

ROL DE LA SUPERFAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE B EN EL OVARIO Y SU RELACIÓN CON LA PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA BOVINA

MATILLER, V.^{1,2,3}; **DÍAZ, P. U.**^{1,4}; **STANGAFERRO, M. L.**^{1,5}; **RODRIGUEZ, F. M.**^{1,6}; **ORTEGA, H. H.**^{1,6}; **REY, F.**^{1,6} & **SALVETTI, N. R.**^{1,6}

RESUMEN

En los últimos años se ha avanzado en la búsqueda por esclarecer los complejos mecanismos de control intraováricos que, concomitantemente con señales sistémicas, coordinan el reclutamiento, la selección y el crecimiento de los folículos desde el estadio primordial hasta la ovulación y formación del cuerpo lúteo. Una gran cantidad de factores de crecimiento, muchos de ellos pertenecientes a la Superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGFB) son expresados por las células somáticas ováricas y ovocitos en desarrollo, ejecutando una función de regulación intraovárica en la foliculogénesis. La alteración de estos factores podría contribuir a la patogenia de enfermedades reproductivas como la enfermedad quística ovárica (EQO), uno de los desórdenes reproductivos más frecuentes en el ganado bovino lechero. Esta enfermedad provoca cuantiosas pérdidas para la producción pecuaria. Los avances en la comprensión de los mecanismos de regulación intraováricos facilitan el desarrollo de nuevos enfoques para el control y la manipulación de la función ovárica y la mejora de la fertilidad en el ganado doméstico.

Palabras clave: Superfamilia de TGFB, foliculostatina, ovario, bovinos, enfermedad quística ovárica.

-
- 1.- Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada. ICIVET Litoral (UNL-CONICET). Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe.
 - 2.- Cátedra de Base de Nutrición y Alimentación Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL). Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe.
 - 3.- Cátedra de Nutrición de Monogástricos. FCV (UNL)
 - 4.- Cátedra de Farmacología. FCV (UNL)
 - 5.- Cátedra de Teriogenología. FCV (UNL)
 - 6.- Cátedra de Biología Celular. FCV (UNL)

Manuscrito recibido el 27 de noviembre de 2013 y aceptado para su publicación el 1º de abril de 2014.

SUMMARY

Role of transforming growth factor B superfamily in ovarian and its relation to the pathogenesis of bovine cystic ovarian disease.

In recent years, progress has been made in the quest to elucidate the complex mechanisms of intraovarian control which, concomitantly with systemic signs, coordinate the recruitment, selection and growth of follicles from the primordial stage until ovulation, and corpus luteum formation. A large number of growth factors, many of them belonging to the Superfamily Transforming Growth Factor Beta (TGFB), are expressed by ovarian somatic cells and oocytes in development, exerting an intra-ovarian regulating function in folliculogenesis. The alteration of these factors may contribute to the pathogenesis of reproductive diseases such as cystic ovarian disease (COD), one of the most common reproductive disorders in dairy cattle. This disease causes considerable losses to livestock production. Advances in understanding the mechanisms of intraovarian regulation facilitates the development of new approaches for the control and manipulation of ovarian function and fertility improvement in domestic livestock.

Key words: TGFB superfamily, follistatin, ovary, bovine, cystic ovarian disease.

INTRODUCCIÓN

Los factores de crecimiento son polipéptidos y proteínas semejantes a las hormonas, que actúan predominantemente en forma paracrina y autocrina, y participan en la promoción de la actividad mitogénica necesaria para la proliferación y remodelación del tejido local. Su mecanismo de acción consiste en provocar respuestas celulares mediante la unión a receptores específicos en la superficie celular en su tejido blanco (Hafez & Hafez, 2004). Existen diversas familias de factores de crecimiento con estructuras bioquímicas similares. En cuanto a sus funciones, aunque muchos de estos estimulan la proliferación celular, unos pocos tienen funciones inhibitorias, tales como el factor de crecimiento transformante β (TGFB). Estudios recientes han demostrado que los factores de crecimiento también regulan diversas proteínas en el ciclo celular, y pueden tener un efecto directo o indirecto sobre la proliferación celular. Los análisis

moleculares de los factores de crecimiento, incluyendo la clonación y secuenciación de los receptores específicos han contribuido, en gran medida a dilucidar la función que estos factores juegan en la homeostasis celular y el desarrollo neoplásico (Lloyd, 1997).

La superfamilia del TGFB es una agrupación muy grande de proteínas multifuncionales que afectan diversos procesos celulares que van desde la regulación de la diferenciación y proliferación celular, hasta procesos fisiológicos complejos como la inflamación y la cicatrización de tejidos, incluyendo también a la formación del hueso, entre otros. Además, alteraciones en sus señales pueden contribuir a la patogénesis de enfermedades tan diversas como las autoinmunes, la fibrosis y el cáncer (Sosa Garrocho y Macias Silva *et al.*, 2004). Varios miembros de esta superfamilia juegan un destacado papel en el desarrollo del sistema nervioso e incluso algunos están regulados por actividad neuronal. Por ejemplo, durante el desarrollo de la neocorteza en mamíferos,

se requiere de la expresión de TGFB para la diferenciación de los axones y definición de la polaridad de las neuronas *in vivo* e *in vitro* (Yi *et al.*, 2010). Además de impulsar la sinaptogénesis, miembros de la superfamilia TGFB están implicados en la promoción de la transmisión excitatoria sináptica (Poon *et al.*, 2013). Por otra parte muchos de los miembros de esta familia son considerados importantes citoquinas con funciones reguladoras duales en el sistema inmune y en las respuestas frente a las infecciones virales (Karimi-Googheri *et al.*, 2013).

