

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Relación entre el número de ondas foliculares y las estructuras ováricas, los factores de crecimiento y sus receptores en vaquillonas para carne

Por: Reineri Pablo Sebastián

Facultad de Ciencias Veterinarias

U.N.C.P.B.A.



2021

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Relación entre el número de ondas foliculares y las estructuras ováricas, los factores de crecimiento y sus receptores en vaquillonas para carne

Por: Reineri Pablo Sebastián

Director: Méd. Vet., Palma Gustavo Adolfo, PhD.

Co-Director: Méd. Vet., Callejas Santiago, MSc.; Dr.

Facultad de Ciencias Veterinarias

U.N.C.P.B.A.

Miembros del jurado:

Dra. Carolina Bianchi

Dra. Isabel María Lacau

Dr. Hugo H. Ortega

*A mis padres, hermanas, a mi esposa y a mis hijas
por apoyar, comprender y permitir
que le dedique tanto tiempo al estudio y al trabajo.*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	2
SUMMARY	3
PALABRAS CLAVES	4
ABREVIATURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICES DE FIGURAS	8
INTRODUCCIÓN	10
DINÁMICA FOLICULAR, REGULACIÓN ENDÓCRINA.....	11
ANATOMIA Y FISILOGIA DE LOS FOLICULOS OVARICOS.....	13
FACTORES DE CRECIMIENTO	16
Superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGFβ).....	16
Factor de crecimiento de diferenciación 9 (GDF9)	18
Proteína morfogenética ósea 15 (BMP15).....	20
Familia de los factores de crecimiento de los fibroblastos (FGFs).....	21
Factor de crecimiento básico de los fibroblastos (FGF2)	23
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Estudio I: Caracterizar las estructuras ováricas (folículos y cuerpo lúteo) en vaquillonas Braford de 26 meses de edad con una dinámica de 2 y 3 ondas foliculares previas a la ovulación.	27
Área y período de estudio.	27
Diseño de la investigación.	28

Vaquillonas.....	28
Sincronización de la ovulación.....	28
Ultrasonografía para determinar vaquillonas con un patrón de dos y tres ondas foliculares.....	29
Punción y aspiración del contenido del folículo pre ovulatorio.....	32
Análisis estadístico.....	33
Estudio II: Expresión génica de los factores de crecimiento BMP15, GDF9, FGF2 y sus receptores en células foliculares bovinas, provenientes de ovarios obtenidos de frigorífico (<i>ex vivo</i>).....	34
Área y período de estudio.....	34
Diseño de la investigación.....	34
Animales y células foliculares.....	35
Extracción y purificación del ácido ribonucleico (ARN) total en células foliculares y ovocitos.....	36
Diseño de cebadores.....	37
Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37
Estudio III: Expresión génica de los factores de crecimiento GDF9, BMP15, FGF2 y sus receptores en células foliculares bovinas, provenientes de ovarios de vaquillonas con patrón de 2 y 3 ondas foliculares (<i>in vivo</i>).....	40
Área y período de estudio.....	40
Diseño de la investigación.....	40
Animales y obtención de células foliculares.....	40
Pellet de células foliculares.....	40
Extracción y purificación de RNA total a partir de células foliculares.....	40
Diseño de cebadores.....	41

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).	41
Análisis estadístico.	42
RESULTADOS	43
Estudio I.	43
Estudio II.	46
Estudio III.	48
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	54
PRODUCCIÓN SURGIDA DE LA PRESENTE TESIS	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

AGRADECIMIENTOS

Quiero manifestar mi más especial y sincero agradecimiento al Dr. Palma Gustavo, por su responsabilidad y apoyo durante todo el trabajo de tesis, siempre exigiendo la excelencia. Gracias por enseñarme a trabajar en equipo y/o por intentarlo. Mi más respeto y prestigio hacia su persona. Muchas gracias PROFESOR. Agradecer al Dr. Callejas Santiago por todas sus enseñanzas, apoyo académico y acompañamiento personal durante la realización de mis estudios y trabajo de tesis. Gracias por darme tranquilidad que el camino de la decencia y el trabajo son los correctos. A la larga da sus frutos. Agradecer a mi principal compañera de trabajo, Coria María Sumampa, que ha colaborado incondicionalmente, en todo el período de lectura, trabajo y evaluación de las variables en estudio. Gracias, es un placer trabajar con grandes amigos y consolidar un equipo de trabajo. Agradezco de sobremanera, al Campo Experimental Francisco Cantos del INTA-Santiago del Estero por proporcionar animales, instalaciones y recursos humanos, durante todo el período de estudio, permitiendo desarrollar el estudio *in vivo* con toda la logística necesaria. Además, agradecer, a los recursos humanos de los establecimientos, principalmente a Rodolfo Andrada, que me ayudo en las tareas de manga y se responsabilizó con los encierres diarios en tiempo y forma. Agradecer al Frigorífico Forres – Beltrán por permitir ingresar a sus instalaciones durante las faenas y recolectar los ovarios necesarios para desarrollar el trabajo *ex vivo*. También quiero agradecer, al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), a la Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE), a la Universidad Nacional de Córdoba (UNC), Instituto de Nanobiotecnología de al Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por proporcionar recursos humanos e instrumentales durante todo el trabajo de investigación. Además, quiero corresponder al Consejo Federal de Ciencia y Tecnología (COFECyT) [PFIP-ESPRO Vinculado N° 032/13. 2013/2015], Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT); Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica [PICT 1784-2013] e INTA [PNSA 1115053 y PRO 1231205], por el apoyo en el financiamiento en este trabajo de tesis. A TODOS, MUCHAS GRACIAS.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la dinámica del patrón de ondas foliculares en vaquillonas para carne. Se utilizaron 28 vaquillas Braford, pertenecientes al rodeo de la Estación Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en Santiago del Estero. El folículo dominante (FD) y el cuerpo lúteo (CL) fueron monitoreados diariamente por medio de ultrasonografía, durante 30 ± 2 días en dos repeticiones, para identificar el desarrollo de dos (2W) y tres ondas (3W) foliculares en vaquillonas para carne. Los FD preovulatorios fueron aspirados el día 19 en 2W y el día 22 en 3W. En las células foliculares (CF) provenientes de 2W y 3W se determinó la expresión génica del factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF9), la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF2), el receptor beta del factor de crecimiento transformante beta 1 ($TGF\beta$ -R1), el receptor de proteína morfogenética ósea tipo IB (BMPRI-IB) y el receptor del factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGFR2), mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Los promedios de las variables de desarrollo folicular y CL entre 2W y 3W se compararon utilizando la prueba t de Student para muestras independientes. Se utilizó el método $\Delta\Delta Ct$ para la determinación de expresión génica, utilizando gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la proteína ribosomal larga (RPLP0) como genes de referencia. El nivel de significancia se estableció en $P \leq 0.05$ y la tendencia cuando el valor de P estaba entre > 0.05 y < 0.10 . La regresión del FD de la primera onda folicular y la emergencia del FD de la segunda onda folicular comenzaron más tarde en las vaquillonas 2W que en 3W ($P = 0.02$ y $P < 0.01$, respectivamente). La regresión de la CL comenzó antes en el grupo 2W que en el grupo 3W ($P < 0.01$). La expresión génica de factores de crecimiento y receptores fue similar entre los grupos. Sin embargo, se observaron niveles relativos más altos de BMP15 en el grupo 2W ($P = 0.07$). Los resultados proponen que los patrones de onda fueron regulados por el tiempo de desarrollo del FD de la primera onda y la vida media del CL. Además, niveles más altos de BMP15 podrían producir una vida más corta de CL. Finalmente, el presente trabajo sugiere que los usos de ultrasonografía, asociada con las determinaciones moleculares, podrían utilizarse como una herramienta sencilla y efectiva para estudiar la dinámica folicular. En este sentido, generar y ampliar investigaciones vinculadas al diseño de protocolos para inseminación artificial, re sincronización y transferencia embrionaria a tiempo fijo, con la finalidad de desarrollar estrategias que mejoren los índices reproductivos y/o faciliten la logística de aplicación de los protocolos utilizados actualmente. No solo en la especie bovina, sino también, en otras especies de interés productivo.

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the dynamics of the follicular wave pattern in beef heifers. Twenty-eight Braford heifers, belonging to the herd of the Experimental Station of the National Institute of Agricultural Technology (INTA), in Santiago del Estero were used. Dominant follicle (FD) and corpus luteum (CL) were monitored daily by ultrasonography, for 30 ± 2 days in two repetitions, to identify the development of two (2W) and three follicular waves (3W) in beef heifers. Pre-ovulatory FD were aspirated on day 19 in 2W and on day 22 in 3W heifers. Gene expression of growth differentiation factor 9, bone morphogenetic protein 15 (BMP15), fibroblast growth factor basic (FGF2), transforming growth factor beta receptor 1 (TGF β -R1), bone morphogenetic protein receptor type IB (BMPRI-IB) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) were determined by real-time polymerase chain reaction in follicular cells (CF) from 2W and 3W ovaries. The averages of the variables of follicular development and CL between 2W and 3W ovaries were compared using the Student's t-test for independent samples. The $\Delta\Delta C_t$ method was used for the determination of gene expression, using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and the long ribosomal protein (RPLP0) as reference genes. The level of significance was established at $P \leq 0.05$ and the trend significance when the value of P was between > 0.05 and < 0.10 . The regression of the FD of the first follicular wave and the emergence of the FD of the second follicular wave began later in the 2W heifers than in 3W heifers ($P = 0.02$ and $P < 0.01$, respectively). The regression of the CL started earlier in the 2W group than in the 3W group ($P < 0.01$). Gene expression of growth factors and receptors was similar between the groups. However, higher relative levels of BMP15 were observed in the 2W group ($P = 0.07$). The results propose that the wave patterns were regulated by the developmental time of the FD of the first wave and the half-life of the CL. Furthermore, higher levels of BMP15 could produce a shorter CL life. Finally, the present work suggests that the uses of ultrasonography, associated with molecular determinations, could be used as a simple and effective tool to study follicular dynamics. In this sense, it can help to generate and expand research related to the design of protocols for artificial insemination, re-synchronization, and fixed-time embryo transfer, in order to develop strategies that improve reproductive rates and/or facilitate the logistics of applying the protocols currently used, not only in the bovine species, but also in other species of productive interest.

PALABRAS CLAVES

Ondas foliculares, factores de crecimiento, células foliculares, vaquillonas para carne.

KEY WORDS

Follicular waves, growth factors, follicular cells, beef heifers.

ABREVIATURAS

17-OHP5	17-Hidroxipregnenolona
2W	Dos ondas foliculares
3bHSD	Deshidrogenasa 3-beta-hidroxiesteroide
3W	Tres ondas foliculares
ALK	Cinasa similar al receptor de activina
AMH	Hormona Anti-Mulleriana
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BMP15	Proteína morfogénica del hueso 15
BMPRIB	Receptor de la proteína morfogénica del hueso tipo IB
BMPRIIB	Receptor de la proteína morfogénica del hueso tipo IIB
CF	Células foliculares
CG	Células de la granulosa
CL	Cuerpo lúteo
COCs	Complejos ovocitos cumulus
COFECyT	Consejo Federal de Ciencia y Tecnología (COFECyT)
CONICET	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Co-SMAD	Proteína SMAD mediadora o cooperadora
COX2	Ciclooxigenasa 2
CT	Células de la teca interna
CYP17A1	Citocromo P450 (17 a-hidroxilasa), familia 17, subfamilia A, polipéptido 1
CYP19A1	Citocromo P450 (aromatasa), familia 19, subfamilia A, polipéptido 1
D1-D2-D3	Tres dominios de inmunoglobulinas

DHEA	Dehidroepiandrosterona
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
E	Estrógeno
FD	Folículo dominante
FGF2	Factor de crecimiento fibroblástico básico
FGFR2	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico 2
FGFs	Familia de los factores de crecimiento de los fibroblastos
FS	Folículos subordinados
FSH	Hormona folículo estimulante
FSHR	Receptor de FSH
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDF	Factores de diferenciación del crecimiento
GDF9	Factor de crecimiento de diferenciación 9
GDNF	Factor neurotrópico derivado de la célula glial
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
gremlin	Gremlin
HAS2	Hialurónico sintasa 2
HS	Sulfato de heparán
IDT	Integrated DNA Technologies
IM	Intramuscular
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
KL	Kit ligando
LH	Hormona luteinizante
LHR	Receptor de LH
MH	Homología mad
MH1	Extremo amino terminal
MH2	Extremo carboxilo
MINCyT	Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT)
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercurio

NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
°C	Grados centígrados
Ov	Ovocito
OV	Ovulación
P	Progesterona
P4	Progesterona
P450c17 o CYP17	17 α -hidroxilasa
P450scc	Citocromo de escisión de la cadena lateral P-450
P5	Pregnenolona
PBS	Tampón fosfato salino o buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGF2α	Prostaglandina F2 α
Ptgs2	Prostaglandina
Ptx3	Pentraxina 3
RFSH	Receptor de FSH
RPLPO	Proteína ribosomal larga
RSMAD	Receptor de la proteína relacionada con Smad y Mad
RT	Transcriptasa inversa
SEM	Error estándar de la media
SMAD	Proteína relacionada con Smad y Mad
SP	Péptido señal amino-terminal
StAR	Proteína reguladora aguda
TGFβ	Familia del factor transformador de crecimiento β
TGFβR1	Receptor 1 del factor de crecimiento transformante beta
TK1-TK2	Tirosina quinasa 1 y 2
UNC	Universidad Nacional de Córdoba
UNSE	Universidad Nacional de Santiago del Estero
uPA	Proteasa uroquinasa plasmínica
ZAR1	Detención de cigoto-1

