

## **Evaluación de la expresión de los receptores TGF- $\beta$ RI y TGF- $\beta$ RII a través del desarrollo folicular en bovinos lecheros.**

Matiller, V.<sup>1,2</sup>; Leiva, C.<sup>1</sup>; Barone, J.<sup>1</sup>; Stassi, A.<sup>1,2</sup>; Rey, F.<sup>1,2</sup>; Salvetti, N.R.<sup>1,2</sup>; Ortega, H.H.<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / <sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina  
vmatiller@fcv.unl.edu.ar

PICT 2015-1834: “Influencia de la adrenocorticotrofina sobre la ovulación: expresión de componentes de la superfamilia del factor de crecimiento transformante Beta en el periodo preovulatorio en bovinos”.

Los factores de crecimiento producidos localmente trabajan en conjunto con las gonadotropinas a lo largo del continuo crecimiento de los folículos ováricos. Las estrechas interacciones entre señales extraováricas y factores intrafoliculares son las que determinan si el folículo continúa su desarrollo o diverge hacia las vías de la atresia (1). Los miembros de la superfamilia del Factor de crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) se expresan en los diferentes componentes del folículo ovárico, tanto en el ovocito como en las células somáticas que lo acompañan y cumplen funciones en múltiples aspectos del desarrollo folicular, incluyendo el reclutamiento de los folículos primordiales, la proliferación y apoptosis de las células de la granulosa, esteroidogénesis, expresión de receptores para gonadotropinas, maduración del ovocito, ovulación, luteinización y formación del cuerpo lúteo (2). Estos ligandos realizan sus acciones a través de la unión a dos tipos de receptores de membrana (designados como tipo I y tipo II), formando complejos hetero-tetraméricos. La activación del receptor por fosforilación del dominio quinasa intracelular, conduce a la fosforilación de moléculas de señal corriente abajo denominadas SMADS, reguladas por receptor (R-SMADS). Dichas moléculas modulan la expresión génica a través de interacciones con diversos factores de transcripción, los coactivadores y correpresores

A través de estudios previos hemos podido observar la expresión de las isoformas TGF- $\beta$ 1, 2 y 3 en folículos bovinos en crecimiento (3), así como también de la proteína de unión TGF- $\beta$ RIII. Ante la evidencia de la definida función de los ligandos como importantes moléculas de señalización paracrina y autocrina que regulan el crecimiento folículo ovárico, nos hemos propuesto desentrañar los mecanismos de señalización de los mismos y como objetivo nos hemos planteado examinar la expresión de los receptores TGF- $\beta$ RI y TGF- $\beta$ RII en el desarrollo de folículos ováricos de bovinos lecheros.

En el desarrollo del presente trabajo se utilizaron hembras bovinas de la raza Holando Argentino, de establecimientos lecheros de la zona. Las mismas fueron inspeccionadas antes del comienzo de la experiencia a fin de confirmar la normalidad en su tracto reproductor y la regularidad de sus ciclos estrales. Los animales fueron sometidos al protocolo de sincronización del ciclo estral Ovsynch de la siguiente manera: se administraron 100  $\mu$ g de un análogo sintético de GnRH (2,5 ml IM de acetato de buserelina, Receptal ®, Intervet, Argentina) el día -9, el día -2 se administraron 150  $\mu$ g de prostaglandina (PG) (D+Cloprostenol, Ciclar, Zoovet®) y el día 0 se realizó la última administración de 100  $\mu$ g de GnRH. La ovulación fue confirmada mediante ultrasonografía luego de la última inyección de GnRH y fue designada como día 1 del ciclo estral (figura 13). En proestro, los animales fueron sometidos a la ovariectomía y sobre las muestras obtenidas se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta para la determinación de, TGF- $\beta$ RI y TGF- $\beta$ RII siguiendo el protocolo descrito previamente por Matiller y col. (3). La cuantificación se realizó mediante análisis digital de imágenes (% de área marcada). Se evaluaron las capas de la granulosa y de la teca interna en folículos en crecimiento (primarios, secundarios y terciarios). Se utilizó la técnica de Western Blot para la determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados. Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el programa estadístico SPSS 11.0.1 para Windows. Se realizó un análisis de la varianza de

los datos obtenidos de la inmunomarcación de los distintos tipos foliculares aplicando pruebas paramétricas para varios grupos (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan. Además se efectuó la comparación entre las células de la teca interna y de granulosa de las estructuras terciarias mediante el t Student.

