  $P < 0.05$  indicó que una diferencia fue significativa. Para toda la evaluación de los datos se utilizó el programa SPSS (IBM SPSS Statistics v2).

#### IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron 1.100 secciones histológicas de fragmentos corticales de ovarios de alpaca. Entre todos los tratamientos, se contabilizaron un total de 3.323 folículos preantrales los cuales fueron analizados para determinar la etapa de desarrollo.

En la tabla 4 se muestran los porcentajes de folículos preantrales primordiales, transición, primarios y secundarios y anormales en controles no cultivados y tratamientos cultivados durante 24h. Después del cultivo, el examen microscópico mostró que el porcentaje de folículos primordiales se redujo significativamente en todos los grupos cultivados en comparación con el tejido no cultivado ( $p < 0.05$ ). A su vez, se evidencio un aumento del porcentaje de folículos primarios en todos los tratamientos cultivados en comparación con el control no cultivado. No obstante, entre los tratamientos cultivados, el grupo suplementado con la asociación de bpV y KL mostró una mayor proporción de folículos primarios ( $p < 0.05$ ) en comparación al grupo  $\alpha$ -MEM+, pero la misma proporción entre los grupos cultivados solo con bpV y solo con KL. No se observaron diferencias significativas en los folículos intermedios y secundarios en el control no cultivado y los tratamientos cultivados.

Tabla 4. Distribución del promedio de los folículos preantrales normales (primordial, intermedio, primario, secundario) y anormales en ovarios de alpaca según tratamientos.

	<b>Primordial, n (% ± SD)</b>	<b>Intermedio, n (% ± SD)</b>	<b>Primario, n (% ± SD)</b>	<b>Secundario, n (% ± SD)</b>	<b>Anormales, n (% ± SD)</b>
<b>No Cultivado</b>	447 (65.62 ± 8.50)a	70 (10.39 ± 3.66)a	58 (8.46 ± 4.11)a	5 (0.69 ± 1.03)a	100 (14.85 ± 4.51)a
<b>α-MEM+</b>	90 (14.54 ± 9.48)b	78 (12.17 ± 7.83)a	230 (35.97 ± 11.26)b	5 (0.89 ± 1.68)a	235 (36.43 ± 10.14)c
<b>α-MEM+ + bpV</b>	76 (11.05 ± 7.09)b	94 (13.48 ± 9.74)a	266 (39.17 ± 10.14)bc	3 (0.44 ± 1.03)a	238 (35.86 ± 8.61)c
<b>α-MEM+ + KL</b>	47 (7.71 ± 5.73)b	108 (17.29 ± 8.83)a	290 (43.67 ± 8.31)bc	2 (0.25 ± 0.56)a	204 (31.07 ± 6.62)bc
<b>α-MEM+ + bpV + KL</b>	58 (8.46 ± 6.56)b	120 (17.58 ± 9.41)a	333 (49.25 ± 11.37)c	7 (1.02 ± 1.85)a	159 (23.68 ± 7.36)ab

a,b Letras distintas en la misma columna muestras diferencias significativas (P<0.05)

No existe evidencia de estudios que evalúen la activación y sobrevivencia *in vitro* de folículos preantrales en alpacas. En este estudio se evaluó por primera vez el efecto de bpV y/o KL en el cultivo *in vitro* de folículos preantrales de fragmentos ováricos de alpaca. Los resultados obtenidos muestran que tanto el cultivo *in vitro* en  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> o suplementado con 10  $\mu$ M de bpV (HOpic), 100 ng/mL de Kit Ligand o la asociación de ambos, promueve la activación y sobrevivencia de los folículos.

Estudios previos en ratones han demostrado que bpV (HOpic) da como resultado una activación y crecimiento de los folículos primordiales hasta la generación de ovocitos maduros (Li *et al.*, 2010). En seres humanos McLaughlin *et al.* (2014), reportaron activación y crecimiento en el tratamiento con bpV (HOpic), sin embargo posteriormente al aislarlos hubo poca sobrevivencia por parte de estos los folículos.

Por otro lado Kawamura *et al.*, 2013 y Grosbois y Demeestere, 2018, probaron el efecto de usar el inhibidor de PTEN como lo es bpV (HOpic) y un activador de la vía PI3K como 740YP, en ratones y seres humanos respectivamente, para ambos casos se demostró el efecto de bpV (HOpic) y 740YP contribuyendo a la aceleración de la activación de folículos primordiales.

Los hallazgos de este estudio también concuerdan con estudios *in vitro* en otras especies de interés zootécnico como el bovino (Maidarti *et al.*, 2019), donde activaron los folículos primordiales y promovieron su crecimiento a etapas posteriores. Sin embargo, esto se acompañó con daño del ADN tanto en los ovocitos como en las células de la granulosa. Por otro lado en porcinos (Raffel *et al.*, 2019), se observó un efecto positivo sobre la activación y crecimiento folicular. Y finalmente, en ovinos (Adib *et al.*, 2019) donde además de la dosis de bpV (HOpic) se le adicionó Kit Ligand (activador de la vía PI3K) demostró un efecto sinérgico entre ambos al promover la activación, crecimiento y supervivencia de los folículos.