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para ensayos de PCR en tiempo real (qPCR).....	39
Tabla 2. Medias \pm de las características foliculares y del cuerpo lúteo en vaquillonas con 2W vs. 3W.....	45
Tabla 3. Nivel de ARNm de los factores de crecimiento GDF9, BMP15 FGF2 y sus receptores TGFBR1, BMPR1B y FGFR2.....	49

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática y resumida del mecanismo fisiológico de dos células gonadotropinas, en folículo dominante, mediante el cual los folículos producen estrógenos. Adaptado y modificado de (Ireland, 1987).....	15
Figura 2: Modelo resumido del efecto de GDF9, BMP15 y FGF2 sobre las células foliculares en los diferentes estadios de desarrollo folicular.....	25
Figura 3: Período y dirección de la sección experimental I, para caracterizar las estructuras ováricas en vaquillonas con dinámica de 2 y 3 ondas foliculares, previas a la ovulación.	27
Figura 4: Métodos operativos realizados durante el período experimental.	29
Figura 5: Metodología utilizada para la caracterización de la dinámica folicular y del cuerpo lúteo.	30
Figura 6: Imágenes de ultrasonografías transrectales de ovarios bovinos, utilizando un transductor lineal. (Imágenes de ultrasonografía, Reineri 2016).....	31
Figura 7: Imagen ultrasonografía transvaginal de ovario, utilizando transductor convexo. (Imagen ultrasonografía, Reineri 2017).	33
Figura 8: Período y dirección de la sección experimental II, para realizar la expresión génica de los factores de crecimiento BMP15, GDF9, FGF2 y sus receptores en células foliculares bovinas, provenientes de ovarios obtenidos de frigorífico (ex vivo).	34
Figura 9: Células foliculares recuperadas mediante aspiración manual de folículos antrales (≤ 6 mm de diámetro).	35
Figura 10: Ovocito separado de las células del cumulus mediante el efecto mecánico del pipeteo repetido. (Fotografía: Reineri et al., 2017).	36
Figura 11: Perfil de diámetro promedio de los folículos dominantes de la onda sincronizada (desde el día -5 hasta el día -1). Perfil de diámetro promedio de los folículos dominantes	

(primera, segunda y tercera ondas foliculares) y la CL (desde el día 0 hasta el día 22) en vaquillonas con 2 y 3 patrones de ondas foliculares. (Día 0 = ovulación).....43

Figura 12: Expresión de GDF9, BMP15, FGF2, TGF β -RI, BMPR-IB, FGFR2 y GAPDH en diferentes tipos de células en ovarios bovinos. Adaptado y modificado de (Reineri *et al.*, 2018).....46

Figura 13: Expresión de los genes CYP19A1, CYP17A1 y ZAR1 en sedimentos de células foliculares. Se incluyó un marcador de cien pares de bases para estimar el tamaño del fragmento.....48

INTRODUCCIÓN

El desarrollo folicular durante el ciclo estral en la hembra bovina, ocurre en patrones de ondas de crecimiento, durante los cuales generalmente se observan dos o tres ondas (Adams *et al.*, 2008; Ginther *et al.*, 2016). La foliculogénesis y la diferenciación folicular son procesos que culminan en la ovulación, coordinados principalmente por mecanismos endócrinos bien establecidos. Estos procesos son el resultado de transformaciones celulares y moleculares de las diferentes estructuras que conforman el folículo (Paulini *et al.*, 2014). Cada vez hay más pruebas de que los factores de crecimiento juegan un papel crucial en la foliculogénesis y la adquisición de la competencia para el desarrollo de los ovocitos. Entre ellos, el factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF9), la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15) y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGF2), con sus receptores principales, se han visto involucrados en la selección del folículo dominante, regulando eventos importantes como la proliferación de células de la granulosa, diferenciación y esteroidogénesis (Chang *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2016). Además, la presencia de transcripciones de GDF9, BMP15, FGF2, el receptor 1 del factor de crecimiento transformante beta (TGF β -R1), el receptor de la proteína morfogenética del hueso tipo IB (BMPR-IB) y el receptor del factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGFR2) en las células foliculares, sugiere que estos factores podrían actuar como reguladores parácrinos y autócrinos en la foliculogénesis (Reineri *et al.*, 2018). Se han realizado muchos trabajos que correlacionan la expresión génica de los factores de crecimiento en células del cumulus, con diferentes medidas de resultado, como la madurez de los ovocitos, la fertilización, el desarrollo embrionario, la implantación y la gestación (Mckenzie *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014, 2015). En este sentido, el estudio de la caracterización de los factores moleculares que intervienen en el desarrollo folicular ovárico, es fundamental para comprender su mecanismo de acción sobre la foliculogénesis, así como para determinar la competencia de los ovocitos y regular la ovulación. Sin embargo, no se han registrados estudios que investiguen la expresión génica en células foliculares obtenidas de ovarios de vaquillonas para carne con diferente número de ondas foliculares. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue estudiar la dinámica de los folículos dominantes (FD) y del cuerpo lúteo (CL) para caracterizar los patrones de dos (2W) y tres (3W) ondas foliculares y determinar la expresión génica de factores de crecimiento (GDF9, BMP15, FGF2, TGF β , BMPR-IB, FGFR2) en células foliculares provenientes de vaquillonas con 2W y 3W.

DINÁMICA FOLICULAR, REGULACIÓN ENDÓCRINA

Durante el ciclo estral, la hembra bovina manifiesta cambios continuos de crecimiento y regresión de sus folículos ováricos, conocidos como dinámica folicular y caracterizado por ondas parcialmente superpuestas de crecimiento folicular (Adams *et al.*, 2008). Cada onda comienza con la emergencia de un grupo de folículos de hasta 4 milímetros (mm) de diámetro (Ginther *et al.*, 2000), precedida por un aumento en las concentraciones plasmáticas de la hormona folículo estimulante (FSH), que alcanza su punto máximo aproximadamente 12–24 horas antes de la aparición de la onda folicular. Posteriormente, la FSH disminuye, llegando a su concentración más baja a los 4 días de la aparición de la onda y permanece baja durante los siguientes 2 o 3 días (Adams *et al.*, 1992). Los folículos en continuo crecimiento producen estradiol e inhibina causando la disminución de la FSH, a través de un sistema de retroalimentación negativa en la adenohipófisis. A pesar de que disminuyen sus concentraciones circulantes, la FSH sigue siendo esencial para los folículos en crecimiento, hasta que los mismos alcanzan un diámetro de 8,0 a 8,5 mm. A partir de ese momento, la liberación de FSH es casi suprimida y se mantiene en niveles muy bajos. En este momento uno de los folículos del grupo que había comenzado la onda, se diferencia y comienza el desvío folicular: este folículo (folículo dominante, FD) continúa su crecimiento, mientras que el resto de folículos, llamados subordinados (FS) disminuyen drásticamente su tasa de crecimiento hasta que sufren atresia folicular (Ginther *et al.*, 2000, 1999). Los receptores de FSH están presentes solo en las células de la granulosa, mientras que los receptores de la hormona luteinizante (LH), se encuentran en las células de la granulosa y de la teca interna, en la pared de los folículos antrales. El folículo dominante adquiere más receptores de LH en sus células de la granulosa que sus subordinados (momento de la desviación folicular) y, durante el período de bajas concentraciones de FSH, cambia su dependencia de esta última a LH, lo que le permite continuar su crecimiento. Por el contrario, los folículos subordinados, que dependen del estímulo de FSH, sufrirán atresia folicular (Xu *et al.*, 1995; Adams *et al.*, 2008; Ginther *et al.*, 2016). Además, la atresia también ha sido asociada con una ausencia de expresión del ARNm de los receptores de LH en células de la granulosa y con una expresión reducida del ARNm de los receptores de LH en células de la teca interna y del ARNm de los receptores de FSH en células de granulosa, de los folículos subordinados (Xu *et al.*, 1995). Conjuntamente, estradiol e inhibina estimulan la producción de LH a través de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producida por el hipotálamo (Haughian *et al.*, 2013). Sumado a esto, la inhibina sensibiliza las células de la teca interna a LH aumentando sus receptores (Aerts and Bols, 2010) y se aumenta la producción de andrógenos (Aerts and Bols, 2010; Ginther,

2016). También, la LH regula la expresión de su gen receptor en las células de la granulosa de folículos dominantes, aumentando su funcionalidad y la esteroideogénesis, incluida la producción de estradiol (Luo *et al.*, 2011; Abreu *et al.*, 2018), lo que resulta en una retroalimentación positiva entre LH y estradiol, y, dependiendo de las concentraciones de progesterona y estradiol puede culminar en ovulación o en atresia del FD. Los cambios cíclicos en las concentraciones de esteroides y gonadotropinas continúan manteniendo un patrón de ondas foliculares hasta que ocurre la luteólisis y se establece una fase folicular (Evans *et al.*, 1997).

La luteólisis, por acción de la prostaglandina F2 α (PGF2 α) secretada por el tejido uterino, debido a la ausencia de un embrión durante los días 15 al 18 del ciclo estral bovino, ocasionará descensos en los niveles de progesterona (Lenis *et al.*, 2010), y permitirá que el FD produzca niveles de estradiol capaces de desencadenar el pico preovulatorio de LH. Una alta frecuencia de pulsos de LH (un pulso cada 40-60 minutos) estimula la máxima producción de estradiol, que por una retroalimentación positiva sobre el hipotálamo desencadena finalmente el pico preovulatorio de LH y FSH (Roche *et al.*, 1992). Los pulsos frecuentes de LH son responsables de la maduración final del folículo dominante, estrogénicamente activo, capaz de producir suficientes niveles de estrógenos para desencadenar el pico preovulatorio de LH y con éste la ovulación (Roche *et al.*, 1992). Por el contrario, un elevado nivel de progesterona producido por un cuerpo lúteo funcional durante el diestro o la gestación, suprime la frecuencia de pulsos de LH, disminuyendo la producción de estradiol e inhibina. Por lo tanto, el FD detendrá su metabolismo e iniciará su regresión (atresia folicular). Además, la disminución de estradiol e inhibina permitirá un aumento en las concentraciones de FSH y se reclutará una nueva onda folicular.

Pueden ocurrir 2, 3 y hasta 4 ondas foliculares previas a la ovulación (Ginther *et al.*, 1989; Adams *et al.*, 2008; Ginther *et al.*, 2016; Ginther, 2016). Los ciclos estrales que manifiesten 2 ondas foliculares serán más cortos que los de 3 ondas (Ginther y Bashir, 2013), debido a que el CL comenzará su regresión más temprano en los ciclos de 2 ondas (día 16) que en los de 3 ondas (día 19) afectando así el intervalo inter-ovulatorio (20 y 23 días, respectivamente) (Ginther *et al.*, 1989). Además, se ha descrito que mayores concentraciones de FSH durante el intervalo inter-ovulatorio están relacionadas con una mayor frecuencia de 3 ondas foliculares en vaquillonas (Ginther *et al.*, 2013).

Sin embargo, todavía no está claro el mecanismo por el cual las hembras bovinas, en las mismas situaciones de raza, edad, estado nutricional y condiciones ambientales pueden manifestar 2 o 3 ondas foliculares por ciclo.

