



---

## XIX ENCUESTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES 14 Y 15 DE OCTUBRE DE 2015

### Expresión de BMP-6 en células de la granulosa de folículos ováricos con persistencia folicular inducida con progesterona

Cristian Leiva<sup>1,2</sup>, Iván Garzón<sup>1</sup>

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

\*cristianjmleiva@yahoo.com.ar

Área Temática: Ciencias de la Salud  
Sub-área: Veterinaria  
Grupo: X

---

## INTRODUCCIÓN

Las ondas de crecimiento y regresión de los folículos ováricos bovinos se producen sucesivamente en un ambiente rico en progesterona (P4). Si estas concentraciones son mantenidas experimentalmente, el ciclo estral puede extenderse en ondas regulares de crecimiento folicular y atresia continua. En este sentido, los tratamientos con P4 inducen la prolongación del desarrollo del folículo dominante (Sirois y Fortune, 1990). Esto resulta en la generación de un estado de persistencia folicular que conduce a una maduración prematura del ovocito, reducción de la fertilidad y una alta incidencia de pérdidas embrionarias tempranas. Además, la persistencia folicular es uno de los múltiples factores que intervienen en la etiopatogenia de la Enfermedad Quística Ovárica (EQO). Así, las concentraciones intermedias de P4 inducen un incremento en la frecuencia pulsátil de hormona luteinizante, inhibiendo el pico preovulatorio de esta hormona y así la ovulación, estimulando la persistencia y desarrollo de los folículos dominantes con incremento en los estrógenos periféricos y consecuente formación de quistes (Bridges y Fortune, 2003; Díaz, et al., 2015).

En la actualidad se reconoce la importancia de los factores locales producidos a nivel ovárico como actores fundamentales en los mecanismos que controlan el reclutamiento de folículos primordiales, proliferación de células de la granulosa y de la teca, maduración del ovocito, esteroideogénesis y ovulación. Dentro de estos factores se encuentra la BMP-6 (del inglés: *Bone Morphogenetic Protein*: proteína morfogénica del hueso), un miembro de la superfamilia del *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ). La BMP-6 derivada de las células de la granulosa cumplen un rol autocrino/paracrino en la promoción de la proliferación de las células de la granulosa y en la modulación de la función folicular dependiente de FSH (Otsuka, 2010). En el ovario bovino esta proteína así como su ARNm están presentes en el ovocito, células de la granulosa y células de la teca de todas las categorías foliculares (Glister et al., 2010). BMP-6 regula la activación de los folículos primordiales y su viabilidad, controla el crecimiento de los folículos preantrales y la maduración de los folículos antrales (Shimasaki et al., 2004).

## OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto es que nos planteamos estudiar mediante inmunohistoquímica (IHQ) la evolución de la expresión de BMP-6 en las

Proyecto: PICT: "Participación de la superfamilia del Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) en la patogenia de desórdenes reproductivos de origen ovárico en bovinos".

Director del Proyecto: Hugo Héctor Ortega

Director de Beca: Natalia Raquel Salvetti

Co-Director de Beca: Pablo Uriel Díaz

distintas poblaciones foliculares ováricas en un modelo de persistencia folicular inducida con P4 a largo plazo.

## METODOLOGÍA

### Grupos experimentales

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron 15 vacas raza Holando Argentino, puras por cruce, multíparas, con ciclos estrales normales. Las cuales fueron mantenidas en instalaciones aptas para el desarrollo de protocolos experimentales y alimentadas con alimento balanceado comercial, heno de alfalfa y agua *ad libitum*.

Los animales fueron aleatoriamente asignados en tres grupos, P5, P10 y P15 (n=5/grupo), los cuales permanecieron en el estudio hasta los 5, 10 y 15 días de persistencia folicular, respectivamente.

### Tratamiento

Los ciclos estrales de todos los animales fueron sincronizados utilizando el protocolo G6G-ovsynch con modificaciones, que consistió en la administración de 150 µg de un análogo sintético de PGF2α seguida de una segunda dosis de PGF2α a las 12 horas para asegurar una completa luteolisis. Pasados dos días se administraron 20 µg de un análogo sintético de GnRH y seis días después, correspondiéndose con el comienzo del ovsynch, se administró una segunda dosis de esta hormona. Siete días después, se inyectaron dos dosis de PGF2α separadas por 12h, dando fin al protocolo de sincronización. Los grupos P5, P10 y P15 fueron mantenidos con niveles subluteales de P4 hasta los 5, 10 y 15 días después del momento esperado de ovulación, respectivamente. Para ello se utilizaron dispositivos intravaginales con 750 mg de P4 colocados un día después de la última PGF2α. Los dispositivos fueron mantenidos por 8 días momento en el cual fueron reemplazados por nuevos. Para evitar cambios bruscos en las concentraciones de P4, los nuevos dispositivos fueron introducidos un día antes de removido el dispositivo usado. Para realizar un correcto diagnóstico de la persistencia folicular y evaluar la respuesta al tratamiento, se realizaron exámenes diarios mediante tacto rectal y ultrasonografía utilizando un ecógrafo portátil Honda HS101V acoplado a un transductor lineal transrectal de 5 MHz.