Existe evidencia que implica a los miembros de la superfamilia TGFB como reguladores del desarrollo folicular ovárico en mamíferos. Se ha determinado claramente que la progresión a través de los sucesivos estadios de desarrollo folicular requiere de una comunicación bidireccional entre el ovocito y las células de la granulosa así como también entre estas últimas y las células de la teca (Eppig, 2001); y que en dicho intercambio de información participa la superfamilia del TGFB (Webb *et al.*, 2007; Pfeffer *et al.*, 2007). Los principales componentes de la mencionada superfamilia son: TGFB1, TGFB2, TGFB3, BMP (del inglés: *Bone Morphogenetic Protein*: proteína morfogénica del hueso), AMH (del inglés: *anti-Mullerian Hormone*: hormona antimulleriana) y Activina/Inhibina.

Los ovarios desempeñan dos funciones principales, la producción de ovocitos y la secreción de hormonas, y ambas funciones se relacionan estrechamente con la eficiencia reproductiva de los bovinos. Los folículos son las unidades funcionales del ovario y cada uno se compone de un ovocito rodeado por una o más capas de células somáticas. Para que su potencial esteroidogénico y ovulatorio se realice los folículos deben progresar a través de series altamente coordinadas de desarrollo. En

este sentido, la eficiencia reproductiva es el factor que mayor incidencia posee sobre los resultados productivos y económicos en la producción de leche y carne. La Enfermedad Quística Ovárica (EQO) es uno de los desórdenes reproductivos más frecuentes en vacas lecheras, presentándose además, en animales destinados a la producción de carne. En diferentes tipos de rodeos, los quistes foliculares pueden afectar hasta un 15% de las vacas durante el período post-parto, prolongando el intervalo parto-concepción y provocando pérdidas significativas a la producción pecuaria general (Silvia *et al.*, 2005). Además, en numerosos casos, los quistes normalmente son acompañados por la expresión de conducta sexual receptiva (estro), resultando en costos adicionales por las infructuosas inseminaciones artificiales realizadas (Webb *et al.*, 1998). En base a lo anteriormente expuesto consideramos que una alteración en la expresión de componentes de la superfamilia de TGFB, importantes actores en los mecanismos autocrinos, paracrinos y endocrinos del ovario, podría afectar el normal desarrollo folicular, formando parte de la patogenia de trastornos reproductivos de origen ovárico en bovinos.

Esta revisión resume la importancia y el papel de la superfamilia TGFB en la fisiología ovárica y en la EQO bovina.

DESCRIPCIÓN DE LOS MIEMBROS DE LA SUPERFAMILIA DEL TGFB

La superfamilia del TGFB está compuesta por un grupo de proteínas estructuralmente conservadas aunque funcionalmente diversas, con al menos 35 miembros en los vertebrados. Estas proteínas están ampliamente distribuidas y funcionan como ligandos extracelulares relacionados con numerosos procesos fisiológicos tanto en la vida pre como posnatal (Massague & Wotton, 2000).

A partir de sus características estructurales, han sido clasificadas en otras subfamilias:

- Subfamilia TGFB: comprende TGFB1, TGFB2, y TGFB3

- Subfamilia BMP: con más de 20 miembros.

- Subfamilia GDF (del inglés: *Growth and Differentiation*). Factor: Factor de desarrollo y diferenciación con al menos 9 miembros.

- Subfamilia GDNF (del inglés: *Glial Cell-Derived Neurotrophic*). Factor: factor neurotrófico derivado de las células gliales).

- Miembros adicionales como por ejemplo AMH.

- Subfamilia Activina/Inhibina: incluye activinas A, AB, B e inhibinas A y B.

SUBFAMILIA DEL TGFB: TGFB1, TGFB2 Y TGFB3

La subfamilia del TGFB hace referencia a una serie de polipéptidos homodiméricos multifuncionales de 25 kDa de peso molecular, con múltiples isoformas (Rizzino, 1988; Lyons & Moses, 1990), que actúan como importantes mediadores de numerosos procesos celulares y fisiológicos (Igotz *et al.*, 1987). Sus señales se transmiten a través de receptores transmembranales tipo serina/treonina con actividad quinasa que activan a las proteínas efectoras Smad2 y Smad3. Las Smad2/3 ingresan al núcleo, previa oligomerización con Smad4, y regulan la transcripción positiva o negativa de genes blanco. La vía es regulada a diferentes niveles tanto por mecanismos de retroalimentación negativa propios de la vía del TGFB, como por otras vías de transducción. Por lo tanto, la gran variedad de respuestas inducidas por el TGFB dependen del tejido o tipo celular, ya que son el resultado de la integración de vías dependientes e independientes de las Smad (Sosa Garrocho *et al.*, 2004).

La expresión, localización y regulación de las distintas isoformas de TGFB en el ovario

es extremadamente variable entre especies.