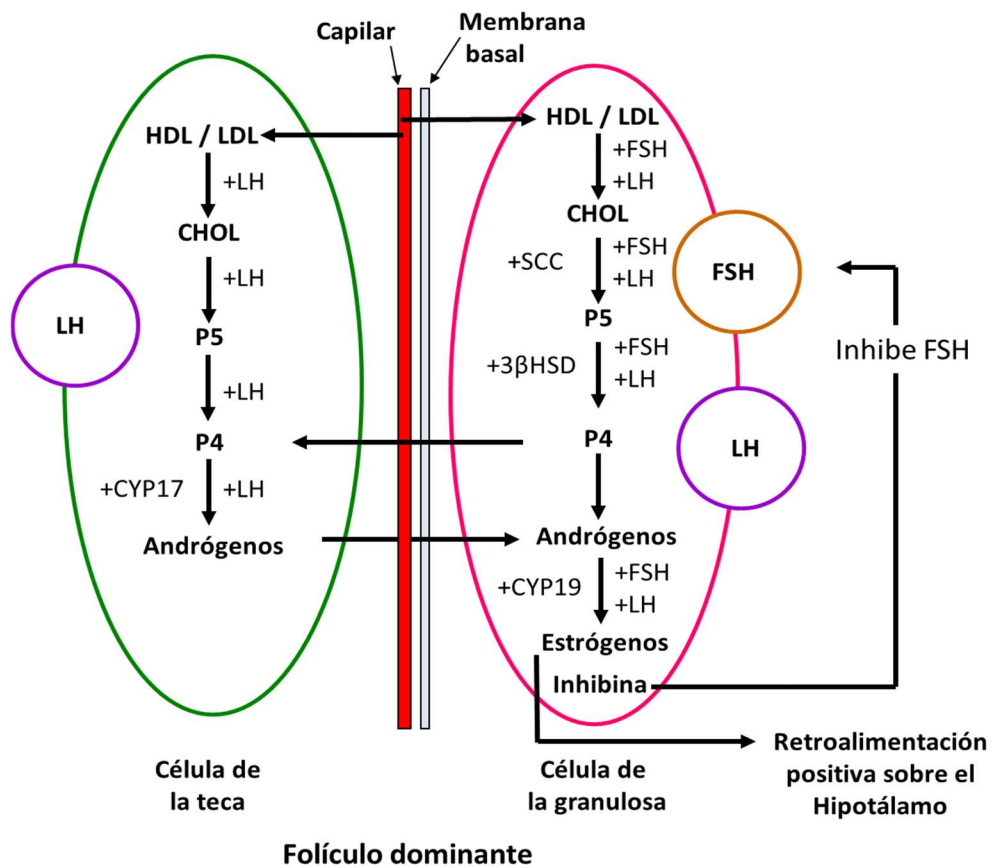
ANATOMIA Y FISILOGIA DE LOS FOLICULOS OVARICOS

Los folículos ováricos son estructuras anatómicas que tienen una disposición glandular, endócrina y exócrina, conformados por un ovocito, rodeado de dos tipos de células somáticas, fundamentales para el crecimiento folicular, células de la granulosa y de la teca (Han *et al.*, 2018). Los folículos se clasifican de acuerdo a su etapa de desarrollo, dependiendo de su tamaño, número y tipo de células somáticas que lo rodean, presencia o ausencia de zona pelucida, formación del antro folicular (Braw-Tal and Yossefi, 1997), y la capacidad de respuesta y dependencia de gonadotropinas (McGee y Hsueh, 2000). Teniendo todo esto en cuenta, se clasifican en primordiales, primarios, pre antrales pequeños o secundarios, pre antrales grandes, antrales pequeños o terciarios, antrales y antrales preovulatorio.

El desarrollo folicular en el ovario bovino es un proceso largo; lleva alrededor de 6 meses, (Lussier *et al.*, 1987). El crecimiento temprano del folículo en bovinos, revela dos etapas. La primera, caracterizada por un cambio en la forma de las células de la granulosa (CG), de aplanadas a cuboidales, y un aumento en su número, sin un aumento significativo en el diámetro del ovocito. En la segunda fase, existe una correlación lineal y positiva entre el número de células de la granulosa y el diámetro de los ovocitos, que se puede observar en los folículos con al menos la cuarta generación de células de la granulosa (40 células) (Braw-tal, 2002).

En estas etapas, diferentes factores de crecimiento, entre ellos el GDF9, BMP15 y FGF2, son fundamentales e interactúan favoreciendo la proliferación de las células somáticas y el crecimiento del ovocito (Li *et al.*, 2015, 2014; Chang *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2016). El proceso se regula por múltiples señalizaciones bidireccionales entre el ovocito y las células somáticas, a través de interacciones parácrinas que regulan el crecimiento de un grupo de folículos. En etapas antrales, estos factores interaccionan con sustancias endocrinas, proteínas y metabolitos, favoreciendo la proliferación de las células somáticas, el control de la esteroideogénesis y la maduración del ovocito. En esta etapa de desarrollo, el folículo con la mayor respuesta a FSH en el grupo en crecimiento, expresa receptores para LH en las células de la granulosa y se vuelve dominante (Ginther, 2016; Xu *et al.*, 1995). En este momento, la esteroideogénesis es crucial para el crecimiento folicular y el desarrollo de los ovocitos, iniciándose con la captación de colesterol (lipoproteínas circulantes y lípidos celulares), gracias a la acción de FSH y LH que favorecen la absorción (**Figura 1**). Luego es transportado a las mitocondrias, mediante la proteína reguladora aguda esteroideogénica y, una vez dentro, es convertido por el citocromo de escisión de la cadena lateral P-450 (P450_{scc}) en pregnenolona (P5). Posteriormente, por la acción de la 17 α-hidroxilasa / 17-20 liasa (P450_{c17} o CYP17) la P5 se convierte en 17-hidroxipregnenolona (17-OHP5),

dehidroepiandrosterona (DHEA) y esteroides sexuales; o por la deshidrogenasa 3-beta-hidroxiesteroide (3 β HSD) en progesterona (P4). Los andr3genos producidos a trav3s de esta v3a de esteroides sexuales en las c3lulas de la teca interna estimuladas por LH, se aromatizan a estr3geno en las c3lulas de la granulosa estimuladas por FSH. Este proceso esteroideog3nico de dos c3lulas, promueve la actividad de la hidroxilasa (CYP17) en las c3lulas de la teca interna, permitiendo una producci3n suficiente de andr3genos que por la acci3n de la aromatasa (CYP19) en las c3lulas de la granulosa aseguran la s3ntesis continua de estradiol, a pesar de estar disminuidos los niveles s3ricos de FSH (revisado en [Ireland, 1987; Ireland *et al.*, 2009; Dumesic *et al.*, 2011]). Conjuntamente, en esta etapa de desarrollo, las c3lulas de la granulosa producen hialuronano y versican, lo que genera un gradiente osm3tico para reclutar l3quido de la vasculatura tecal, favoreciendo el desarrollo del antro y del l3quido folicular (Rodgers y Irving-Rodgers, 2010). Al mismo tiempo, las c3lulas de la granulosa se dividen anat3mica y funcionalmente en c3lulas del cumulus y c3lulas de la granulosa murales. Las c3lulas cercanas al ovocito reciben el nombre de c3lulas del cumulus, y, agrupadas alrededor del mismo, tienen contacto metab3lico directo mediante proyecciones citoplasm3ticas (desmosomas y uniones) que penetran en la membrana del ovocito, a trav3s de la zona pel3cida, para compartir micronutrientes. Las c3lulas de la granulosa murales, ubicadas en la pared interna del fol3culo, forman una estratificaci3n de epitelio a lo largo de la l3mina basal (Paulini y Melo, 2011). Adem3s, en estadios preovulatorio, las c3lulas del cumulus segregan una matriz rica en 3cido hialur3nico durante la expansi3n del cumulus y se extruyen con el ovulo durante la ovulaci3n. Esta matriz expandida es un factor cr3tico para la integridad reproductiva, ya que permite mantener unidas las c3lulas del cumulus y el ovocito, facilitando la extrusi3n folicular y la posterior captura de fimbrias oviductales, permitiendo la penetraci3n y fertilizaci3n por parte de los espermatozoides. Por otro lado, las c3lulas de la granulosa murales, sintetizan proteasas que son de importancia para la ruptura del fol3culo en la ovulaci3n, permaneciendo dentro del ovario despu3s de que se libera el complejo c3lulas de cumulus / ovocito y experimentando una diferenciaci3n terminal para formar el cuerpo l3teo (Elvin *et al.*, 1999). Por lo tanto, estos importantes eventos favorecen la interacci3n de todos los componentes del fol3culo, permitiendo el correcto desarrollo folicular, con el objetivo de lograr la madurez de los ovocitos, capaces de ser fertilizados para alcanzar un correcto desarrollo embrionario, implantaci3n y gesti3n a t3rmino.



HDL / LDL = lipoproteínas de alta o baja densidad, CHOL = colesterol, P5 = pregnenolona, P4 = progesterona, SCC = enzimas de escisión de la cadena lateral mitocondrial. 3β HSD = 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa, CYP17 = 17 α -hidroxilasa, CYP19 = aromatasas, LH = receptor de la hormona luteinizante, FSH = receptor de la hormona foliculo estimulante, + = estimulo.

Figura 1: Representación esquemática y resumida del mecanismo fisiológico de dos células dos gonadotropinas, en folículo dominante, mediante el cual los folículos producen estrógenos. Adaptado y modificado de (Ireland, 1987).

FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento son proteínas formadas por cadenas de polipéptidos, que pueden unirse a receptores específicos glicoproteicos, ubicados en la superficie de las células, generando una cascada de reacciones que conducirá posteriormente a destinos celulares específicos (Aguilar *et al.*, 2019). Su mecanismo de secreción y acción más frecuente es parácrina o autócrina, en diversos tipos de células y solo ocasionalmente puede ser endocrino (Barbeito y Laube, 2005), ejerciendo acciones específicas en la regulación de la proliferación, migración, desarrollo, supervivencia, apoptosis y diferenciación celular. A nivel reproductivo, cumplen funciones importantes en diferentes acontecimientos, como el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación, interactuando con mecanismos moleculares, celulares y hormonales. Se describen diferentes factores de crecimiento, clasificados en base a su estructura y actividad biológica (Barbeito y Laube, 2005).

En este trabajo se priorizará el estudio del factor de crecimiento de diferenciación 9 (GDF9), la proteína morfogénica del hueso 15 (BMP15); ambos factores de crecimiento son miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) (Gode *et al.*, 2011) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF2) en células foliculares provenientes de folículos preovulatorios, obtenidos de vaquillonas con 2 o 3 ondas foliculares, previas a la ovulación.

Superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β)

La superfamilia de TGF β se organiza en cuatro subfamilias principales, clasificadas por sus funciones biológicas y su análisis filogenético. Entre ellas se encuentran (1) la subfamilia de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y los factores de diferenciación del crecimiento (GDF), (2) la subfamilia de Activinas, Inhibinas y Nodal; (3) la subfamilia TGF β s con sus tres isoformas (TGF β 1, TGF β 2, y TGF β 3) y (4) la subfamilia de la hormona Anti-Mulleriana (AMH), el factor neurotrópico derivado de la célula glial (GDNF), neurturin, artemin y persephin (Mueller y Nickel, 2012).

Todos los miembros de TGF β se sintetizan como dímeros de pro-proteínas, que incluyen un péptido señal amino-terminal (SP), un gran prodominio (pro-péptido inmaduro) y una parte madura carboxilo-terminal con un motivo característico de nudo de cistina (Mueller y Nickel, 2012). El péptido señal, ubicado en el extremo amino terminal, permite que las proteínas puedan ser secretadas. Después de la eliminación del péptido señal, las pro-proteínas experimentan dimerización. El prodominio interviene a nivel intracelular regulando la velocidad, eficiencia de

la dimerización y procesamiento proteolítico (Sopory *et al.*, 2006). El prodominio está separado de la región madura por un sitio de escisión de aminoácidos básicos que es reconocido por los miembros de la familia de la pro-proteína convertasa, como la furina. Estas proteasas reconocen un sitio de escisión de cuatro aminoácidos, con la arginina como el primer aminoácido y, a menudo, el último. El sitio de reconocimiento ocurre en el motivo RXXR (Juengel y McNatty, 2005), dando como resultado la generación de la proteína madura dimérica biológicamente activa (Shimasaki *et al.*, 2004). La región madura contiene típicamente seis a nueve cisteínas, que forman enlaces disulfuro intra e intermoleculares característicos de esta familia de proteínas, de las cuales seis forman un nudo de cistina y la séptima cisteína posibilita la formación de homodímeros (dos cadenas polipeptídicas iguales) o heterodímeros (dos cadenas polipeptídicas diferentes) dada su participación en la formación de enlaces disulfuros intermoleculares. Estos dímeros se unen covalentemente a través de un residuo de cisteína conservado (Chang *et al.*, 2002). Algunos miembros de la familia, como GDF9 y BMP15, carecen de esta cisteína conservada (séptima cisteína), que se requiere para el puente disulfuro entre subunidades y, por lo tanto, no pueden formar este enlace covalente. Sin embargo, hay evidencias de estudios *in vitro* que sugieren que GDF9 y BMP15 pueden formar homodímeros así como heterodímeros a través de interacciones no covalentes (Otsuka *et al.*, 2000; Juengel y McNatty, 2005).

Una vez secretados los dímeros de la súper familia TGF β , interactúan en la superficie celular con receptores transmembrana que presentan actividad serina / treonina quinasa, para activar una cascada de señalización que llegará al núcleo celular para traducir su respectiva señal (Juengel, JL y McNatty, 2005). Estos receptores se clasifican en tipo I y II. La arquitectura de los mismos consiste en un dominio de unión a ligando extracelular N-terminal, un único tramo de transmembrana que actúa como anclaje y un dominio intracelular con actividad serina / treonina quinasa. Las partes extracelulares comprenden diez cisteínas en ambos subtipos de receptores (tipo I y II), pero con una disposición secuencial distinta. Además, los receptores tipo I poseen un dominio rico en glicina / serina (caja GS) intracelular que es esencial para la activación de la ruta de quinasa – SMAD en sentido descendente (Mueller y Nickel, 2012). Las SMAD (proteína relacionada con Smad y Mad) son proteínas citoplasmáticas, cuya función es permitir que los TGF β puedan transmitir sus señales desde los receptores de membrana hasta el núcleo. Las SMAD son directamente fosforiladas y activadas por los receptores de transmembrana, para luego formar complejos SMAD-SMAD heteroméricos que se mueven hacia el núcleo, donde organizan las respuestas transcripcionales (Kretzschmar y Massague, 1998). Según lo describe de Caestecker (2004), se han identificado siete receptores de tipo I [cinasa similar al receptor de activina (ALK) del 1 al 7] y cinco receptores de tipo II (ActRII, ActRIIB, BMPRII, TGF β RII y AMHRII). Como

los ligandos de TGF β son secretados en forma de dímeros, dos receptores de cada subtipo se ensamblan en un complejo receptor heterotetramérico, el receptor de tipo II transfosforila al receptor de tipo I en la casilla GS, activando así la quinasa del receptor de tipo I. La vía SMAD clásica se activa mediante la fosforilación de los factores R-SMAD (receptor de SMAD) por la quinasa receptora de tipo I, que conduce a la formación de complejos entre las R-SMAD y el Co-SMAD. Este último complejo, puede translocarse al núcleo y junto con otros factores de transcripción, posiblemente activados por otras vías de señalización, regulan la transcripción de genes específicos (Mueller y Nickel, 2012).