El efecto de bpV y KL se da a nivel de la vía PTEN/PI3K/AKT la cual es la vía intracelular principal que coordina la activación, el crecimiento y la diferenciación de los folículos a través de la activación de la transcripción génica o la síntesis de proteínas (Reddy *et al.*, 2008; Jagarlamudi *et al.*, 2009; Adhikari y Liu, 2009; Fort *et al.*, 2019). Esta vía se encuentra regulada por un balance entre PI3K y PTEN, donde usando modelos knockout (Reddy *et al.*, 2008) o recibiendo estimuladores y/o inhibidores farmacológicos (Adhukari *et al.*, 2012),

que favorezcan un desbalance positivo hacia PI3K, da inicio a una cascada de señalización para la activación de los ovocitos en el folículo primordial (Kim y Kurita, 2018)

Los bisperoxovanadios (bpV) son moléculas derivadas de vanadato el cual actúa como un inhibidor reversible de las proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas), las cuales comparten el mismo centro activo con PTEN, haciendo que los compuestos de bpV también inhiban PTEN y convirtiéndolas en un importante regulador de la vía PI3K que genere la activación y el desarrollo del folículo ovárico en fragmentos de tejido (Schmid *et al.*, 2004). Así mismo, Kit Ligand es un promotor de crecimiento secretado por las células de la granulosa de los folículos primordiales y primarios y afecta a los ovocitos, la teca y las células del estroma, siendo también un principal promotor de la activación del folículo primordial (Truck, *et al.*, 2015). La activación del folículo primordial *in vivo* a través de Kit Ligand inicia en las células de la pregranulosa donde la activación de la señalización diana de complejo 1 de rapamicina en mamíferos (mTORC1) aumenta los niveles de KL y este se une a su receptor kit en la superficie del ovocito, activando así la vía PI3K antes mencionada, la cual activa el folículo primordial (Zhang et al., 2014). Adicionalmente a su acción como activador folicular, la unión de KL con su receptor kit en el ovocito actúa sobre las diferentes etapas foliculares regulando su desarrollo y sobrevivencia (Celestino *et al.*, 2009).

Estudios *in vitro* han demostrado a KL como una opción para complementar el medio de cultivo para mejorar la supervivencia y el desarrollo *in vitro* de los folículos preantrales ováricos (Celestino *et al.*, 2009). En modelos murinos, la presencia de KL en el medio de cultivo inhibió la apoptosis de los ovocitos de los folículos primordiales (Jin et al., 2005). De la misma manera, la inhibición de la interacción de KL con su receptor kit en el ovocito promovió su apoptosis (Reynaud et al., 2000).

En especies de interés zootécnico, Moniruzzaman y Miyano (2007) mostraron que el cultivo con KL no promovió el crecimiento ni el desarrollo folicular de tejidos ováricos de cerdos prepúberes, sin embargo, se obtuvo una mayor sobrevivencia folicular en el grupo tratado con KL. En caprinos, Lima et al. (2012), obtuvieron un alto porcentaje de folículos normales en los grupos tratados con KL logrando mantener la sobrevivencia folicular y promover la activación de los folículos primordiales. Finalmente, en ovinos Adib *et al.*, (2019) realizaron un experimento donde demostró que la asociación de bpV y KL, además de promover la activación, redujo significativamente la cantidad de folículos anormales.

En este estudio también se obtuvo activación del folículo primordial con el medio  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> el cual no difirió significativamente en el porcentaje de activación de los tratamientos con los estimuladores. El medio  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> se usa para tener una referencia de la activación espontánea que se tiene de manera natural, sin embargo se obtuvo una alta tasa de activación. Celestino *et al.* (2010) también obtuvieron un alto porcentaje de folículos que se activaron en su medio de control. Esto pudo deberse a que para ambos experimentos este medio control fue suplementado con ITS, cuyo uno de sus componentes es la insulina. Kezele *et al.* (2002) y Junger *et al.* (2003), probaron que la insulina también promueve la transición del folículo primordial al primario a través de la inhibición de FOX3 el cual se encuentra dentro del núcleo cuando el ovocito está en estado primordial y es fosforilado y expulsado al citoplasma del ovocito cuando ocurre la activación folicular.

## V CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos las conclusiones son las siguientes:

- La suplementación con bpV (HOpic) (10  $\mu$ M) y/o Kit Ligand (100 ng/mL) promovió la activación de folículos primordiales hacia la etapa primaria luego del cultivo *in vitro* de tejido ovárico de alpaca.
- La suplementación conjunta de bpV (HOpic) (10  $\mu$ M) y Kit Ligand (100 ng/ml) mantuvo la sobrevivencia de los folículos preantrales luego del cultivo *in vitro* de tejido ovárico de alpaca.