Nilsson *et al.* (2003) demostraron que, en bovinos, TGFB1 es producido por las células de la granulosa de folículos preantrales (primordiales, primarios y secundarios), antrales tempranos, y folículos antrales pequeños (de 1-2 mm de diámetro), pero no se detectó en folículos antrales de mayor tamaño (3-5 o 5-10 mm) ni en células de la teca. En cambio, TGFB2 y TGFB3 se expresan en células de la granulosa y de la teca de todos los estadios foliculares. Con respecto a la expresión de ARNm para las distintas isoformas, los resultados muestran que el ARNm que codifica para TGFB3 alcanza mayores niveles que los correspondientes a TGFB1 y TGFB2, tanto en granulosa como en teca. Se observó que la expresión de ARNm para TGFB2 y TGFB3 fue mayor en células de la teca que en granulosa. Para TGFB1, si bien la proteína no fue detectable por inmunohistoquímica en folículos de 3-5 o 5-10 mm de diámetro, el ARNm fue detectado en estos estadios de desarrollo folicular. Probablemente, el nivel de TGFB1 expresado en los folículos de mayor tamaño no fue suficiente para el límite de detección de la técnica inmunohistoquímica utilizada (Nilsson *et al.*, 2003).

En cuanto a las funciones de los TGFB, diferentes reportes que detallan los efectos de estos factores de crecimiento sobre células ováricas cultivadas *in vitro* suelen ser contradictorios y aparentemente su expresión es altamente dependiente de la especie estudiada, la etapa de diferenciación del folículo, la presencia de otros factores de crecimiento y las condiciones precisas del cultivo celular (Knight & Glister, 2006).

Diversos estudios han demostrado que el TGFB regula las actividades fisiológicas en los folículos ováricos de varias especies. En cuanto a los animales de interés zootécnico: en bovinos, TGFB inhibe el crecimiento de las células de la granulosa (Skinner *et al.*,

1987) y también el de las células de la teca, por otro lado incrementan la producción de progesterona en estas últimas (Roberts & Skinner, 1991); en cerdos: también inhibe el crecimiento de las células de la granulosa (May *et al.*, 1988; Mondschein *et al.*, 1988) y regula la expresión del péptido relacionado con la hormona paratiroidea por células de la teca (Garmey *et al.*, 2000); y en pollos, TGFB regula la producción de prostaglandina E en células de la granulosa (Li *et al.*, 1996). En lo que respecta a animales de laboratorio: en ratas, TGFB induce apoptosis en las células teco/intersticiales (Foghi *et al.*, 1997), además en estas mismas regula la producción de prostaglandina E (Hurwitz *et al.*, 1997) y en células de la granulosa aumenta la expresión de receptores de FSH (Dunkel *et al.*, 1994). La producción de estrógenos en células de la granulosa se incrementa en presencia de TGFB en ratas (Zachow *et al.*, 1999) y ratones (Liu *et al.*, 1999). Asimismo, este ligando regula la expresión de hialuronato en las células de la granulosa de ratón (Tirone *et al.*, 1997)

SUBFAMILIA DE INHIBINA, ACTIVINA Y FOLICULOSTATINA

Las inhibinas y activinas son glicoproteínas dimericas cuyas subunidades están unidas por un enlace disulfuro. La subunidad β está presente en ambas proteínas. Sin embargo, la molécula de inhibina está formada además, por una subunidad α . La subunidad α es única pero de la subunidad β existen dos formas: βA y βB . Es así que existen dos isoformas de inhibina de acuerdo a la subunidad β que posea: la inhibina A ($\alpha\beta A$) y la inhibina B ($\alpha\beta B$). La activina es un dímero compuesto por las mismas subunidades β que la inhibina. Existen tres isoformas de acuerdo a las 2 subunidades

β que se asocien: la activina A ($\beta A \beta A$), la activina B ($\beta B \beta B$) y la activina AB ($\beta A \beta B$) (Hafez & Hafez, 2004; Bleach *et al.*, 2001; Ethier & Findlay, 2001). Hay muy poca información acerca de la bioactividad y funciones diferenciales de las distintas isoformas de la activina (A, AB y B) y la mayoría de los estudios han sido realizados midiendo la actividad y funciones de la activina A. Por último, la foliculostatina es una glicoproteína monomérica rica en cisteína que no está relacionada estructuralmente con la superfamilia TGFB, aunque sí funcionalmente debido a su alta afinidad de unión con la activina. Esto le permite modular (neutralizar) los efectos de ésta última. La foliculostatina también se une a la inhibina, pero su afinidad es mucho menor y no neutraliza sus efectos biológicos (Knight & Glister, 2001). Se han identificado 5 isoformas de foliculostatina las cuales presentan distinta afinidad de unión a la activina (Glister *et al.*, 2006). Activina, inhibina y foliculostatina son sintetizadas por las células de la granulosa, pero ejercen no sólo un efecto autocrino sino también paracrino sobre las células de la teca y el ovocito. Estas acciones incluyen la modulación del crecimiento folicular, respuesta a las gonadotropinas, esteroidogénesis, maduración del ovocito, ovulación y función del cuerpo lúteo (Knight & Glister, 2001).

RECEPTORES

La mayor parte de los miembros de la superfamilia de TGFB, exceptuando a la subfamilia de GDNF e inhibina, realizan sus acciones a través de la unión a dos tipos de receptores de membrana (designados como tipo I y tipo II), formando complejos heterotetraméricos. En los mamíferos existen 7 subtipos de receptores de tipo I, y 5 subtipos de tipo II asociados con la transducción de la señal de los ligandos de la superfamilia de

TGFB. 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 (Receptor activated-Smads). Dichas moléculas modulan la expresión génica a través de interacciones con diversos factores de transcripción, los coactivadores y correpresores (Glister *et al.*, 2006; Knight y Glister, 2006). Estos eventos especifican diversas respuestas en consecuencia, que son regulados diferencialmente mediante el control de acceso y la activación de los ligandos, sus receptores y sustratos consecuentes en diferentes tipos de células (Caestecker 2004).