### Muestras

Las muestras de ovarios completos fueron obtenidas mediante la técnica quirúrgica de ovariectomía bilateral por flanco izquierdo. La cual se realizó a los 5, 10 y 15 días de persistencia en los grupos P5, P10 y P15, respectivamente. Luego, los ovarios enteros fueron fijados en formaldehído bufferado (4%) durante 8-12 hs a temperatura ambiente y se procesaron siguiendo protocolos de rutina para su inclusión en parafina. Sobre cortes histológicos de los ovarios obtenidos en las cirugías se realizó la técnica de IHQ indirecta. Seguidamente, se procedió al análisis digital de imágenes de los cortes histológicos usando el programa informático Image Pro-Plus 3.0.1 (Media Cybernetics, USA) (Díaz et al., 2015).

### Análisis estadístico

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 11.0.1 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), utilizando un análisis de varianza factorial, modelo lineal general (MLG), univariante para evaluar el efecto que tuvo el

tiempo y la categoría folicular, así como su interacción, sobre la expresión de BMP-6 en células de la granulosa de los tres grupos experimentales.

## RESULTADOS

Se halló un efecto positivo de la categoría folicular ( $p < 0,05$ ) sobre la expresión de BMP-6, siendo ésta mayor en las categorías de folículos primarios y preantrales pequeños en relación a los folículos persistentes, antrales y atrésicos ( $p < 0,05$ ). Sumado a esto, se encontró un efecto positivo del tiempo sobre la expresión de BMP-6, siendo significativamente mayor a los 15 días de persistencia ( $p < 0,05$ ). Además, no se encontró una interacción entre categoría folicular y tiempo ( $p = 0,487$ ) sobre la expresión de BMP-6 en células de la granulosa a partir de los 5 días de persistencia (Figura 1)

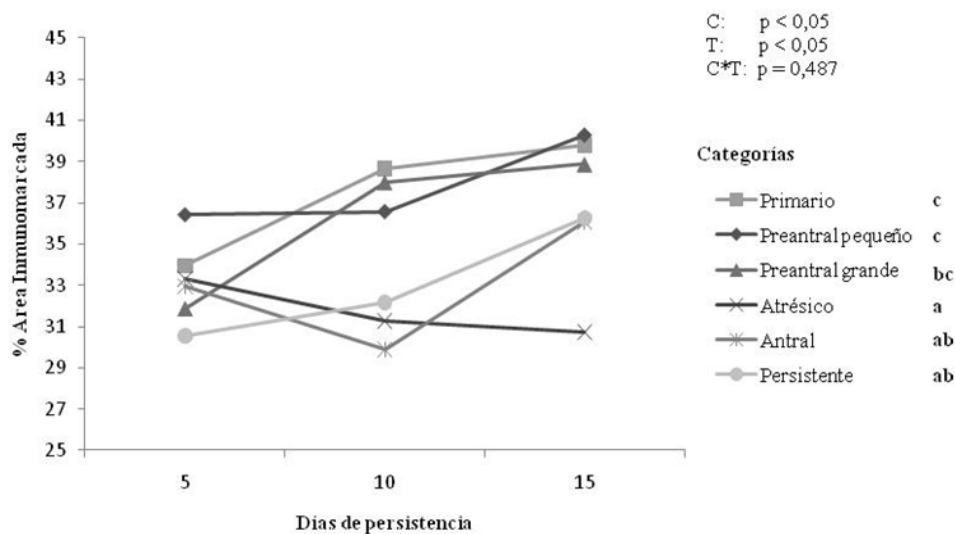


Figura 1: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en células de la granulosa a los 5, 10 y 15 días de persistencia folicular. C: efecto de la categoría folicular, T: efecto del tiempo de persistencia, C\*T: interacción entre categoría folicular y tiempo de persistencia. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las distintas categorías foliculares ( $p < 0,05$ ). Los valores representan la media.

## CONCLUSIONES

Los resultados aquí obtenidos demuestran que existe una modificación en los niveles de expresión de BMP-6 durante el desarrollo de la persistencia folicular inducida, evidenciándose un efecto positivo tanto de la categoría folicular como del tiempo de persistencia. En este sentido, la mayor expresión de BMP-6 se observó en los primeros estadios de desarrollo folicular (folículos primarios y preantrales pequeños) y hacía el final del período de persistencia. Considerando que BMP-6 cumple un rol importante durante la dinámica folicular estimulando la proliferación de las células de la granulosa y modulando la función folicular dependiente de FSH, podemos inferir que las modificaciones en sus niveles de expresión pueden ser eslabones fundamentales en el proceso de formación de los folículos persistentes y patologías asociadas a ellos como desequilibrios endócrinos, pérdidas embrionarias y EQO.

## BIBLIOGRAFÍA

**Sirois J., Fortune J.E.,** 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*, 127, 916–25.

**Bridges P.J., Fortune J.E.,** 2003. Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 25,199–214.

**Díaz, P., Stangaferro, M., Gareis, N., Silvia, W., Matiller, V., Salvetti N., Rey, F., Barberis, F., Cattaneo, L., Ortega, H.,** 2015. Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: An experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology*, 84, 1149-1160.

**Otsuka F.,** 2010. Multiple endocrine regulation by bone morphogenetic protein system. *Endocrine Journal*, 57, 3-14.

**Glister, C., Satchell, L., Knight, P.G.,** 2010. Changes in expression of bone morphogenetic proteins (BMPs), their receptors and inhibin co-receptor betaglycan during bovine antral follicle development: inhibin can antagonize the suppressive effect of BMPs on thecal androgen production. *Reproduction*, 140, 699-712.

**Shimasaki S., Moore R.K., Otsuka F., Erickson G.F.,** 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews*, 25, 72–101.