## **VI RECOMENDACIONES**

Los resultados obtenidos en la investigación, permiten realizar las siguientes recomendaciones

- Evaluar nuevos parámetros como pueden ser diámetro folicular y ovocitario de los folículos preantrales de alpaca
- Realizar pruebas inmunohistoquímicas del tejido de corteza ovárica de alpaca con el fin de evaluar apoptosis celular
- Realizar cultivos *in vitro* en un tiempo más prolongado (48, 72 y 92 horas) con el propósito de evaluar el crecimiento y desarrollo folicular.

## VII BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari, D., & Liu, K. (2009). Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine reviews*, 30(5), 438-464.
- Adhikari, D., Gorre, N., Risal, S., Zhao, Z., Zhang, H., Shen, Y., & Liu, K. (2012). The safe use of a PTEN inhibitor for the activation of dormant mouse primordial follicles and generation of fertilizable eggs. *PLoS one*, 7(6), e39034.
- Adib, S., Valojerdi, M. R., & Alikhani, M. (2019). Dose optimisation of PTEN inhibitor, bpV (HOpic), and SCF for the in-vitro activation of sheep primordial follicles. *Growth Factors*, 37(3-4), 178-189.
- Alves, B. G., Alves, K. A., Gastal, G. D., Gastal, M. O., Figueiredo, J. R., & Gastal, E. L. (2018). Spatial distribution of preantral follicles in the equine ovary. *PloS one*, 13 (6)
- Braw-Tal, R., & Yossefi, S. (1997). Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Reproduction*, 109(1), 165-171.
- Bristol-Gould, S. K., Kreeger, P. K., Selkirk, C. G., Kilen, S. M., Cook, R. W., Kipp, J. L., Shea, L. D., Mayo, K. E., & Woodruff, T. K. (2006). Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Developmental biology*, 298(1), 132–148. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.025>
- Brito, I. R., Saraiva, M. V. A., Araújo, V. R., Celestino, J. J. H., Magalhães-Padilha, D. M., Lima, I. M. T., ... & Silva, J. R. V. (2012). The effect of IGF-1 and FSH on the *in vitro* development of caprine secondary follicles and on the IGF-1, IGFR-I and FSHR mRNA levels. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 729-732.
- Buccione, R., Schroeder, A. C., & Eppig, J. J. (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of reproduction*, 43(4), 543-547.

- Camp, T. A., Rahal, J. O., & Mayo, K. E. (1991). Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Molecular endocrinology*, 5(10), 1405-1417.
- Castrillon, D.H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J.W., DePinho, R.A. (2003). Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 301, 215–218.
- Cheon, Y. P. (2012). Regulation and 3D culture of tertiary follicle growth. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 39(3), 95.
- Conti, M., & Chang, R. J. (2015). Folliculogenesis, Ovulation, and Luteogenesis. In *Endocrinology: Adult and Pediatric* (Vol. 2–2, pp. 2179-2191.e3).
- Cordeiro, M. H., Kim, S. Y., & Woodruff, T. K. (2015). Ovarian Follicle Biology and the Basis for Gonadotoxicity. In *Cancer Treatment and the Ovary: Clinical and Laboratory Analysis of Ovarian Toxicity* (pp. 3–20)
- De Figueiredo, J. R., Cadenas, J., de Lima, L. F., & Santos, R. R. (2019). Advances in *in vitro* folliculogenesis in domestic ruminants. *Animal Reproduction (AR)*, 16(1), 52-65.
- Dipaz-Berrocal, D. J., Sá, N. A. R., Guerreiro, D. D., Celestino, J. J. H., Leiva-Revilla, J., Alves, B. G., ... & Figueiredo, J. R. (2017). Refining insulin concentrations in culture medium containing growth factors BMP15 and GDF9: An *in vitro* study of the effects on follicle development of goats. *Animal reproduction science*, 185, 118-127.
- Dipaz-Berrocal, D., Rojas, G., Mamani, C., & Mellisho, E. (2020). 128 Study of preantral ovarian follicular population in fetal alpaca (*Vicugna pacos*) ovaries. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(2), 191-191.
- Driancourt, M. A., Reynaud, K., Cortvrindt, R., & Smitz, J. (2000). Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Reviews of reproduction*, 5(3), 143–152. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0050143>