PROTEÍNAS DE UNIÓN

Un grupo adicional de moléculas de superficie celular, que incluye a los β -glicanos (conocidos como receptores TGFB tipo III) pueden actuar como proteínas de unión o correceptores para ciertos ligandos de la superfamilia (Lewis *et al.*, 2000). Existen otras proteínas de secreción (nogina, cordina, gremlina) y de membrana (BAMBI: BMP and activin receptor membrane-bound inhibitor) capaces de modular la señalización de los miembros de TGFB. La foliculostatina constituye una de las dos proteínas de unión de activinas e inhibinas; junto con la α 2-Macroglobulina (α 2-MG) que posee elevada afinidad por la activina y neutraliza sus efectos biológicos sobre la hipófisis. Este último efecto es similar al producido por las inhibinas (De Paolo *et al.*, 1991; Kumanov *et al.*, 2005). La α 2-MG es una glicoproteína de 720 kDa y constituye la segunda proteína de unión para las inhibinas y activinas. Mientras algunas de las proteínas de unión antes mencionadas disminuyen la disponibilidad del ligando impidiendo su interacción

con los receptores, en otras oportunidades, particularmente cuando la afinidad es menor, facilitarían la presentación del ligando manteniendo elevadas concentraciones del mismo en las proximidades de la superficie celular (Sugino *et al.*, 1993).

ROLES INTRAOVÁRICOS DE LOS MIEMBROS DE LA SUPERFAMILIA DEL TGFB

Estudios realizados en diversas especies han demostrado la expresión diferencial de los diferentes miembros de la superfamilia de TGFB en los componentes del folículo, tanto en el ovocito como en las células somáticas que lo acompañan, en función al estadio de desarrollo folicular. Numerosas evidencias experimentales indican que dichas proteínas 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 gonadotrofinas, maduración del ovocito, ovulación, luteinización y formación del cuerpo lúteo (Nilsson *et al.*, 2003; Kumanov *et al.*, 2005; Knight y Glister, 2006; Sisco y Pfeffer 2007).

La comunicación apropiada entre el ovocito y las células foliculares circundantes, así como la comunicación entre estas últimas y las células estromales que rodean a los folículos primordiales, son fundamentales para el adecuado reclutamiento folicular y comienzo de su desarrollo. Dentro de las BMPs derivadas de las células de la teca/estroma, se ha demostrado en roedores que las BMP-4 y BMP-7 regulan a las células teco/intersticiales promoviendo la transición de los folículos primordiales a primarios y la supervivencia folicular (Nilsson y Skinner 2003). Además, en los ovocitos de los folículos primordiales (vaca y oveja) y primarios

(roedores) se expresan tres factores adicionales pertenecientes a la familia TGFB: el GDF-9, el BMP-15 y el BMP-6. Dichos factores actúan a través de la unión a diversos receptores de tipo I y II, y se expresan en células foliculares y granulosas convirtiéndose en blancos potenciales de las señales paracrinas (Fatehi *et al.*, 2005; McNatty *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2006).

Se cree que la AMH actúa negativamente sobre la iniciación del desarrollo folicular. La AMH se expresa en células de la granulosa de los folículos primarios y en estadios antrales tempranos, aunque no fue detectada en los folículos primordiales. En base a dichas evidencias, se infiere la existencia de una retroalimentación negativa sobre los folículos primordiales ejercida por la secreción de AMH en folículos de estadios temprano del desarrollo (Knight y Glister, 2006, Glister *et al.*, 2006).

Los factores locales, incluyendo los miembros de la familia de TGFB, regulan la transición desde el estadio de folículos primario a secundario y, subsecuentemente, el desarrollo folicular desde preantral tardío a antral temprano. Los factores locales que actúan como reguladores positivos del desarrollo folicular preantral, incluyen: GDF-9 y BMP-15 (cuyo origen es el ovocito), activinas (producidas en las células de la granulosa), BMP-4 y BMP-7 (principalmente de origen tecal), y TGFB producido por las células de la teca y de la granulosa. Por otra parte, se postula que la AMH poseería efectos negativos sobre el desarrollo folicular preantral luego de la transición de folículo primordial a primario (Glister *et al.*, 2006; Knight & Glister, 2006). La expresión del TGFB ha sido documentada en los folículos preantrales en diversas especies incluyendo roedores, humanos, ovejas y ganado vacuno. Existe elevada variabilidad espacio-temporal en el patrón de expresión de las isoformas

individuales (TGFB1, TGFB2 y TGFB3) y en los dos tipos de receptores (I y II) entre las células de la teca, de la granulosa y el ovocito.