Las SMAD se las clasifica en tres grupos, dependiendo de sus roles en el proceso de señalización, entre ellas las SMAD reguladas por receptor (R-SMAD). La arquitectura de las mismas se compone de dos dominios de homología mad (MH), uno en el extremo amino terminal (MH1) y otro en el extremo carboxilo (MH2), unidas por la región enlazadora intermedia que es de longitud y secuencia variables. El extremo MH1 presenta motivos de unión para el ADN y el MH2 es el encargado de unirse con los receptores y con otras proteínas SMAD (Kretzschmar y Massague, 1998). Pertenecen a las R-SMAD: las SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 y SMAD8. Otro grupo, las SMAD mediadora o cooperadora (Co-SMAD), con su único miembro, las SMADA4, que presentan la misma arquitectura que R-SMAD, pero en las cuales la secuencia de serinas conservadas está ausente, por lo tanto, no es fosforilada por los receptores tipo I y debe formar complejos con R-SMAD para traslocar al interior del núcleo, para interactuar con activadores o represores que regulen la expresión génica específica (Ross y Hill, 2008). Por último, las SMAD inhibitorias (I-SMAD), que ejercen un efecto negativo sobre las SMADs anteriormente descritas. Su arquitectura presenta el dominio MH2, pero están ausentes la secuencia de serinas conservadas y MH1. Las I-SMAD se unen a los receptores tipo I, bloqueando la fosforilación de las R-SMAD, impidiendo su activación (Ross y Hill, 2008), este último está integrado por las SMAD6 y 7 (Kretzschmar y Massague, 1998).

Factor de crecimiento de diferenciación 9 (GDF9)

En la especie bovina el gen de GDF9 [*Bos Taurus*] se encuentra localizado en el cromosoma 7 (NC_037334.1); el mismo consiste de dos exones separados por un solo intrón (Wu y Matzuk 2002). Este gen, codifica para la síntesis de la proteína del GDF9, constituida por 453 aminoácidos (Marchitelli y Nardone, 2015). El GDF9 es un factor derivado principalmente del ovocito (Juengel y McNatty, 2005; Orisaka *et al.*, 2006) y existe evidencia convincente en varias especies de mamíferos que es esencial para el desarrollo normal de los ovocitos y de las células de la granulosa,

así también, como para la formación de células de la teca (Otsuka *et al.*, 2011). Su actividad biológica esta mediada por señales parácrinas entre el ovocito y sus células somáticas adyacentes, interactuando con receptores tipo II (BMPRIIB) y receptores tipo I (TGFβRI o ALK5), activando R-SMAD 2 y 3 (Kaivo-oja *et al.*, 2003; Mahesh *et al.*, 2017). El GDF9 desempeña roles importantes en todas las etapas de la foliculogénesis, en etapas iniciales, promueve el desarrollo de folículos primordiales y primarios a pequeños folículos pre antrales (Skinner, 2005), estimulando la mitosis en las células de la granulosa (McNatty *et al.*, 2005) y de la teca (Vitt *et al.*, 2000; Spicer *et al.*, 2008), efecto mediado por la capacidad de estimular la expresión del kit ligando o factor de células madre (Wang y Roy, 2004). En la etapa de transición pre antral / antral, induce la diferenciación celular, desarrollando fenotipos divergentes en las capas celulares de la granulosa. La divergencia se produce entre las células de la granulosa inmediatamente adyacentes al ovocito, denominadas células del cumulus, y las células de la granulosa murales, que están más alejadas del ovocito, ubicadas alrededor de la periferia del folículo, separado del ovocito por un antro (Elvin *et al.*, 1999). Dentro de estos dos fenotipos de células somáticas, puede ocurrir una especialización adicional dependiendo de la posición relativa dentro de las capas de células de la granulosa, ya que, células en contacto físico directo con el ovocito regulan las funciones de las células en su vecindad inmediata, estableciendo y manteniendo el fenotipo de las células cumulus (Paulini y Melo, 2011). También, en esta etapa, promueve la supervivencia folicular al suprimir la apoptosis de las células granulosas y la atresia folicular (Orisaka *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2014), probablemente por la acción estimuladora de GDF9 sobre la expresión del receptor de FSH (FSHR) en las células de la granulosa, esencial para el crecimiento del folículo antral dependiente de la FSH (Otsuka *et al.*, 2011). En folículos antrales y preovulatorio tempranos, el GDF9 promueve la proliferación de las células de la granulosa a la vez que inhibe la esteroidogénesis inducida por FSH y la expresión de los receptores de LH en células de la granulosa LHCGR (Vitt *et al.*, 2000), a través de la modificación de la señalización post-receptor (Otsuka *et al.*, 2011). Además, GDF9 es crucial para el proceso de expansión de cumulus, ya que induce la expresión de los genes ácido hialurónico sintetasa 2 (HAS2), ciclooxigenasa 2 (COX2), pentraxina 3 (Ptx3), prostaglandina (Ptgs2), gremlin (GREM1) y la síntesis del ARNm esteroidogénico de la proteína reguladora aguda (StAR), pero suprime el plasminógeno activador de la proteasa uroquinasa plasmínica (uPA) y la síntesis de ARNm del receptor de LH (LHR), en las células del cumulus, que son esenciales para su expansión, durante la maduración del ovocito y antes de la ovulación (Elvin *et al.*, 1999; Paulini and Melo, 2011; Dumesic *et al.*, 2015). La inducción de HAS2 y la supresión de la uPA en las células del cumulus, son eventos claves en la producción de la matriz extracelular rica en ácido hialurónico que se produce durante la expansión del cumulus, logrando

un microambiente óptimo para los ovocitos, procesos que son esenciales para la normal ovulación, la fertilización y la reproducción (Elvin *et al.*, 1999). GDF9 inhibe la esteroidogénesis inducida por FSH, mientras promueve la síntesis de progesterona en células de la granulosa en folículos preovulatorio, inducida por la vía dependiente de COX2, PGE2, EP2 que se requiere in vivo para una expansión óptima del cumulus. Por lo tanto, GDF9 estimula tanto la síntesis de prostaglandinas E2 como la expresión del receptor E2, ambos necesarios para la síntesis de P4 (Elvin *et al.*, 2000). En cambio, GDF9 en células de la granulosa murales aumenta uPA, lo que es importante para la ruptura folicular, y LHR para favorecer una correcta formación del cuerpo del cuerpo lúteo (Elvin *et al.*, 1999).

También, tiene funciones importantes durante las etapas finales del crecimiento del folículo antes de la ovulación, ya que las células del cumulus antes del pico de LH, requieren de GDF9 para llevar a cabo diversas cascadas metabólicas, entre ellas, glucólisis y biosíntesis de esteroides (Sugiura *et al.*, 2005).

Proteína morfogenética ósea 15 (BMP15)

En la especie bovina el gen de BMP15 [*Bos Taurus*] se encuentra localizado en el cromosoma X (NC_037357.1) y consta de dos exones separados de un intrón, los primeros exones codifican una secuencia de péptidos señal predicha que es necesaria para la secreción (Wu and Matzuk, 2002). Este gen, codifica para la síntesis de la proteína de la BMP15, constituida por 394 aminoácidos (NP_001026922). La BMP15 es un factor derivado del ovocito (McNatty *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007) y existe una amplia evidencia que indica que tiene un papel importante durante el desarrollo folicular desde las etapas primordiales a las primarias en adelante (Gasperin *et al.*, 2014; Shimizu *et al.*, 2019). Su actividad biológica está mediada por señales parácrinas entre el ovocito y sus células somáticas adyacentes, interactuando con receptores tipo II (BMPRIIB) y receptores tipo I (BMPRI o ALK6), activando vía R-SMAD 1, 3, y 8 (Mahesh *et al.*, 2017; Moore *et al.*, 2003), aunque recientemente se ha descrito en humanos, que también puede hacerlo por vías no Smad (p38 MAPK) (Shimizu *et al.*, 2019). La BMP15, similar al GDF9, estimula la proliferación y diferenciación de las células de granulosa (Otsuka *et al.*, 2000) e interviene en la expansión del cumulus (Lan *et al.*, 2003). La BMP15 interactúa con kit de ligando (KL) en la regulación de la mitosis de las células de la granulosa, a través de sus receptores en para estimular la expresión de KL. Este, a su vez, actúa a través del receptor de KL (c-kit) en la superficie del ovocito para inhibir la expresión de BMP-15, formando un circuito de retroalimentación negativa. KL causa un aumento en la mitosis de las células de la granulosa, presumiblemente al estimular al ovocito a

secretar un mitógeno no identificado (Otsuka y Shimasaki, 2002). Además, BMP15 puede inhibir la biosíntesis de P4 inducida por FSH, ya que puede inhibir las acciones de FSH al suprimir la expresión de FSHR en células de granulosa de rata. En consecuencia, las vías bioquímicas que eventualmente conducen a la síntesis de P4 por las CG son inhibidas, ya que la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR), la enzima de escisión de la cadena lateral P450 (P450_{scc}), la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), el receptor LH y las subunidades de inhibina / activina (α, βA y βB) también son inhibidos por BMP15 (Shimasaki *et al.*, 2004; Moore y Shimasaki, 2005; Otsuka *et al.*, 2011).

Las acciones de BMP15 están reguladas por la folistatina, una proteína de unión que puede unirse a BMP15 y reducir significativamente su actividad (Otsuka *et al.*, 2001), lo que demuestra una compleja interacción intrafolicular, pero bien equilibrada, que controla el crecimiento y desarrollo folicular.

BMP15 junto con GDF9, son responsables de regular la biosíntesis de colesterol de las células del cumulus, como una compensación por la deficiencia en los ovocitos (Su *et al.*, 2008). BMP15 coopera para promover la glucólisis en las células del cumulus, ya que los ovocitos de mamíferos no pueden iniciar la glucólisis y las células del cumulus deben proporcionar los productos de glucólisis, necesarios para el desarrollo normal del ovocito (Sugiura *et al.*, 2005, 2008). También, BMP15 participa en la regulación de la apoptosis de las células del cumulus, previniendo activamente la muerte celular dentro de los complejos de cumulus-ovocitos (COCs) hasta el momento de la ovulación (Hussein *et al.*, 2005).

Por lo tanto, GDF9 y BMP15 están presentes en la mayoría de las etapas del crecimiento folicular y se consideran como una unidad de señalización funcional importante, más que como reactivos parácrinos individuales que actúan independientemente uno del otro, en el proceso de la foliculogénesis (McNatty *et al.*, 2005).

Familia de los factores de crecimiento de los fibroblastos (FGFs)

Los FGFs cumplen roles claves en muchos procesos biológicos e inducen actividad angiogénica, mitogénica, quimiotáctica y morfogénica en una amplia variedad de células y tejidos (Plotnikov *et al.*, 2000; Schams y Berisha, 2002). La familia de los FGFs en mamíferos está constituida por 18 péptidos, agrupados en seis subfamilias (Ornitz y Itoh, 2001), entre ellas, la subfamilia FGF1 (FGF1 y FGF2), la subfamilia FGF4 (FGF4, FGF5 y FGF6), la subfamilia FGF 7 (FGF3, FGF7, FGF10 y FGF22), la subfamilia FGF8 (FGF8, FGF17 y FGF18), la subfamilia FGF9 (FGF9,

FGF16 y FGF20) y la subfamilia FGF19 (FGF19, FGF21 y FGF23) (Belov y Mohammadi, 2013). Todas estas subfamilias comparten secuencia y similitud estructural, lo que las agrupa en la misma familia, salvo los miembros de la subfamilia FGF11, FGF12, FGF13 y FGF14, que no se clasifican como las demás subfamilias, porque no pueden activar los receptores de FGF (Hui *et al.*, 2018). Los FGFs poseen un peso molecular que varía entre 17 a 34 kDa y están compuestos por 150 a 250 aminoácidos que comparten del 13 al 71% de homología (Itoh y Ornitz, 2004). Todos los miembros de la familia FGF, excepto FGF1, FGF2, FGF9, FGF16 y FGF20, incluyen un péptido señal que se dirige a los FGF para la secreción a través de la clásica vía secretora del complejo del retículo endoplásmico de Golgi, mientras que, la secreción de FGF9, FGF16 y FGF20 se produce a través de vías independientes del complejo de retículo endoplásmico-Golgi (Hui *et al.*, 2018). Una vez secretados los integrantes de las subfamilias FGF1, FGF4, FGF7, FGF8 y FGF9 actúan de manera parácrina uniéndose a sus receptores (FGFR), gracias a su unión al cofactor sulfato de heparán (HS), mientras que la subfamilia FGF19 actúan de manera endocrina, uniéndose y activando FGFR con la proteína de la familia Klotho como cofactor Klotho, para formar dímeros con sus respectivos FGFR (Belov y Mohammadi, 2013; Hui *et al.*, 2018).