- Epifano, O., Liang, L. F., Familiari, M., Moos, M. C., Jr, & Dean, J. (1995). Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development* (Cambridge, England), 121(7), 1947–1956.
- Fenwick, M. A., Mora, J. M., Mansour, Y. T., Baithun, C., Franks, S., & Hardy, K. (2013). Investigations of TGF- $\beta$  signaling in preantral follicles of female mice reveal differential roles for bone morphogenetic protein 15. *Endocrinology*, 154(9), 3423–3436. <https://doi.org/10.1210/en.2012-2251>
- Findlay, J. K. (2003). Folliculogenesis (H. L. Henry & A. W. B. T.-E. of H. Norman (eds.); pp. 653–656). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-341103-3/00141-8>
- Findlay, J. K., Dunning, K. R., Gilchrist, R. B., Hutt, K. J., Russell, D. L., & Walters, K. A. (2019). Follicle selection in mammalian ovaries. In *The Ovary* (pp. 3-21). Academic Press.
- Ford, E., Beckett, E. L., Roman, S., McLaughlin, E. A., & Sutherland, J. (2019). Advances in human primordial follicle activation and premature ovarian insufficiency. *Reproduction*, 1(aop).
- Fortune, J. E. (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal reproduction science*, 78(3-4), 135-163.
- Fortune, J. E., Yang, M. Y., & Muruvi, W. (2011). *In vitro* and *in vivo* regulation of follicular formation and activation in cattle. *Reproduction, fertility, and development*, 23(1), 15–22. <https://doi.org/10.1071/RD10250>
- Gazdag, E., Santenard, A., Ziegler-Birling, C., Altobelli, G., Poch, O., Tora, L., & Torres-Padilla, M. E. (2009). TBP2 is essential for germ cell development by regulating transcription and chromatin condensation in the oocyte. *Genes & development*, 23(18), 2210-2223.
- Gilchrist, R. B., Lane, M., & Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human reproduction update*, 14(2), 159-177.

- Gilchrist, R. B., Ritter, L. J., Myllymaa, S., Kaivo-Oja, N., Dragovic, R. A., Hickey, T. E., Ritvos, O., & Mottershead, D. G. (2006). Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *Journal of cell science*, 119(Pt 18), 3811–3821. <https://doi.org/10.1242/jcs.03105>
- Gougeon A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine reviews*, 17(2), 121–155. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-2-121>
- Gougeon, A., & Chainy, G. B. N. (1987). Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *Reproduction*, 81(2), 433-442.
- Grosbois, J., & Demeestere, I. (2018). Dynamics of PI3K and Hippo signaling pathways during *in vitro* human follicle activation. *Human Reproduction*, 33(9), 1705-1714.
- Guzel, Y., & Oktem, O. (2017). Understanding follicle growth *in vitro*: Are we getting closer to obtaining mature oocytes from *in vitro*-grown follicles in human?. *Molecular reproduction and development*, 84(7), 544-559.
- Haag, K. T., Magalhaes-Padilha, D. M., Fonseca, G. R., Wischral, A., Gastal, M. O., King, S. S., ... & Gastal, E. L. (2013). *In vitro* culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. *Theriogenology*, 79(6), 911-917.
- Hirshfield, A. N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. In *International review of cytology* (Vol. 124, pp. 43-101). Academic Press.
- Hornick, J. E., Duncan, F. E., Shea, L. D., & Woodruff, T. K. (2013). Multiple follicle culture supports primary follicle growth through paracrine-acting signals. *Reproduction* (Cambridge, England), 145(1), 19–32. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0233>
- Hovatta, O., Wright, C., Krausz, T., Hardy, K., & Winston, R. M. (1999). Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Human Reproduction*, 14(10), 2519-2524.
- Hunzicker-Dunn, M., & Maizels, E. T. (2006). FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cellular signalling*, 18(9), 1351-1359.

- Jagarlamudi, K., Liu, L., Adhikari, D., Reddy, P., Idahl, A., Ottander, U., ... & Liu, K. (2009). Oocyte-specific deletion of Pten in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation. *PLoS one*, 4(7).
- Jin, X., Han, C. S., Yu, F. Q., Wei, P., Hu, Z. Y., & Liu, Y. X. (2005). Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 70(1), 82-90.
- John, G. B., Shidler, M. J., Besmer, P., & Castrillon, D. H. (2009). Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. *Developmental biology*, 331(2), 292-299.
- John, G.B., Gallardo, T.D., Shirley, L.J., Castrillon, D.H. (2008). Foxo3 is a PI3Kdependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Dev. Biol.* 321, 197–204
- Juengel, J. L., & McNatty, K. P. (2005). The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Human reproduction update*, 11(2), 143–160. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh061>
- Junger, M. A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J. D., Végh, M., Radimerski, T., ... & Hafen, E. (2003). The Drosophila forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *Journal of biology*, 2(3), 1-17.
- Kawamura, K., Cheng, Y., Suzuki, N., Deguchi, M., Sato, Y., Takae, S., Ho, C. H., . . . Hsueh, A. J. (2013). Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 17474–17479.
- Kezele, P. R., Nilsson, E. E., & Skinner, M. K. (2002). Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Molecular and cellular endocrinology*, 192(1-2), 37-43.