La FSH puede influir en el desarrollo de los folículos de los estadios preantrales tempranos o medios. Sin embargo, el desarrollo posterior a las fases preantral tardío/antral pequeño (dependiendo de la especie) se transforma en dependiente de FSH de manera crítica. Las activinas y la BMP-6 derivadas de las células de la granulosa cumplen un rol autocrino/paracrino mientras que los factores GDF-9, BMP-15 y BMP-6 derivados del ovocito poseen un rol paracrino en la promoción de la proliferación de las células de la granulosa y en la modulación de la función folicular dependiente de FSH (Fatehi *et al.*, 2005; McNatty *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2006). La exposición diferencial a dichos factores podría ser uno de los motivos por los cuales ciertos folículos son sensibles a la FSH, convirtiéndose luego en folículos dominantes continuando su desarrollo a folículo preovulatorio.

La AMH reduce la respuesta a FSH de los folículos antrales pequeños y preantrales y de este modo, podría cumplir un rol negativo en el reclutamiento cíclico de los folículos y en el proceso de selección del folículo dominante (Glister *et al.*, 2006, Knight & Glister, 2006).

Aunque las células de la granulosa son capaces de sintetizar inhibinas y activinas desde estadios tempranos del desarrollo folicular, se ha demostrado que los folículos pequeños producen mayor cantidad de activina en relación a inhibina, mientras que en los folículos seleccionados de mayor tamaño el contenido de inhibina es superior. En los folículos antrales bovinos ocurre un abrupto incremento en la relación activina A/inhibina A y activina A/folistatina al alcanzar el tamaño en el cual opera el mecanismo

de selección folicular dependiente de FSH (Kumanov *et al.*, 2005; Glistner *et al.*, 2006).

En la actualidad, no existe información disponible acerca de la concentración intrafolicular de los restantes ligandos (isoformas de TGFB, BMPs, etc.). Sin embargo, como ya mencionamos, se ha demostrado que dichas proteínas se encuentran implicadas en la regulación autocrina/paracrina de la función de las células de la granulosa y de la teca interna en los folículos antrales. Por otro lado, aún no ha sido establecida claramente la función de las proteínas de unión de las BMPs en los folículos en desarrollo, postulándose un rol potencial en la modulación de la acción de sus ligandos. En roedores y humanos, el TGFB se produce en las células de la granulosa y de la teca, mientras que en ovejas, vacas y cerdas es principalmente producido por las células de la teca (Nilsson *et al.*, 2003; Kumanov *et al.*, 2005; Knight & Glistner, 2006; Sisco & Pfeffer, 2007). Los receptores de tipo I y II para el TGFB se expresarían de manera ubicua en la mayoría de las poblaciones celulares. Las tres isoformas poseerían efectos similares con ligeras modificaciones dependiendo del tipo celular estudiado. Del mismo modo que la activina A, el TGFB puede estimular la expresión del receptor de FSH e incrementar la actividad aromatasas inducida por la FSH, la producción de inhibina y de progesterona e inducir la expresión del receptor para LH. Se ha demostrado que el TGFB inhibe la expresión tecal de la Cyp17A1, enzima encargada de la conversión de pregnenolona y progesterona a sus productos 17-alfa-hidroxilados y, posteriormente, a la dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona, y por ende la producción de andrógenos en forma análoga a la activina A (Knight & Glistner, 2006).

La expresión de BMPs y GDF-9 ha sido demostrada en diferentes compartimientos de folículos antrales de diversas especies

incluyendo roedores, primates y rumiantes (Bodensteiner *et al.*, 1999; Glistner *et al.*, 2004, 2005; Fatehi *et al.*, 2005). Las BMPs y activinas, actúan como reguladores negativos de la secreción de andrógenos tecales, sugiriendo que un déficit funcional en las mismas o en sus vías de señalización, podrían contribuir al elevado nivel de andrógenos asociado con la enfermedad poliquística ovárica de mujeres (Glistner *et al.*, 2005).

EXPRESIÓN DE LOS INTEGRANTES DE LA SUPERFAMILIA TGFB EN LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA BOVINA

Todo lo hasta aquí expuesto, revela la importancia de los factores locales en el funcionamiento normal del ovario. Sin embargo, es escasa la información sobre lo que ocurre en diferentes situaciones patológicas como podría ser la EQO en bovinos.

En la mujer se han demostrado importantes modificaciones en la expresión y regulación de diversos componentes del sistema TGFB, asociados con el síndrome poliquístico ovárico (Kumanov *et al.*, 2005) que aunque es diferente a la EQO bovina, ambas cursan un trastorno de persistencia folicular y alteración en la ciclicidad, lo que también refuerza la necesidad de contar con modelos experimentales adecuados. De acuerdo con Fujiwara *et al.* (2001) la producción insuficiente de inhibina A y posiblemente de la subunidad β A (aunque no de la foliculostatina) podría asociarse con la detención del desarrollo folicular en los pacientes con síndrome poliquístico ovárico.

Como hemos mencionado, la expresión y mecanismo de acción de numerosos factores intraováricos, tales como los que componen el sistema TGFB, sus receptores y proteínas ligadoras, han sido ampliamente estudiados en ovarios de numerosas especies bajo di-

ferentes circunstancias fisiológicas. Sin embargo, en situaciones patológicas los datos disponibles en la bibliografía son escasos. La comprensión de los mecanismos de control implicados en el crecimiento folicular en ovarios bovinos es muy importante y contribuirá a esclarecer los procesos que ocurren durante situaciones patológicas que afectan la ciclicidad ovárica normal del ganado.