En las subfamilias con actividad parácrina, las estructuras de las mismas muestran que el núcleo de homología del FGF (compuesto por 125 aminoácidos) adoptan un pliegue de β -trébol conservado que consta de 12 cadenas β antiparalelas ($\beta 1$ – $\beta 12$) y la caja de glicina, mientras que los FGF con actividad endócrina carecen de la cadena $\beta 11$ y, por lo tanto, tienen un pliegue trébol atípico (Belov y Mohammadi, 2013). Los FGF pertenecientes a las subfamilias con actividad parácrina tienen afinidad por HS, cofactor obligatorio en la señalización de FGF. El HS es un componente de la superficie celular y colectivamente con los proteoglicanos asociados a la matriz (HSPG), desempeñan papeles cruciales en muchos procesos fisiológicos. Una función clave de HS es unirse e interactuar con proteínas de señalización, factores de crecimiento, proteínas plasmáticas, inmuno moduladores y otros factores, regulando la distribución de proteínas, la biodisponibilidad y la acción sobre las células objetivo y también servir como correceptores de la superficie celular, facilitando las interacciones ligando-receptor (Billings y Pacifici, 2015). Los FGF parácrinos contienen en su estructura un bucle $\beta 1$ – $\beta 2$ y la región extendida $\beta 10$ – $\beta 12$ que permite la unión de HS (Belov y Mohammadi, 2013). En cambio, la topología de la región de unión HS de los FGF endocrinos, difieren drásticamente de los FGF parácrinos, debido a la falta de la caja de glicina conservada parácrina y la región $\beta 10$ – $\beta 12$, no permitiendo la interacción de HS, disminuyendo la afinidad de HS de los FGF endocrinos, permitiendo que estos ligandos penetren libremente a través de la matriz extracelular rica en HS y entren en la circulación sanguínea (Goetz *et al.*, 2007). Los FGF ejercen sus efectos al unirse y activar la subfamilia de

receptores de FGF (FGFR), receptores de tirosina quinasa que están codificados por cuatro genes (FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4). La estructura básica de un FGFR consta de un dominio extracelular compuesto por tres dominios de inmunoglobulinas (D1-D2-D3), una hélice transmembrana única, un dominio de tirosina quinasa dividido intracelular (TK1 y TK2) y una caja ácida. Los dominios D2 y D3 forman el bolsillo de unión al ligando y tienen dominios distintos que se unen tanto a los FGF como a los proteoglicanos de HS. La caja ácida es necesaria para que se produzca la unión de cationes bivalentes para una interacción óptima entre FGFR y HS (Hung *et al.*, 2013).

Los FGF inducen la vía de señalización mediada por FGFR al interactuar con FGFR y HS específicos. Las interacciones macromoleculares median la dimerización u oligomerización de FGFR y activan múltiples vías de transducción de señales, incluidas las que involucran la proteína de acoplamiento FGFR sustrato 2 (FRS2), transductores de señal y activadores de transcripción (STAT), RAS, p38, proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK), ERK, JNK, Src, fosfolipasa C γ (PLC γ), el homólogo del oncogén CT10 del virus del sarcoma v-crk (avian) (Crk), proteína quinasa C (PKC) y fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). La señalización de FGF está modulada negativamente por reguladores tales como la proteína ligasa de ubiquitina E3 del proto-oncogen Cbl (CBL), DUPS, homólogo sprouty (SPRY), expresión similar a los genes FGF (SEF) y fosfatasa MAPK (MKP) (Hung *et al.*, 2013).

Factor de crecimiento básico de los fibroblastos (FGF2)

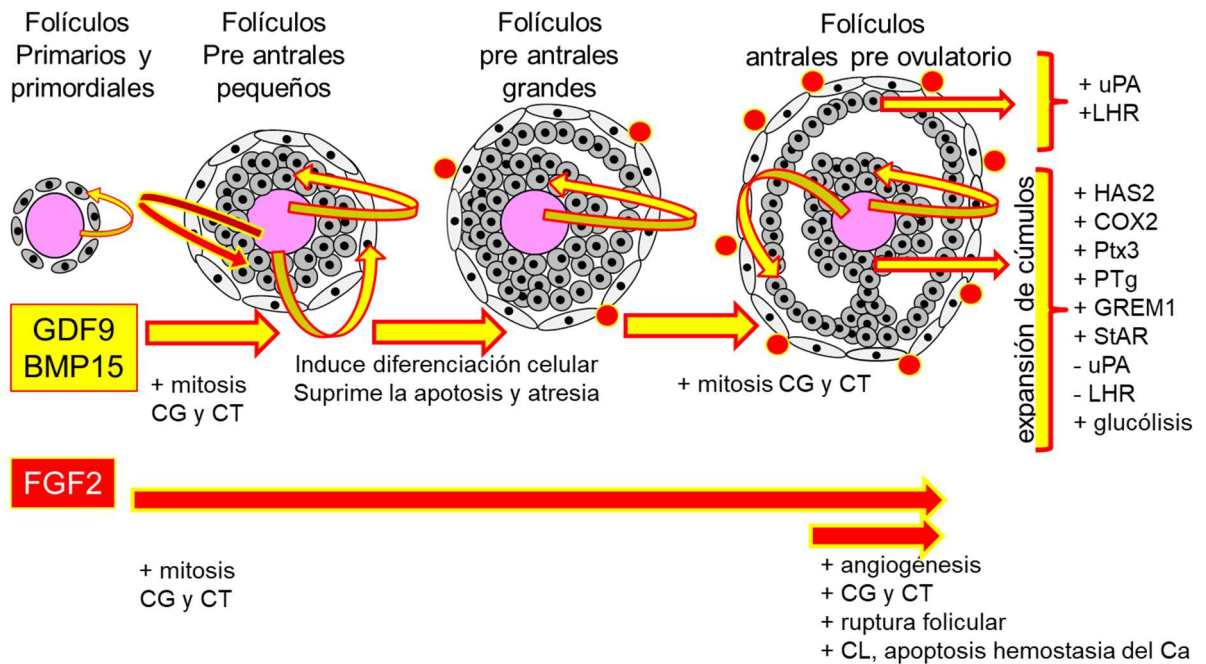
En la especie bovina el gen de FGF2 se encuentra localizado en el cromosoma 17 y consta de tres exones, separado por dos intrones (NC_037344.1). Este gen, codifica para la síntesis de la proteína del FGF2, constituida por 155 aminoácidos (NP_776481). Se ha demostrado que varios tipos de células producen el FGF2 (Okada-ban *et al.*, 2000). Su actividad biológica está mediada por señales parácrinas (Itoh and Ornitz, 2004; Hui *et al.*, 2018), interactuando con receptores de FGF de tirosina quinasa de la superficie celular (FGFR) (Chaves *et al.*, 2012). Se han identificado cinco genes FGFR de alta afinidad, entre ellos el FGFR 1 al FGFR5 (Itoh y Ornitz, 2004). Sin embargo, solo FGFR1 al FGFR4 son receptores de tirosina quinasa que consisten en un dominio intracelular de tirosina quinasa, un dominio transmembrana único y una porción extracelular que consta de tres dominios similares a inmunoglobulinas (D1, D2, D3), que son responsables de la interacción y especificidad con los FGF (Hung *et al.*, 2013). Después de la unión al receptor, los FGF inducen la dimerización funcional, la fosforilación de los residuos de tirosina citoplasmática específica y la activación de cuatro vías claves de señalización corriente abajo: Ras-MAPK, PI3K-Akt,

fosfolipasa Cg (PLCg) y transductores de señal y activadores de transcripción (STAT) (Chaves *et al.*, 2012), lo que genera que sus señales se difunden del receptor de tirosina quinasa interactuando con activadores o represores que regulan la expresión génica. A nivel ovárico el FGF2 está implicado en muchas funciones, como la mitosis, la esteroidogénesis, la apoptosis y la diferenciación de las células de la granulosa (Almeida *et al.*, 2012). También, puede promover el crecimiento de células de la granulosa, teca y del estroma ovárico durante el desarrollo folicular primitivo y temprano en ratas (Nilsson *et al.*, 2001). Está descrito que el tratamiento con FGF2 aumenta la expresión de ARNm de KL en ovarios cultivados provenientes de ratas, lo que sugiere que una función del FGF2 es aumentar la expresión de KL derivada de la granulosa y que tanto KL como FGF2 son necesarios para promover de manera óptima la transición del folículo primordial al primario (Nilsson y Skinner, 2004).

En bovinos, la proteína FGF2 se encontró en los folículos primordiales y primarios, en las células de la granulosa y de la teca, obtenidas de los folículos pre-antrales o antrales (Van Wezel *et al.*, 1995), lo que demuestra que su actividad es importante no sólo en los estadios de folículos primarios, sino también en estadios más avanzados. Almeida *et al.*, (2012), demostraron que utilizando PCR en tiempo real e inmunohistoquímica, el ARNm y la proteína FGF2 se expresan en todas las etapas de desarrollo de los folículos ováricos de cabra, lo que sugiere un papel significativo para este factor a lo largo de la foliculogénesis en esta especie. Además, FGF2 está involucrado especialmente durante el crecimiento final del folículo preovulatorio (dominante) mediante la estimulación angiogénica y la proliferación de CG (Berisha *et al.*, 2004). Los FGF pueden estar involucrados en la proliferación de capilares (angiogénesis) que acompaña a la selección del folículo preovulatorio, lo que resulta en un mayor suministro de nutrientes y precursores y, por lo tanto, apoya el crecimiento del folículo dominante (Berisha *et al.*, 2004). Además, cumple un papel importante en la angiogénesis de la nueva formación del CL (Schams y Berisha, 2004), estimulando el crecimiento de células endoteliales vasculares del CL (Neuvians *et al.*, 2004). También se ha descrito la importancia de FGF2 sobre la supervivencia celular, ya que es un regulador de la viabilidad de las células de la granulosa, evitando la apoptosis de las mismas, por acciones genómicas y agudas (Chaves *et al.*, 2012). En las acciones agudas FGF2 controla los niveles normales de calcio libre (Ca^{2+}) dentro de las células de la granulosa a través de un mecanismo dependiente de la proteína quinasa C delta (PKCd). A su vez, el PKCd activado con FGF2 regula los niveles de Ca^{2+} al estimular la salida del mismo de las células, manteniendo así la homeostasis del calcio (Peluso *et al.*, 2001; Peluso, 2003).

Por lo tanto, los factores GDF9, BMP15 y FGF2 interactúan con hormonas y metabolitos, entre los diferentes componentes del folículo, en diferentes estadios de desarrollo, con el objetivo de

generar un ovocito competente que pueda completar la meiosis, experimentar fertilización, embriogénesis y desarrollo a término (**Figura 2**).



GDF9, factor de crecimiento diferenciado 9; BMP15, proteína morfogénica del hueso; FGF2, factor de crecimiento de fibroblastos básico; CG, células de la granulosa; CT, células de la teca interna; +, estímulo; -, inhibición; HAS2, expresión de los genes hialurónico sintasa 2; COX2, ciclooxigenasa 2; Ptx3, pentraxina 3; Ptxg2, prostaglandina; GREM1, gremlin; StAR, proteína reguladora aguda; uPA, plasminógeno activador de la proteasa uroquinasa plasmínica; LHR, receptor de LH.

Figura 2: Modelo resumido del efecto de GDF9, BMP15 y FGF2 sobre las células foliculares en los diferentes estadios de desarrollo folicular.

En consecuencia, el estudio de los factores de crecimiento es fundamental para comprender la interacción de los mismos, con las diferentes estructuras que componen el folículo ovárico, así como los mecanismos de acción ejercidos sobre las diferentes etapas de la foliculogénesis. Además, la importancia de sus efectos sobre la ovulación y la fecundación. Sin embargo, no se han registrados estudios que investiguen la relación entre la expresión génica de estos factores crecimiento con las estructuras ováricas y la dinámica folicular, en células foliculares obtenidas de ovarios de vaquillonas para carne. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue estudiar la dinámica de los folículos dominantes (FD) y del cuerpo lúteo (CL) para caracterizar los patrones de dos (2W) y tres (3W) ondas foliculares y determinar la expresión génica de factores de

crecimiento (GDF9, BMP15, FGF2, TGF β , BMPR-IB, FGFR2) en células foliculares provenientes de vaquillonas con 2W y 3W.