Los resultados mostraron expresión para TGF- $\beta$ RI y TGF- $\beta$ RII en el citoplasma de todas las categorías foliculares estudiadas, y tanto en las células de la granulosa como en las de la teca interna analizadas. Para el receptor TGF- $\beta$ RI se hallaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las células de la teca interna de folículos terciarios, quienes demostraron mayor marcación que las células de la granulosa de esas estructuras.

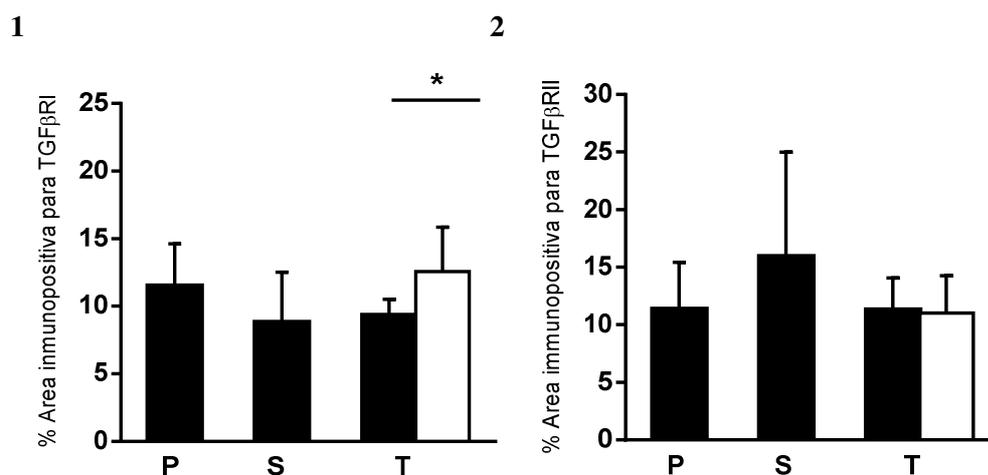


Figura 1 y 2: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ RI y TGF- $\beta$ RII de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) de animales ovariectomizados en proestro. Las barras negras representan las células de la granulosa y las blancas las células de la teca interna. El asterisco indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Concluimos que estos receptores se expresan a lo largo de la foliculogénesis lo que indica que se encuentran disponibles de manera constante para cumplir su rol de captar los ligandos para que estos cumplan la función paracrina y autocrina necesaria para la regulación de la foliculogénesis, esteroidogénesis, etc. Queda mucho por esclarecer sobre los mecanismos por los que se ejercen sus funciones en el ovario. Al indagar sobre las funciones de estos factores durante el desarrollo folicular ovárico es probable que se generen avances para nuevas aplicaciones terapéuticas y para la gestión de la fertilidad.

#### Bibliografía:

<sup>1</sup> Webb R, Garnsworthy PC, Campbell BK, Hunter MG. 2007. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology*, 68: 22-29.

<sup>2</sup> Sisco, B.; Pfeffer, P.L. (2007) Expression of activin pathway genes in granulosa cells of dominant and subordinate bovine follicles. *Theriogenology*, 68, 29-37.

<sup>3</sup> Matiller V, Stangafarro ML, Díaz PU, Ortega HH, Rey F, Huber E & Salvetti NR. (2014) Altered expression of transforming growth factor-beta isoforms in bovine cystic ovarian disease. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 813-823.