- Kim, J. Y. (2012). Control of ovarian primordial follicle activation. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 39(1), 10
- Kim, S. Y., & Kurita, T. (2018). New Insights into the Role of Phosphoinositide 3-Kinase Activity in the Physiology of Immature Oocytes: Lessons from Recent Mouse Model Studies. *European Medical Journal. Reproductive health*, 3(2), 119.
- Li, J., Kawamura, K., Cheng, Y., Liu, S., Klein, C., Liu, S., ... & Hsueh, A. J. (2010). Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(22), 10280-10284.
- Li, J., Zhang, Y., Zheng, N., Li, B., Yang, J., Zhang, C., ... & Zhang, M. (2020). CREB activity is required for mTORC1 signaling-induced primordial follicle activation in mice. *Histochemistry and Cell Biology*.
- Li, R., Phillips, D. M., & Mather, J. P. (1995). Activin promotes ovarian follicle development *in vitro*. *Endocrinology*, 136(3), 849–856. <https://doi.org/10.1210/endo.136.3.7867593>
- Li, Y., Adur, M. K., Hale, B. J., & Ross, J. W. (2018). Regulation of oogenesis by noncoding RNAs. In *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 190–196). Elsevier.
- Lima, I. M. T., Brito, I. R., Rossetto, R., Duarte, A. B. G., Rodrigues, G. Q., Saraiva, M. V. A., ... & Rodrigues, A. P. R. (2012). BMPRII and BMPRII mRNA expression levels in goat ovarian follicles and the *in vitro* effects of BMP-15 on preantral follicle development. *Cell and tissue research*, 348(1), 225-238.
- Lima, I. M. T., Celestino, J. J. H., Faustino, L. R., Magalhães-Padilha, D. M., Rossetto, R., Brito, I. R., ... & Rodrigues, A. P. R. (2012). Dynamic medium containing kit ligand and follicle-stimulating hormone promotes follicular survival, activation, and growth during long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Cells Tissues Organs*, 195(3), 260-271.
- Liu, C., Peng, J., Matzuk, M. M., & Yao, H. H. (2015). Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. *Nature communications*, 6, 6934. <https://doi.org/10.1038/ncomms7934>

- Lucci, C. M., Silva, R. V., Carvalho, C. A., Figueiredo, R., & Bao, N. (2001). Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research*, 41(1), 61-69.
- Lundy, T., Smith, P., O'connell, A., Hudson, N. L., & McNatty, K. P. (1999). Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *Reproduction*, 115(2), 251-262.
- Magoffin D. A. (2005). Ovarian theca cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(7), 1344–1349. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.016>
- Maidarti, M., Clarkson, Y. L., McLaughlin, M., Anderson, R. A., & Telfer, E. E. (2019). Inhibition of PTEN activates bovine non-growing follicles *in vitro* but increases DNA damage and reduces DNA repair response. *Human Reproduction*, 34(2), 297-307.
- Matzuk, M. M., & Burns, K. H. (2012). Genetics of mammalian reproduction: modeling the end of the germline. *Annual review of physiology*, 74, 503–528. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153248>
- McGee, E. A., & Raj, R. S. (2015). Regulators of ovarian preantral follicle development. *Seminars in reproductive medicine*, 33(3), 179–184. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1552584>
- McLaughlin, M., Kinnell, H. L., Anderson, R. A., & Telfer, E. E. (2014). Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary *in vitro* results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles. *Molecular Human Reproduction*, 20, 736–744.
- Meredith, S., Dudenhoefter, G., & Jackson, K. (2000). Classification of small type B/C follicles as primordial follicles in mature rats. *Journal of reproduction and fertility*, 119(1), 43–48. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1190043>
- Mermillod, P., Oussaid, B., & Cognie, Y. (1999). Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY-SUPPLEMENT-*, 449-460.

- Moniruzzaman, M., & Miyano, T. (2007). KIT-KIT ligand in the growth of porcine oocytes in primordial follicles. *Journal of Reproduction and Development*, 0710170019-0710170019.
- Moniruzzaman, M., Sakamaki, K., Akazawa, Y., & Miyano, T. (2007). Oocyte growth and follicular development in KIT-deficient Fas-knockout mice. *Reproduction (Cambridge, England)*, 133(1), 117–125. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0161>
- Monniaux D, Cadoret V, Clément F, Dalbies-Tran R, Elis S, Fabre S, Maillard V, Monget P, Uzbekova S (2019) Folliculogenesis. In: Huhtaniemi I, Martini L (eds) *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, 2nd edn. Elsevier, Oxford, pp 377–398
- Morohaku, K., Hoshino, Y., Sasada, H., & Sato, E. (2013). Incorporation of phosphatase inhibitor in culture prompts growth initiation of isolated non-growing oocytes. *PLoS One*, 8(11), e77533.
- Novella-Maestre, E., Herraiz, S., Rodríguez-Iglesias, B., Díaz-García, C., & Pellicer, A. (2015). Short-term PTEN inhibition improves *in vitro* activation of primordial follicles, preserves follicular viability, and restores AMH levels in cryopreserved ovarian tissue from cancer patients. *PLoS One*, 10(5), e0127786.
- Oktem, O., & Urman, B. (2010). Understanding follicle growth *in vivo*. *Human reproduction (Oxford, England)*, 25(12), 2944–2954. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq275>
- Otsuka, F., & Shimasaki, S. (2002). A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 8060-8065.
- Packer, A. I., Hsu, Y. C., Besmer, P., & Bachvarova, R. F. (1994). The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. *Developmental biology*, 161(1), 194–205. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1020>
- Pepling, M. (2013). Oocyte development before and during folliculogenesis. In *Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals* (pp. 1-19). Wiley Blackwell.