HIPOTESIS

Existe una relación directa entre el número de ondas foliculares, las estructuras ováricas, los factores de crecimiento y sus receptores en vaquillonas para carne

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación entre el número de ondas foliculares, las estructuras ováricas, los factores de crecimiento y sus receptores, en células foliculares provenientes de vaquillonas Braford, de 26 meses de edad, con una dinámica de 2 y 3 ondas foliculares, en un establecimiento ubicado en el semiárido argentino, durante el período 2015-2018.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

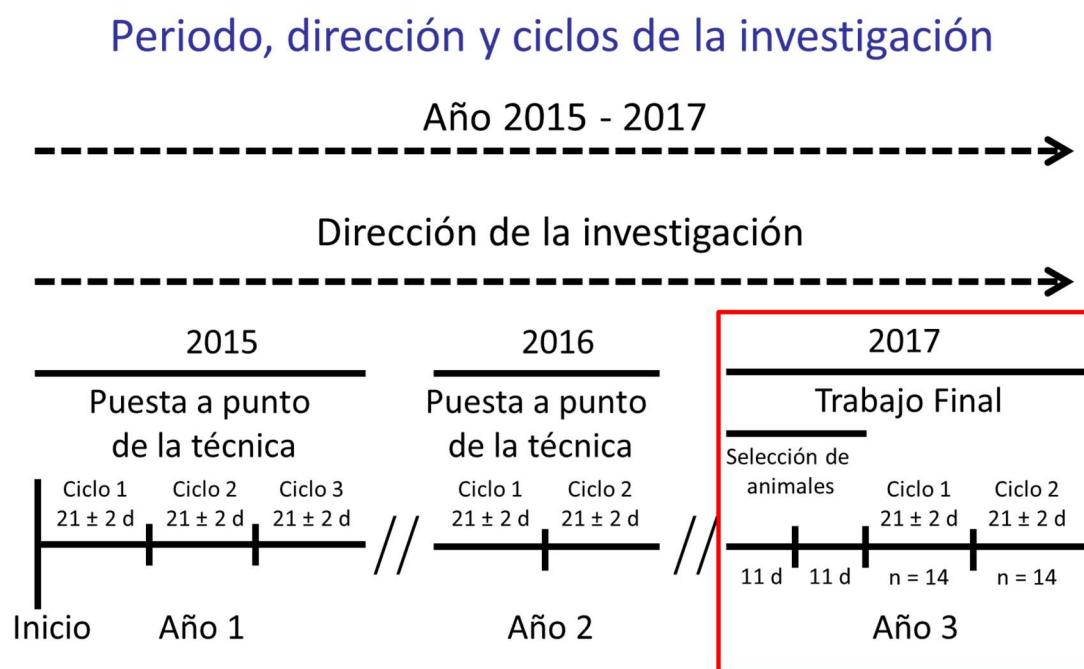
1. Establecer las diferencias morfológicas de las estructuras ováricas (folículos y cuerpo lúteo) en vaquillonas Braford de 26 meses de edad con una dinámica de 2 y 3 ondas foliculares previas a la ovulación (*in vivo*).
2. Evaluar la expresión del factor de diferenciación del crecimiento 9 (GDF9), la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15) y el factor de crecimiento básico de los fibroblastos (FGF2) y sus principales receptores: el receptor 1 del factor de crecimiento transformante beta (TGF β -R1), el receptor de la proteína morfogénica del hueso tipo IB (BMPR-IB) y el receptor del factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGFR2) en células foliculares bovinas provenientes de ovarios obtenidos de vaquillonas para carne faenadas (*ex vivo*).
3. Evaluar la expresión génica del GDF9, BMP15, FGF, TGF β -R1, BMPR-IB y FGFR2 en células foliculares (CF) obtenidas a partir de folículos preovulatorio, provenientes de vaquillonas con patrón de 2 y 3 ondas foliculares (*in vivo*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio I: Caracterizar las estructuras ováricas (folículos y cuerpo lúteo) en vaquillonas Braford de 26 meses de edad con una dinámica de 2 y 3 ondas foliculares previas a la ovulación.

Área y período de estudio.

La investigación se llevó a cabo en el Establecimiento Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), que opera en el noroeste de Argentina (La Abrita, Santiago del Estero, Argentina, 28°01'19" latitud sur, 64°13'51.6" longitud oeste, y solsticio de verano). Durante los años 2015, 2016 y 2017. En cada año de trabajo, se realizaron tres ciclos de evaluación de las variables en estudio (**Figura 3**).



Año 1 y 2: puesta a punto de la técnica ultrasonografía ovárica. Año 3, trabajo final de tesis (cuadrante rojo). Selección de animales, para determinar anomalías del tracto reproductivo y ciclicidad (estado puberal) en dos evaluaciones, con intervalos de 11 días, mediante ultrasonografía; ciclo 1 y 2 ensayo trabajo final de tesis.

Figura 3: Período y dirección del estudio I, para caracterizar las estructuras ováricas en vaquillonas con dinámica de 2 y 3 ondas foliculares, previas a la ovulación.

Diseño de la investigación.

En los estudios de determinación de FD y CL se utilizó un diseño retrospectivo, longitudinal, no experimental con dos repeticiones.

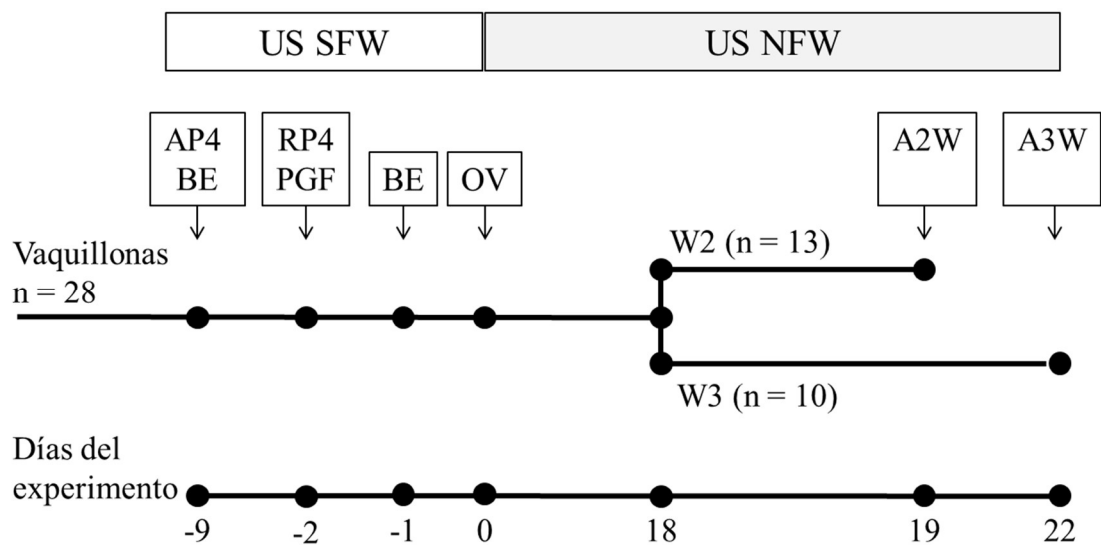
Vaquillonas.

A lo largo del estudio, los animales estaban sujetos a las normas y regulaciones del Comité de Bienestar Animal de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Se utilizaron vaquillonas Braford ($n = 28$), con edades entre 24 y 26 meses y un peso de 280 ± 2 kg (media \pm error estándar de la media [SEM]). Durante el período de estudio, las vaquillonas se mantuvieron en un corral y se alimentaron con heno de alfalfa (aproximadamente 11 kg de materia seca / día / vaquillona), agua fresca, limpia y *ad libitum*. Las anomalías del tracto reproductivo y la ciclicidad (estado puberal) se determinaron mediante la realización de dos evaluaciones a intervalos de 11 días mediante ultrasonografía. Se excluyeron del estudio las vaquillonas con anomalías anatómico - fisiológicas del sistema reproductor e irregularidades del ciclo estral ($n = 5$; una con folículo persistente, una con datos de dinámica folicular incompleta y tres vaquillonas que ovularon naturalmente). Las vaquillonas no recibieron servicio en ningún momento.

Sincronización de la ovulación.

Los días de ovulación de las vaquillonas (día 0 = día de ovulación) se sincronizaron mediante tratamiento hormonal. El día -9, las vaquillonas recibieron un dispositivo de silicona intravaginal liberador de progesterona que contenía 0.5 g de progesterona (DIB 0.5; Syntex SA, Buenos Aires, Argentina) durante 7 días, más una dosis de 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol; Syntex SA) administrada intramuscularmente (IM) al momento de la inserción del dispositivo. En el día -2, las vaquillonas recibieron 500 μ g de cloprostenol sódico (Ciclase DL; Syntex S.A.) por vía IM y se eliminaron los DIB insertos. Después de 24 horas de la remoción del dispositivo, se administró 1 mg de benzoato de estradiol IM (

Figura 4).



US NFW, ecografía diaria del FD y CL durante la onda folicular natural; AP4 + BE, aplicación de un dispositivo de silicona intravaginal liberador de progesterona que contiene 0.5 g de progesterona (DIB 0.5; Syntex SA, Buenos Aires, Argentina) durante 7 días, más una dosis de 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol; Syntex SA) IM, en la inserción del dispositivo; RP4 + PGF, eliminación del dispositivo de liberación de progesterona, más la aplicación de una dosis de 500 µg de cloprostenol sódico (Ciclase DL; Syntex S.A.); BE, administración de una dosis de 1 mg de benzoato de estradiol (BE) IM, 24 horas después de la extracción del dispositivo; OV, ovulación de la onda folicular sincronizada (día 0); 2W, vaquillonas con un patrón de dos ondas foliculares; 3W, vaquillonas con un patrón de tres ondas foliculares; A2W, aspiración del folículo dominante en vaquillonas con un patrón de dos ondas foliculares; A3W, aspiración del folículo dominante en vaquillonas con un patrón de tres ondas foliculares.

Figura 4: Métodos operativos realizados durante el período de estudio.

Ultrasonografía para determinar vaquillonas con un patrón de dos y tres ondas foliculares.

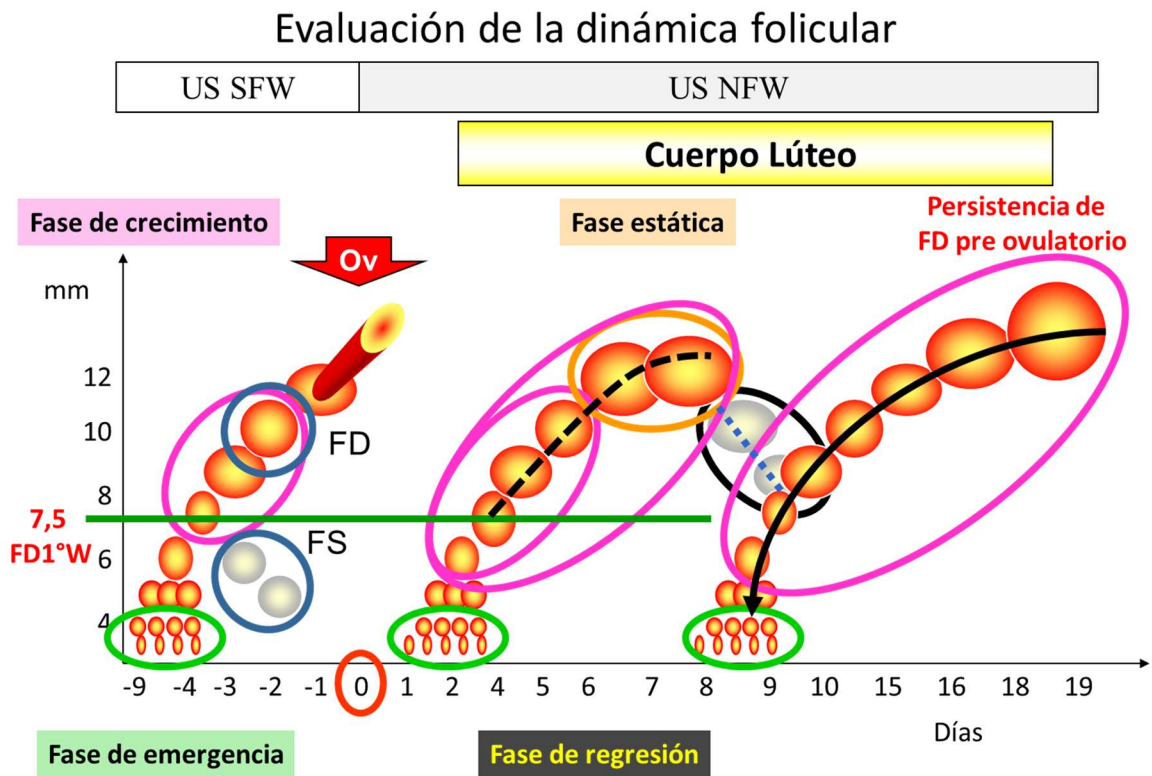
Se realizaron siete repeticiones, cinco fueron de puesta a punto de la técnica y las últimas dos para el ensayo en sí.

Los ovarios se escanearon diariamente desde el día -9 al día 21 ± 2 (

Figura 4), utilizando un escáner de ultrasonido AquilaVet con un transductor lineal de 7.5 MHz (Stuart, Florida, EE. UU. A). El patrón de onda folicular fue calificado retrospectivamente (**Figura 5**). La dinámica de la onda folicular sincronizada se evaluó desde el día -9 hasta el día 0. El primer día en el que se identificaron los folículos con un diámetro ≥ 4.5 mm se consideró la fase de emergencia. El folículo que mantuvo su crecimiento (fase de crecimiento) a lo largo del tiempo fue el FD y los folículos que detuvieron su crecimiento subordinados (FS). La desaparición del FD

preovulatorio se consideró como día de ovulación, confirmada por la formación posterior de un CL.