Las isoformas de TGFB son claramente detectables en todos los estadios de desarrollo folicular presentando variaciones a lo largo de la foliculogénesis (Nilsson *et al.*, 2003; Matiller *et al.*, 2013; Stangaferro, 2013). El hecho de que los TGFB sean considerados globalmente como inhibidores de la proliferación celular (Knight & Glister, 2006) y de que, según resultados obtenidos, los quistes foliculares espontáneos manifiesten un alto valor de expresión de dichas proteínas, demuestra que estos factores pueden ser importantes mediadores de la permanencia estática de estas estructuras en el ovario (Stangaferro, 2013). Esta información aporta una posible respuesta a los datos publicados por Isobe y Yoshimura (2007) y Salvetti *et al.* (2010), quienes encontraron que los quistes ováricos persisten en el tiempo sin proliferar ni atresiar.

En lo que respecta a activina y foliculostatina, estas moléculas están presentes en todos los estadios de desarrollo folicular, indicando una relación directamente proporcional entre la expresión de estas proteínas con el desarrollo folicular. (Matiller *et al.* 2011a, 2011b, 2012a, 2012b; Stangaferro *et al.*, 2013). Como fue descrito por Knight & Glister (2003), activina y foliculostatina serían sintetizadas en el citoplasma de las células de la granulosa en diferentes magnitudes de-

pendiendo del estadio de desarrollo folicular, y cumplirían con su función paracrina a nivel de la teca. Por otra parte, la inhibina sólo se ha detectado en aquellos folículos antrales de mayor tamaño y en los folículos quísticos (Matiller *et al.* 2011a, 2011b, 2012a, 2012b; Stangaferro *et al.*, 2013). Considerando informes anteriores en los que se observó que los quistes foliculares tienen menor proliferación y apoptosis que los folículos antrales (Isobe & Yoshimura, 2007; Salvetti *et al.* 2010), y considerando la baja concentración intrafolicular de progesterona y la alta concentración de testosterona concomitante con similares concentraciones de estrógenos en quistes cuando se comparan con folículos antrales (Amweg *et al.*, 2013), podríamos inferir que el ajustado equilibrio entre los componentes del sistema Activina/Inhibina/Foliculostatina favorece un bajo tono de activina. Esto podría explicar parcialmente los fenómenos intraováricos que se producen durante el desarrollo de la enfermedad, tales como la persistencia folicular y la esteroidogénesis alterada.

A modo de conclusión, cualquier alteración de la fisiología normal ovárica, como la aparición de quistes foliculares, es capaz de provocar una importante reducción en la eficiencia reproductiva de estos animales y en consecuencia, en la producción de terneros. Por esto, el conocimiento de los mecanismos involucrados en la persistencia folicular, como la localización celular específica y expresión de algunos de los principales componentes de la superfamilia de TGFB, proveerían una eficaz herramienta para su tratamiento o incluso de manera preventiva, para actuar sobre las causas que predisponen al desarrollo de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- AMWEG, A.N.; SALVETTI, N.R.; STANGA-FERRO, M.L.; PAREDES, A.H.; LARA, H.H.; RODRÍGUEZ, F.M. & ORTEGA, H.H.** 2013. Ovarian localization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD): effects of ACTH stimulation and its relationship with bovine cystic ovarian disease. *Domest Anim Endocrin.* 45: 126-140.
- BLEACH, E.C.; GLENCROSS, R.G.; FEIST, S.A.; GROOME, N.P. & KNIGHT, P.G.** 2001. Plasma inhibin A in heifers: relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biol Reprod.* 64:743-752.
- BODENSTEINER, K.J.; CLAY, C.M.; MOELLER, C.L. & SAWYER, H.R.** 1999. Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod.* 60:381-386.
- CAESTECKER, M.** 2004. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Citokine Growth Factor View.* 15(1):1-11.
- DE PAOLO, L.V.; BICSAK, T.A. & ERICKSON, G.F.** 1991. Follistatin and activin: a potential intrinsic regulatory system within diverse tissues. *Proceedings of Society of Experimental Biology and Medicine.* 198:500-512.
- DUNKEL, L.; TILLY, J.L.; SHIKONE, T.; NISHIMORI, K. & HSUEH, A.J.** 1994. Folliclestimulating hormone receptor expression in the rat ovary: Increases during prepubertal development and regulation by the opposing actions of transforming growth factors beta and alpha. *Biol Reprod* 50:940-948.
- EPPIG, J.J.** 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829-838.
- ETHIER, J. F. & FINDLAY, J. K.** 2001. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction.* 121(5):667-75.
- FATEHI, A.N.; VAN DEN HURK, R.; COLLENBRANDER, B.; DAEMEN, A.J.; VAN TOL, H.T.; MONTEIRO, R.M.; ROELEN, B.A. & BEVERS, M.M.** 2005. Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology.* 63:872-889.
- FOGHI, A.; TEERDS, K.J.; VANDER DONK, H. & DORRINGTON, J.** 1997. Induction of apoptosis in rat thecal/interstitial cells by transforming growth factor a plus transforming growth factor b in vitro. *J Endocrinol* 153:169-178.
- FUJIWARA, T.; SIDIS, Y.; WELT, C.; LAMBERT-MESSERLIAN, G.; FOX, J.; TAYLOR, A. & SCHNEYER, A.** 2001. Dynamics of inhibin subunit and follistatin mRNA during development of normal and polycystic ovary syndrome follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:4206-4215.
- GARMEY, J.C.; SCHNORR, J.A., BRUNS, M.E.; BRUNS, D.E.; SEANER, R.M.; FERGUSON, J.E.; II, LUKING JAYES F.C.; AGUIRRE, C. & VELDHUIS, J.D.** 2000. Expression of parathyroid hormone-related peptide (PTH-rp) and its receptor in the porcine ovary: Regulation by transforming growth factor-beta and possible paracrine effects of granulosa cell PTH-rp secretion on theca cells. *Biol Reprod* 62:334-339.
- GLISTER, C.; KEMP, C.F. & KNIGHT, P.G.** 2004. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation