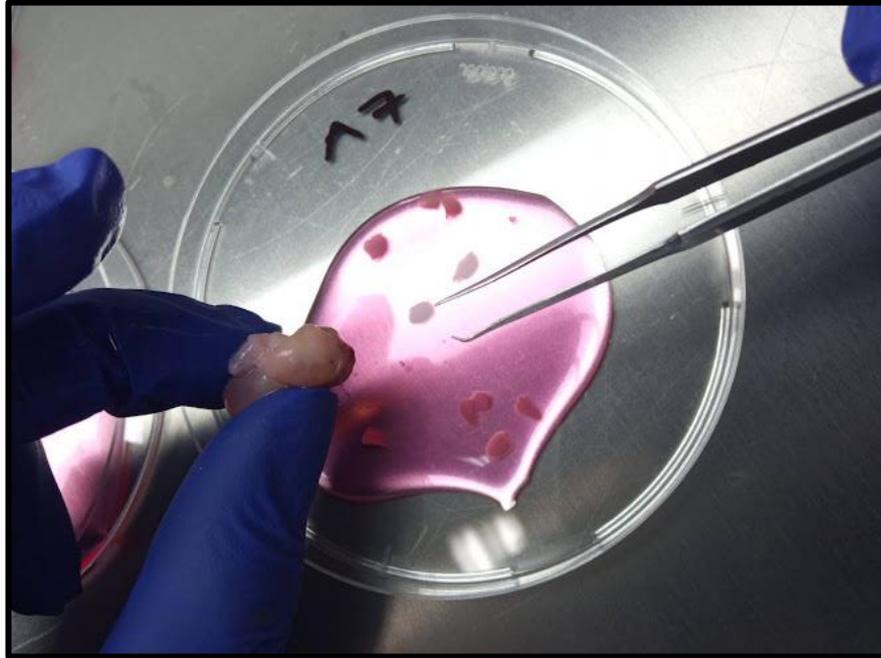
- Pepling, M. E. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *genesis*, 44(12), 622-632.
- Prasasya, R. D., & Mayo, K. E. (2019). Regulation of Follicle Formation and Development by Ovarian Signaling Pathways. In *The Ovary* (pp. 23–49). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813209-8.00002-9>
- Preston, C. C., Storm, E. C., Leonard, R. J., & Faustino, R. S. (2019). Emerging roles for nucleoporins in reproductive cellular physiology. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 97(4), 257-264.
- Raffel, N., Klemm, K., Dittrich, R., Hoffmann, I., Söder, S., Beckmann, M. W., & Lotz, L. (2019). The effect of bpV (HOpic) on *in vitro* activation of primordial follicles in cultured swine ovarian cortical strips. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(8), 1057-1063.
- Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., Du, C., Tang, W., Hamalainen, T., Peng, S.L., Lan, Z.J., Cooney, A.J., Huhtaniemi, I., Liu, K. (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 319, 611–613.
- Reddy, P., Zheng, W., & Liu, K. (2010). Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.10.001>
- Reynaud, K., Cortvrindt, R., Smitz, J., & Driancourt, M. A. (2000). Effects of kit ligand and anti-kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 56(4), 483-494.
- Richards, J. S. (1980). Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiological reviews*, 60(1), 51-89.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2007). *Histología: Texto y Atlas*. Ed. Médica Panamericana.
- Sanfins, A., Rodrigues, P., & Albertini, D. F. (2018). GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(10), 1741-1750.

- Schmid, A. C., Byrne, R. D., Vilar, R., & Woscholski, R. (2004). Bisperoxovanadium compounds are potent PTEN inhibitors. *FEBS letters*, 566(1-3), 35-38.
- Silva, A. W. B., Bezerra, F. T. G., Costa, J. J. N., Rossi, R. O. D. S., Passos, M. J., Vasconcelos, G. L., ... & Silva, J. R. V. (2014). Differential effects of activin-A and FSH on growth, viability and messenger RNA expression in cultured bovine preantral follicles. *Livestock Science*, 160, 199-207.
- Silva, J. R., van den Hurk, R., de Matos, M. H., dos Santos, R. R., Pessoa, C., de Moraes, M. O., & de Figueiredo, J. R. (2004). Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, 61(9), 1691-1704.
- Silva-Santos, K. C., Santos, G. M. G., Siloto, L. S., Hertel, M. F., Andrade, E. R., Rubin, M. I. B., ... & Seneda, M. M. (2011). Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, 76(6), 1051-1057.
- Spence, S., Anderson, R. A., & Telfer, E. E. (2013). O-222 The role of the phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K) pathway in bovine primordial follicle activation and the regulation of ovarian follicle growth *in vitro*. *Human Reproduction*, 28(suppl\_1).
- Sun, J., & Li, X. (2013). Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture *in vitro*. *Reproductive biology*, 13(3), 221-228.
- Tanaka, Y., Matsuzaki, T., Tanaka, N., Iwasa, T., Kuwahara, A., & Irahara, M. (2019). Activin effects on follicular growth in *in vitro* preantral follicle culture. *The Journal of Medical Investigation*, 66(1.2), 165-171.
- Thomas, F. H., & Vanderhyden, B. C. (2006). Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive biology and endocrinology*, 4(1), 1-8.
- Tilly, J. L. (2001). Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(11), 838-848.