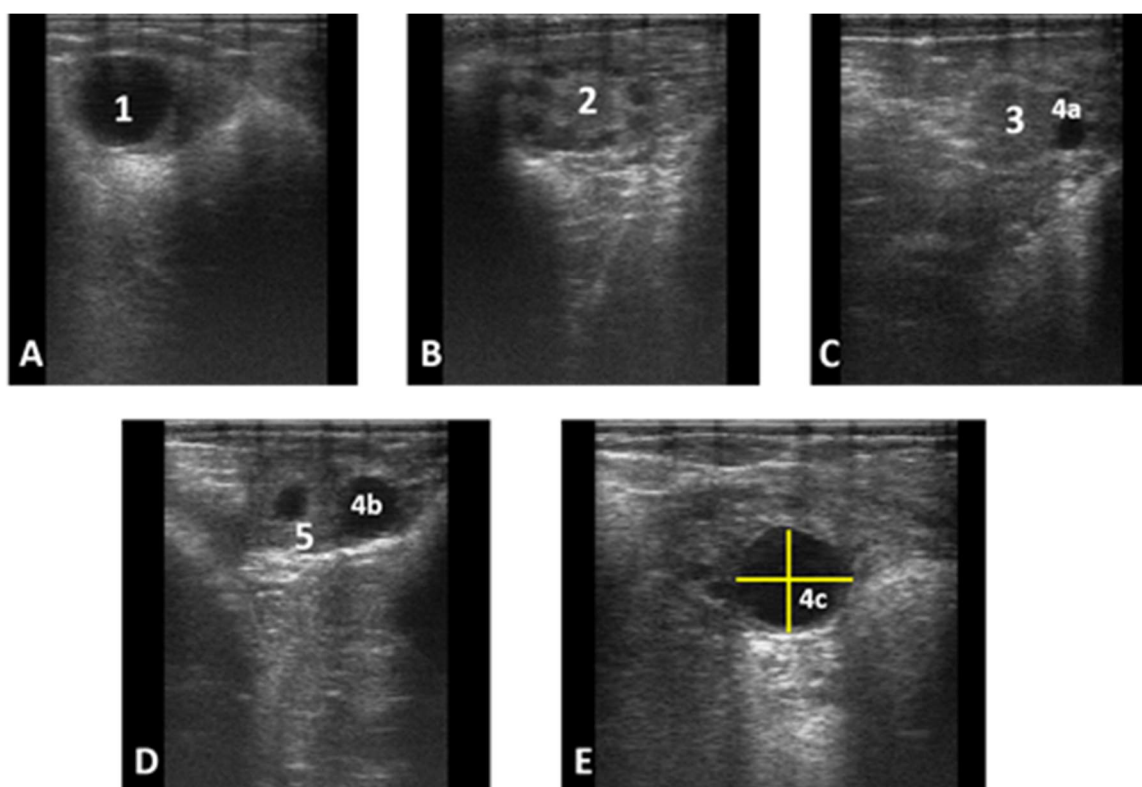
Desde el día 0 hasta el día 21 ± 2 , se caracterizaron las fases de emergencia, crecimiento, estática y regresión de las ondas foliculares, así como el desarrollo del CL (Jaiswal *et al.*, 2009). La emergencia y el crecimiento se determinaron de la misma manera en cuanto a la onda folicular sincronizada (ver arriba). La fase estática comprendió el período entre el último día de la fase de crecimiento y el primer día de la fase de regresión. La regresión se caracterizó por el primer día en que el FD comenzó una disminución progresiva del diámetro hasta que ya no se pudo identificar individualmente.



US NFW, ultrasonografía de la onda natural; círculos verdes indican fase de emergencia folicular; círculos color rosa indican fase de crecimiento; FD, folículo dominante; FS, folículo subordinado; círculos azules indican FD y FS; círculo naranja indica fase estática; círculo negro indica fase de regresión; línea verde indica inicio del período de dominancia del FD; línea negra entrecortada indica el tiempo de dominancia del FD; línea de puntos azules indican fase de regresión; flecha negra indica el tiempo de persistencia del FD preovulatorio.

Figura 5: Metodología utilizada para la caracterización de la dinámica folicular y del cuerpo lúteo.

A los efectos del análisis estadístico, se unificaron las fases de crecimiento y estáticas del FD de la primera onda. El período de dominancia del FD de la primera onda folicular se evaluó desde 7,5 milímetros hasta que comenzó la regresión (Xu *et al.*, 1995; Ginther, 2016), confirmado por medidas posteriores que mostraron un diámetro decreciente hasta que ya no se pudo identificar (**Figura 5**). Además, se evaluó la persistencia del folículo preovulatorio dominante desde el inicio de la fase de emergencia hasta el día de la punción (**Figura 6**).



A, ovario derecho: 1, folículo dominante preovulatorio de 11 mm de diámetro. B, ovario izquierdo: 2, múltiples folículos de $\geq 4,5$ mm (inicio de onda folicular, en el día 3 del ciclo estral). C, ovario derecho: 3, cuerpo lúteo de 17 mm de diámetro en el lugar donde sucedió la ovulación (día 13 del ciclo estral); 4^a, folículo dominante de la segunda onda folicular de 8 mm de diámetro (día 13 del ciclo estral). D, ovario derecho: 4^b, folículo dominante preovulatorio de la segunda onda folicular de 10,8 milímetros de diámetro (día 17 del ciclo estral); 5, cuerpo lúteo con cavidad (cavitario) de 14 milímetros de diámetro (día 17 del ciclo estral). E, folículo dominante preovulatorio de 13 milímetros de diámetro (líneas amarillas indican la metodología de medición), el cuerpo lúteo ya no puede ser identificado.

Figura 6: Imágenes de ultrasonografías transrectales de ovarios bovinos, utilizando un transductor lineal. (Imágenes de ultrasonografía, Reineri 2016).

La observación diaria de FD y CL generó imágenes que se seleccionaron en la pantalla del monitor del equipo de ultrasonido, para registrar y dibujar la posición relativa de los folículos y CL, para rastrear sus cambios durante el ciclo estral. El diámetro del FD y CL se estimó individualmente como el promedio de tres medidas horizontales y tres medidas verticales (sección medial), expresadas en milímetros, realizadas con el calibrador electrónico del software del equipo. El análisis del FD y la CL permitió la clasificación de las vaquillonas según su patrón dinámico folicular de dos (2W) (n = 13) o tres (3W) (n = 10) ondas.

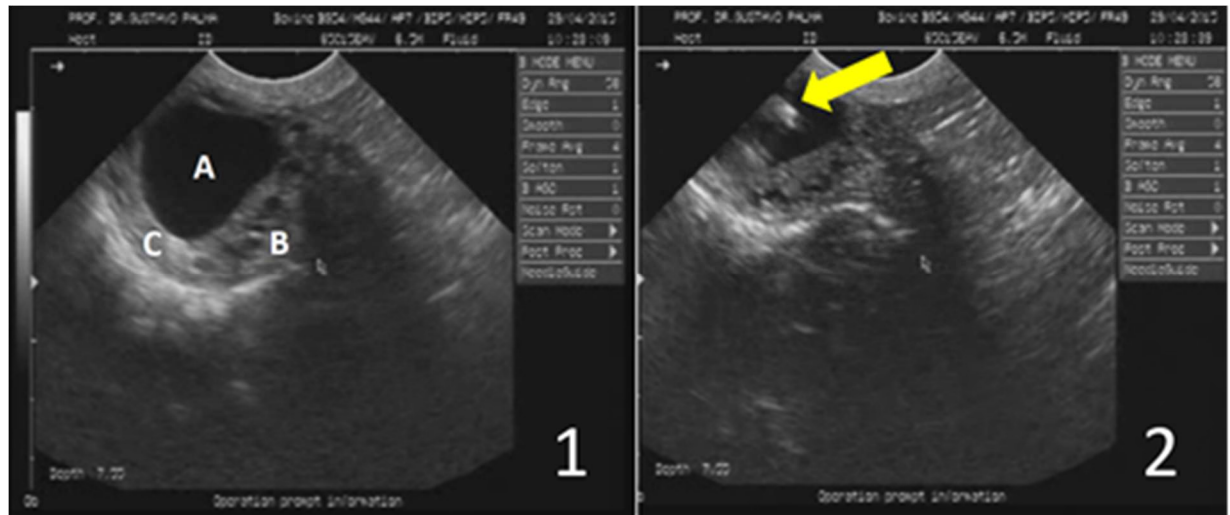
Punción y aspiración del contenido del folículo pre ovulatorio.

Los folículos preovulatorios se aspiraron el día 19 en 2W (n = 13) y el día 22 en 3W (n = 10) (

Figura 4). La determinación del día de la punción folicular se basó en un trabajo de Adams *et al.* (2008), que establece que los ciclos 2W fueron casi tres días más cortos que los ciclos 3W. La aspiración se realizó utilizando un ultrasonido (Mindray DP-6600VET, Shenzhen, China) equipado con un transductor transvaginal convexo de 7,5 MHz (modelo 65C15EA, Shenzhen, China) y una bomba de vacío (Watenabe BV-003D, Cravinhos, Brasil) conectada a una guía folicular de aspiración (Watenabe, Cravinhos, Brasil).

Antes de la punción y aspiración del contenido folicular, las vaquillonas recibieron anestesia caudal epidural (5 ml de clorhidrato de lidocaína al 2%). La región de la vulva y perineal se lavaron y se prepararon asépticamente. Cada ovario se localizó mediante palpación rectal y se colocó cerca de la cabeza del transductor de ultrasonido.

Después de identificar el FD, se alineó con la línea de punción y se aspiró, utilizando una aguja desechable y esterilizada de 20G (diámetro de 0.9 mm), 63.5 mm de largo con bisel invertido y corto conectado a la guía de aspiración del folículo y la bomba de vacío (presión de vacío de 90 a 120 mmHg y caudal de 13 ± 1 ml por minuto) (**Figura 7**).



1) Identificación del FD, se colocó el transductor para permitir la visualización del folículo: A) Estroma ovárico. B) Folículos recesivos. C) Folículo preovulatorio (tercera onda), previo a la aspiración. 2) Aspiración de contenido folicular (la flecha amarilla indica la aguja de aspiración dentro del FD).

Figura 7: Imagen ultrasonografía transvaginal de ovario, utilizando transductor convexo. (Imagen ultrasonografía, Reineri 2017).

Análisis estadístico.

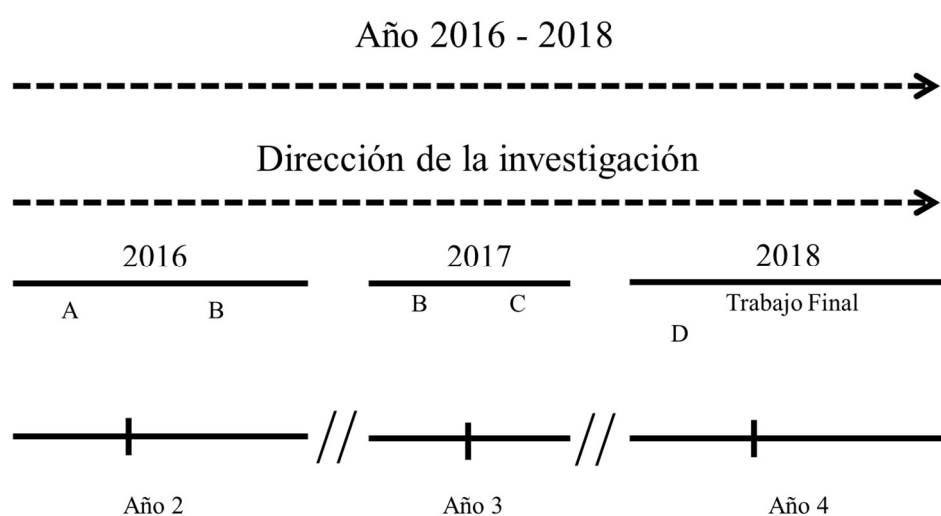
El porcentaje de vaquillonas que mostraron 2W o 3W se determinó utilizando tablas de contingencia y comparando los valores obtenidos con el estadístico de chi-cuadrada de Pearson. Se compararon los promedios de las variables de desarrollo folicular y CL entre las vaquillonas 2W y 3W utilizando la prueba t de Student, para muestras independientes. Las variables evaluadas fueron: emergencia de la primera onda folicular (días), tiempo de dominancia de la primera onda folicular (días), diámetro máximo del FD en la primera onda folicular (mm), día del diámetro máximo del FD en la primera onda folicular, inicio de la fase de regresión del FD en la primera onda folicular (día), aparición de la segunda (y tercera) onda folicular (días), persistencia del FD preovulatorio antes de la punción (días), diámetro del folículo preovulatorio en el momento de la punción (mm), diámetro máximo del CL (mm), día del diámetro máximo del CL y día de inicio de la fase de regresión del CL. El software utilizado fue InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017).