- of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction*. 127:239-254.
- GLISTER, C.; RICHARDS, S.L. & KNIGHT, P.G.** 2005. Bone morphogenetic proteins (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling? *Endocrinology*. 146:1883-1892.
- GLISTER, C.; GROOME, N.P. & KNIGHT, P.G.** 2006. Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. *J Endocrinol*. 188:215-225.
- HAFEZ E.S.E. & HAFEZ B.** 2004. *Reproducción e Inseminación artificial en animales: Séptima Edición*. McGraw Hill Interamericana. p 49-50
- HURWITZ, A; FINCI-YEHESKEL, Z.; MILWIDSKY, A.; YAGEL, S.; ADASHI, E.Y.; LAUFER, N. & MAYER, M.** 1997. In-vitro modulation of plasminogen activator activity, prostaglandin E and nitric oxide production by interleukin-1 in pregnant mare serum gonadotrophin-primed thecainterstitial cells. *Hum Reprod* 12:774-779.
- IGNOTZ, R.A.; ENDO, T. & MASSAQUÉ, J.** 1987. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. 15; 262(14): 6443-6.
- ISOBE, N. & YOSHIMURA, Y.** 2007. Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle. *J Reprod Dev*. 53: 1119-1124.
- KARIMI-GOOGHERI, M.; DANESHVAR, H.; NOSRATABADI, R.; ZARE-BIDAKI, M.; HASSANSHAHI, G.; EBRAHIM, M.; ARABABADI, M.K. & KENNEDY, D.** 2013. Important roles played by TGFB in hepatitis B infection. *J Med Virol*. En prensa.
- KNIGHT, P.G. & GLISTER, C.** 2006. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 132:191-206.
- KNIGHT, P.G. & GLISTER, C.** 2003. Local roles of TGF-b superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Reproduction*. 132:191-206.
- KNIGHT, P.G. & GLISTER, C.** 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*. 121, 503-512.
- KUMANOV, P.; NANDIPATI, K.C.; TOMOVA, A.; ROBEVA, R. & AGARWAL, A.** 2005. Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications. *Reprod Biomed Online*. 10:786-812.
- LEWIS, K.A.; GRAY, P.C.; BLOUNT, A.L.; MACCONELL, L.A.; WIATER, E.; BILEZIKJIAN, L.M. & VALE, W.** 2000. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature*. 404:411-414.
- LI, J.; SIMMONS, D.L. & TSANG, B.K.** 1996. Regulation of hen granulosa cell prostaglandin production by transforming growth factors during follicular development: Involvement of cyclooxygenase II. *Endocrinology*. 137:2522-2529.
- LYONS, R.M. & MOSES, H.L.** 1990. Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J. Biochem*. 187(3):467-73.
- LIU, X.; ANDOH, K.; ABE, Y.; KOBAYASHI, J.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H. & IBUKI, Y.** 1999. A comparative study on transforming growth factor-beta and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinology* 140:2480-2485.
- LLOYD, R.V.** 1997. Growth Factors. *Endocrine pathology*. Summer; 8(2):121-127.
- MASSAGUÉ, J. & WOTTON, D.** 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*. 19:1745-1754.