- Trombly, D. J., Woodruff, T. K., & Mayo, K. E. (2009). Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis. *Seminars in reproductive medicine*, 27(1), 14–23. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1108006>
- Vasconcelos, G. L., Saraiva, M. V. A., Costa, J. J. N., Passos, M. J., Silva, A. W. B., Rossi, R. O. D. S., ... & Silva, J. R. V. (2013). Effects of growth differentiation factor-9 and FSH on *in vitro* development, viability and mRNA expression in bovine preantral follicles. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(8), 1194-1203.
- Yoshida, H., Takakura, N., Kataoka, H., Kunisada, T., Okamura, H., & Nishikawa, S. I. (1997). Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology*, 184(1), 122–137. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8503>
- Zhai, F., Ma, X., Yan, L., & Qiao, J. (2019). The molecular genetics of oogenesis. In *Human Reproductive and Prenatal Genetics* (pp. 155–172). Elsevier.
- Zhang, H., Risal, S., Gorre, N., Busayavalasa, K., Li, X., Shen, Y., ... & Liu, K. (2014). Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Current Biology*, 24(21), 2501-2508.
- Zhang, H., & Liu, K. (2015). Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood. *Human reproduction update*, 21(6), 779-786.

## VIII ANEXOS

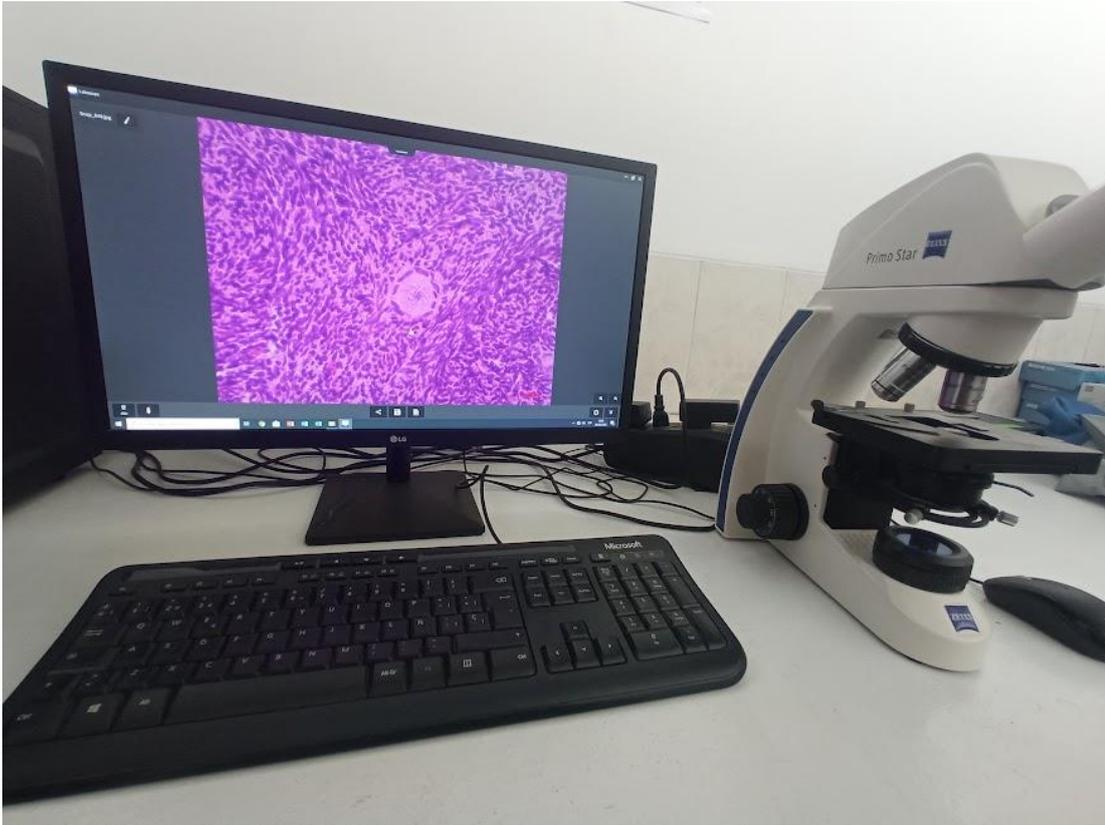
Anexo 1. Fragmentos corticales de ovario de alpaca



Anexo 2. Procesamiento histológico de las muestras usando microtomo (Leica)



### Anexo 3. Lectura de muestras en programa Labscope (ZEISS)



Anexo 4. Distribución de las medias de la proporción de los estadios de desarrollo de los folículos preantrales normales (primordial, intermedio, primario y secundario) y anormales en ovarios de alpaca según tratamientos.