- MATILLER, V.; STANGAFERRO, M.L.; DÍAZ, P.U.; SILVA, M.A.; REY, F.; ORTEGA, H.H. & SALVETTI, N.R.** 2011a. Participación de la Foliculostatina en la patogenia de la Enfermedad Quística Ovárica en bovinos. XII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas en Ciencias Veterinarias. Facultades de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Rosario y Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe. Resumen. p. 269.
- MATILLER, V.; SILVA, M.A.; STANGAFERRO, M.L.; ORTEGA, H.H. & SALVETTI, N.R.** 2011b. Expresión in situ de activina, inhibina y foliculostatina en ovarios de bovinos con enfermedad quística ovárica inducida experimentalmente. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal, IRAC, Córdoba. Resumen.
- MATILLER, V.; STANGAFERRO, M.L.; DÍAZ, P.U.; GAREIS, N.; LEIVA, C.; REY, F.; ORTEGA, H.H. & SALVETTI, N.R.** 2012a. Expresión de foliculostatina en ovarios de bovinos Holando Argentino con Enfermedad Quística Ovárica. XIII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNR. Casilda, Santa Fe. Resumen. p. 201.
- MATILLER, V.; STANGAFERRO, M.L.; RODRÍGUEZ, F.M.; REY, F.; ORTEGA, H.H. & SALVETTI, N.R.** 2012b. Expresión de isoformas de foliculostatina en folículos quísticos de bovinos con enfermedad quística ovárica (EQO). III Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), FCV-UBA. Buenos Aires. Resumen.
- MATILLER, V.M.; STANGAFERRO, M.L.; DÍAZ P.U.; AMWEG, A.N.; REY, F.; ORTEGA, H.H. & SALVETTI, N.R.** 2013. "Influencia de la expresión de las isoformas de TGF β y del receptor TGF β -R1 en la patogenia de la enfermedad quística ovárica en bovinos lecheros". Medicina Vol III (Supl. III): Resumen) MEDICINA 73: 287 (Supl. II).
- MAY, J.V.; FROST, J.P. & SCHOMBERG, D.W.** 1988. Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and transforming growth factor β on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and proliferation. *Endocrinology* 100:1108-1120.
- MCNATTY, K.P.; JUENGEL, J.L.; READER, K.L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S.B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M.F.; MOTTERSHHEAD, D.G.; GROOME, N.P.; RITVOS, O. & LAITINEN, M.P.** 2005. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction*. 129:481-487.
- MONDSCHHEIN, J.S.; CANNING, S.F. & HAMMOND, J.M.** 1988. Effects of transforming growth factor-beta on the production of immunoreactive insulin-like growth factor I and progesterone and on [3H] thymidine incorporation in porcine granulosa cell cultures. *Endocrinology* 123:1970-1976.
- NILSSON, E.E.; DORAISWAMY, V. & SKINNER, M.K.** 2003. Transforming growth factor-beta isoform expression during bovine ovarian antral follicle development. *Mol Reprod Dev*. 66:237-246.
- NILSSON, E.E. & SKINNER, M.K.** 2003. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod*. 69:1265-1272.
- PFEFFER, P.L.; SISCO, B.; DONNISON, M.; SOMERS, J. & SMITH, C.** 2007. Isolation of genes associated with developmental competency of bovine oocytes. *Theriogenology*. 68:84-90.
- POON, V.Y.; CHOI, S. & PARK, M.** 2013. Growth factors in synaptic function. *Front Synaptic Neuroscience* 18; 5:6.

- RIZZINO, A; KUSZYNSKI, C.; RUFF, E. & TIESMAN, J.** 1988. Production and utilization of growth factors related to fibroblast growth factor by embryonal carcinoma cells and their differentiated cells. *Dev Biol.* 129(1):61-71.
- ROBERTS, A.J. & SKINNER, M.K.** 1991. Transforming growth factor-alpha and beta differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinology* 129:2041-2048.
- SALVETTI, N.R.; STANGAFERRO, M.L.; PALOMAR, M.M.; ALFARO, N.S.; REY, F.; GIMENO, E.J. & ORTEGA, H.H.** 2010. Cell proliferation and survival mechanisms underlying the abnormal persistence of follicular cysts in bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Anim Reprod Sci.* 122: 98-110.
- SHIMIZU, T.; JAYAWARDANA, B.C.; NISHIMOTO, H.; KANEKO, E.; TETSUKA, M. & MIYAMOTO, A.** 2006. Involvement of the bone morphogenetic protein/receptor system during follicle development in the bovine ovary: Hormonal regulation of the expression of bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) and its receptors (ActRII and ALK-2). *Mol Cell Endocrinol.* 249:78-83.
- SILVIA, W.J.; MCGINNIS, A.S. & HATLER, T.B.** 2005. A comparison of adrenal gland function in lactating dairy cows with or without ovarian follicular cysts. *Reprod Biol.* 5:19-29.
- SISCO, B. & PFEFFER, P.L.** 2007. Expression of activin pathway genes in granulosa cells of dominant and subordinate bovine follicles. *Theriogenology.* 68:29-37.
- SKINNER, M.K.; KESKI-OJA, J.; OSTEEEN, K.G. & MOSES, H.L.** 1987. Ovarian thecal cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology* 121:786-792.
- SOSA GARROCHO, M. & MACIAS SILVA, M.** 2004. El Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β): funciones y vías de transducción. Facultad de Medicina UNAM. *REB* 23 (1): 3-11, 2004.
- STANGAFERRO, M.L.** 2013. "Participación de miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante ? (TGF-?) en la patogenia de la enfermedad quística ovárica bovina". Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL).
- SUGINO, K.; KUROSAWA, N.; NAKAMURA, T.; TAKIO, K.; SHIMASAKI, S.; LING, N.; TITANI, K. & SUGINO, H.** 1993. Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulphate proteoglycans on the ovarian granulosa cell. *J Biol Chem.* 268:15579-15587.
- TIRONE, E.; D'ALESSANDRIS, C.; HASCALL, V.C.; SIRACUSA, G. & SALUSTRI, A.** 1997. Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1). *J Biol Chem* 272:4787-4794.
- WEBB, R.; GUTIERREZ, C.G.; GONG, J.G. & CAMPBELL, B.K.** 1998. Dynamics and aetiology of ovarian follicular cysts in post-partum dairy cattle. *Reprod. Dom An.* 33:285-288.
- WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; CAMPBELL, B.K. & HUNTER, M.G.** 2007. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology.* 68:22-29.
- YI, J.J.; BARNES, A.P.; HAND, R.; POLLEUX, F. & EHLERS, M.D.** 2010. TGF-beta signalling specifies axons during brain development. *Cell* 142, 144-157.

ZACHOW, R.J.; WEITSMAN, S.R. & MARGOFFIN, D.A. 1999. Leptin impairs the synergistic stimulation by transforming growth factor-beta of follicle-stimulating hormone-dependent aromatase activity and messenger ribonucleic acid expression in rat ovarian granulosa cells. *Biol Reprod* 61:1104-1109.