<b>Descriptivos</b>						
		N	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
Primordial	No cultivado	11	65,62	8,501	59,91	71,33
	T1	11	14,54	9,478	8,17	20,90
	T2	11	11,05	7,086	6,29	15,81
	T3	11	8,49	5,400	4,62	12,35
	T4	11	9,31	6,243	4,84	13,77
	Total	55	22,29	23,628	15,77	28,80
Intermedio	No cultivado	11	10,39	3,664	7,92	12,85
	T1	11	12,17	7,828	6,91	17,43
	T2	11	13,48	9,743	6,93	20,02
	T3	11	17,29	8,832	11,36	23,22
	T4	11	17,58	9,411	11,26	23,91
	Total	55	14,18	8,393	11,91	16,45
Primario	No cultivado	11	9,30	3,169	7,03	11,57
	T1	11	35,97	11,265	28,40	43,54
	T2	11	39,17	10,141	32,36	45,99
	T3	11	43,68	8,314	38,09	49,26
	T4	11	49,25	11,370	41,61	56,89
	Total	55	35,96	16,363	31,49	40,42
Secundario	No cultivado	11	1,89	0,712	0,76	3,02
	T1	11	3,27	1,548	-0,57	7,12
	T2	11	2,39	1,103	-7,52	12,30
	T3	11	1,40	0,106	0,44	2,35
	T4	11	2,81	2,167	-0,63	6,26
	Total	55	2,41	1,406	1,64	3,19
Anormales	No cultivado	11	14,85	4,513	11,82	17,88
	T1	11	36,43	10,144	29,62	43,25
	T2	11	35,86	8,612	30,07	41,64
	T3	11	31,07	6,620	26,62	35,51
	T4	11	23,68	7,357	18,74	28,63
	Total	55	28,38	11,071	25,38	31,37

Anexo 5. Análisis de varianza para las diferencias entre medias de los tratamientos según proporción de los estadios de desarrollo de los folículos preantrales en ovarios de alpaca

<b>ANOVA</b>						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
	Entre grupos	26294,417	4	6573,604	115,304	,000
Primordial	Dentro de grupos	2736,538	48	57,011		
	Total	29030,955	52			
	Entre grupos	442,185	4	110,546	1,644	,178
Intermedio	Dentro de grupos	3362,073	50	67,241		
	Total	3804,258	54			
	Entre grupos	9818,633	4	2454,658	27,513	,000
Primario	Dentro de grupos	4371,614	49	89,217		
	Total	14190,247	53			
	Entre grupos	6,035	4	1,509	,697	,611
Secundario	Dentro de grupos	21,638	10	2,164		
	Total	27,673	14			
	Entre grupos	3664,514	4	916,128	15,508	,000
Anormal	Dentro de grupos	2953,801	50	59,076		
	Total	6618,315	54			

Anexo 6. Prueba de Tukey para comparaciones apareadas de medias de los tratamientos según estadio primordial en ovarios de alpaca

**Primordial**

HSD Tukey

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
T3	10	8,49	
T4	10	9,31	
T2	11	11,05	
T1	11	14,54	
No cultivado	11		65,62
Sig.		,361	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Anexo 7. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre medias de los tratamientos según estadio intermedio en ovarios de alpaca

**Intermedio**

HSD Tukey

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
No cultivado	11	10,39
T1	11	12,17
T2	11	13,48
T3	11	17,29
T4	11	17,58
Sig.		,254

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Anexo 8. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre medias de los tratamientos según estadio primario en ovarios de alpaca

**Primario**

HSD Tukey

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
No cultivado	10	9,30		
T1	11		35,97	
T2	11		39,17	39,17
T3	11		43,68	43,68
T4	11			49,25
Sig.		1,000	,334	,113

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Anexo 9. Tukey para comparaciones múltiples entre medias de los tratamientos según estadio secundario en ovarios de alpaca

**Secundario**

HSD Tukey

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
T3	2	1,40
No cultivado	4	1,89
T2	2	2,39
T4	4	2,81
T1	3	3,27
Sig.		,590

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Anexo 10. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre medias de los tratamientos según porcentaje de folículos morfológicamente anormales

**Anormales**

HSD Tukey

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
No cultivado	11	14,85		
T4	11	23,68	23,68	
T3	11		31,07	31,07
T2	11			35,86
T1	11			36,43
Sig.		,069	,178	,481

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.