El nivel de significancia se estableció en $P \leq 0.05$ y la tendencia cuando el valor de P estuvo entre > 0.05 y < 0.10 . A menos que se indique lo contrario, los datos se presentan como media \pm SDM.

Estudio II: Expresión génica de los factores de crecimiento BMP15, GDF9, FGF2 y sus receptores en células foliculares bovinas, provenientes de ovarios obtenidos de frigorífico (*ex vivo*).

Área y período de estudio.

La determinación de la expresión génica se llevó a cabo en el Laboratorio de Producción y Reproducción Animal, del Instituto de Bionanotecnología NOA (INBIONATEC, Ruta Nacional 9 Km 1125, Villa El Zanjón, Santiago del Estero) (**Figura 8**).



Año 2: A, diseño de cebadores; B, puesta a punto de la técnica manejo de células foliculares; Año 2: B, puesta a punto de la técnica manejo de células foliculares; C, puesta a punto de la técnica extracción de ARN y puesta a punto de cebadores; Año 3, trabajo final de tesis: D, amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

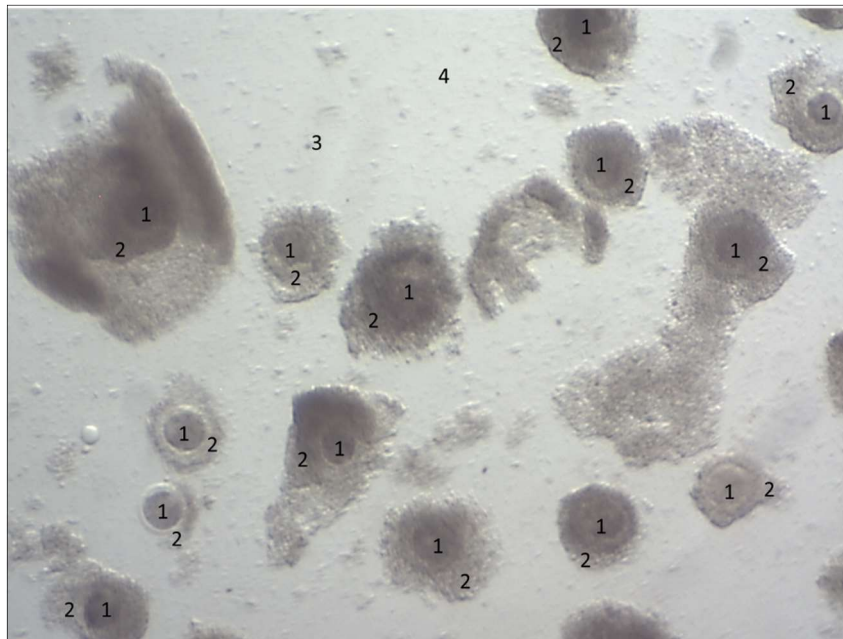
Figura 8: Período y dirección del estudio II, para realizar la expresión génica de los factores de crecimiento BMP15, GDF9, FGF2 y sus receptores en células foliculares bovinas, provenientes de ovarios obtenidos de frigorífico (*ex vivo*).

Diseño de la investigación

En los estudios de expresión de los factores de crecimiento y sus receptores se utilizó un diseño prospectivo, transversal, no experimental, con tres repeticiones.

Animales y células foliculares

El manejo los animales, previo y durante la faena estuvo sujeto a las normas y cuidados descritos en el Diario Oficial de la Unión Europea (European Union 2009). Se recolectaron 70 ovarios de 96 vaquillonas para carne, sacrificadas en un frigorífico regional (Forres- Beltrán S.A, Ruta Nacional N°34 – Km 698.500, Forres, Santiago del Estero). Se seleccionaron ovarios sanos con morfología normal y sin cuerpo lúteo, durante los meses de noviembre-diciembre de 2015 y enero-julio de 2016. Los ovarios se colocaron en una solución de PBS a 37°C y fueron trasladados al laboratorio dentro de las 2 horas de su recolección. Los complejos ovocitos cumulus (COCs) se recuperaron mediante aspiración manual de folículos antrales (≤ 6 mm de diámetro), utilizando jeringas de 10 ml con agujas de 40 x 1.2 mm (18 G) y se colocaron en un tubo estéril de fondo cónico de 50 ml conteniendo PBS. Los tubos se mantuvieron a 37°C durante 15 minutos para la sedimentación de los COCs. El sedimento se diluyó con tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (PBS) y se examinó para identificar los COCs bajo lupa estereoscópica (**Figura 9**).



1. Ovocitos; 2. Células de la granulosa del cumulus; 3. Células de la granulosa libres (murales y de cumulus), 4. Líquido folicular. (Fotografía: Reineri *et al.*, 2017).

Figura 9: Células foliculares recuperadas mediante aspiración manual de folículos antrales (≤ 6 mm de diámetro).

La clasificación de los COCs aspirados se basó en la apariencia morfológica de los cumulus celulares y la homogeneidad del ooplasma, según lo descrito por de Loos *et al.* (1989). Grupos de 30 COCs cualitativamente buenos (Grado 1 y Grado 2) fueron separados de las células del cumulus mediante el efecto mecánico del pipeteo repetido y luego se recuperaron (**Figura 10**).



1. Ovocitos; 2. Zona pelúcida; 3. PBS; 4. Células de la granulosa.

Figura 10: Ovocito separado de las células del cumulus mediante el efecto mecánico del pipeteo repetido. (Fotografía: Reineri *et al.*, 2017).

Posteriormente, se formaron 3 grupos de 30 ovocitos y 3 grupos de células del cumulus, obtenidos de los 30 ovocitos. El líquido folicular, se centrifugó a 12.000 xg durante 10 min a 4°C, obteniendo 3 sedimentos compuestos por células granulosas y células de la teca interna (PCs). Todas las muestras se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Extracción y purificación del ácido ribonucleico (ARN) total en células foliculares y ovocitos

El ARN total se extrajo de muestras de células foliculares siguiendo el método de Fenol-Cloroformo, utilizando TriReagent® (Sigma) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Brevemente, las muestras se homogeneizaron con 250 µl de TriReagent®, luego se añadieron 50 µl de cloroformo y se mezclaron durante 15 segundos, seguido de una centrifugación a 12.000 xg

durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa superior, que contiene ARN, se transfirió a un nuevo tubo y se añadió isopropanol. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugaron a 12.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento de ARN se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 7.500 xg durante 5 minutos a 4°C. Las muestras de ARN total fueron suspendidas en H₂O libre de ribonucleasas y la concentración e integridad de ARN fueron evaluadas por absorbancia a 260 nm, utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000c UV-Vis (Thermo Scientific, EE.UU.) y electroforesis en geles de agarosa teñidos Sybr Green (Biotium). Antes de la síntesis de ADN complementario (ADNc), se realizó un tratamiento con DNasa (AMPD1- Sigma). La transcripción inversa se realizó utilizando SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Cada 20 µL de reacción se agregaron 1 µl de Oligo dT (50 µM), 1 µl de dNTPs, 4 µl de 5X First Strand Buffer, 1 µl de 0.1 M DTT, 40 unidades de RNAsin (Genbiotech), 200 unidades de transcriptasa reversa, un volumen de RNA (1.200 ng), y agua libre de nucleasas para completar el volumen final. La mezcla se mantuvo a 50°C durante 1 hora y 15 minutos a 70°C antes de enfriarla en hielo. Finalmente, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

Diseño de cebadores

Teniendo en cuenta las secuencias recientemente publicadas por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y la base de datos de la secuencia del genoma bovino, se diseñaron cebadores específicos para amplificar las regiones codificadoras de genes bovinos GDF9, BMP15, FGF2, TGFβR1, BMPRII y FGFR2 utilizando el software en línea Primer-BLAST e Integrated DNA Technologies (IDT) (**Tabla 1**). Además, se determinó la calidad y pureza de las muestras utilizadas, con cebadores específicos GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), para ovocitos (ZAR1: detención de cigoto-1), células granulosas (CYP19A1: citocromo P450, familia 19, subfamilia A, polipéptido 1) y células de la teca interna (CYP17A1: citocromo P450, familia 17, subfamilia A, polipéptido 1), como se sugirió en el estudio de Hatzirodos *et al.*, (2015).

Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado, utilizando ácido ribonucleico complementario (ADNc), tanto de células foliculares como de ovocitos. Para llevar a cabo las reacciones, se prepararon mezclas que contenían 10 µM de cada cebador, 0,2 mM de cada desoxirribonucleótidos

trifosfato (dNTP), 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Genbiotech) y solución tampón de reacción 10X (Tris-HCl 10 mM; KCl 50 mM; Tritón X-100 0,1%; MgCl₂ 2 mM, pH: 9,0) en un volumen final de 20 µl. El programa de amplificación utilizado consistió en un paso de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación que consistieron en un paso de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55 - 61 °C (dependiendo del gen en estudio, ver tabla 2) durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 30 segundos y finalmente un período de 7 minutos a 72°C. Se incluyeron como controles negativos y para excluir la contaminación con ADN genómico, reacciones sin ADNc y sin transcriptasa inversa (RT). La especificidad de los productos de PCR fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa y secuenciación.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para ensayos de PCR en tiempo real (qPCR).

Nombre ¹	Cebadores ²
<i>GDF9</i>	F: TGCACCTGTCTATGCCTTTG R: AACATTTGGCCATGAGGAAG A: 157; AN: XM_010807219.1
<i>BMP15</i>	F: TCAGGAAGAGGCTCCTCAA R: CCACCAGAACTCACGAACCT A: 168; AN: NM_001031752.1
<i>FGF2</i>	F: AAGCGGCTGTACTGCAAGAA R: GTAGTTTGATGTGTGGGTCGC A: 100; AN: NM_174056.4
<i>TGFβ-R1</i>	F: GATTCGGCCACGGATACAA R: GTCGAGCTACTTCCCAGAATAC A: 110; AN: NM_174621.2
<i>BMPIB</i>	F: TTTGGGAGGTCGCTAGGAGA R: GCCGCAGCTTCTTGATACAC A: 132; AN: XM_005207720.2
<i>FGFR2</i>	F: ATGTCGCTTATCGAGCCACC R: GCGTGGCACCTTTTATCTGC A: 199; AN: XM_010820098.2
<i>CYP19A1</i>	F: GTGTCCGAAGTTGTGCCTATT R: GGAACCTGCAGTGGGAAATGA A: 148; AN: NM_174305.1
<i>CYP17A1</i>	F: ACCATCAGAGAAGTGCTCCGAA R: CCACAACGTCTGTGCCTTTGT A: 115; AN: NM_174304.2
<i>ZAR1</i>	F: TGCCGAACATGCCAGAAG R: TCACAGGATAGGCGTTTGC A: 169; AN: NM_001076203
<i>RPLP0</i>	F: CAACCCTGAAGTGCTTGACAT R: AGGCAGATGGATCAGCCA A: 226; AN: NM_001012682
<i>GAPDH</i>	F: AGATGGTGAAGGTCGGAGTG R: GAAGGTCAATGAAGGGGTCA A: 117; AN: NM_001034034

¹ Identificadores abreviados de transcripción de ARNm para GDF9: factor de diferenciación del crecimiento; BMP15: proteína morfogenética ósea 15; FGF2: factor de crecimiento del fibroblasto 2; TGFBR1: factor de crecimiento transformante, receptor beta 1; BMPRII: receptor de proteína morfogenética ósea, tipo 1B; FGFR2: Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos; CYP19A1: citocromo P450, familia 19, subfamilia A, polipéptido 1; CYP17A1: citocromo P450, familia 17; ZAR1: cigoto arrest-1.

² Detalles de los cebadores específicos utilizados: F: secuencia del cebador directo (5' a 3'), R: secuencia del cebador inverso (5' a 3'), A: longitud del amplicón en pares de bases y AN: Número de acceso. Adaptado y modificado de (Reineri *et al.*, 2018).

Estudio III: Expresión génica de los factores de crecimiento GDF9, BMP15, FGF2 y sus receptores en células foliculares bovinas, provenientes de ovarios de vaquillonas con patrón de 2 y 3 ondas foliculares (*in vivo*).

Área y período de estudio.

La determinación de la expresión génica se llevó a cabo en el Laboratorio de Producción Animal del Instituto de Bionanotecnología NOA (INBIONATEC, Ruta Nacional 9 Km 1125, Villa El Zanjón, Santiago del Estero).

Diseño de la investigación.

La expresión de los factores de crecimiento y sus receptores se utilizó un diseño prospectivo, transversal, no experimental, con ocho repeticiones.

Animales y obtención de células foliculares.

Ver sección estudio I.

Pellet de células foliculares.

El contenido folicular se observó con una lupa y se eliminaron los complejos cumulus-ovocitos; el fluido folicular (FF) se centrifugó a 12.000 xg, durante 10 minutos a 4° C. Se obtuvieron 23 pellets de CF de FD preovulatorio (2W, n = 13 y 3W, n = 10). Todas las muestras se sumergieron en nitrógeno líquido a -196 ° C durante 20 segundos y se almacenaron a -80° C hasta su posterior análisis.

Extracción y purificación de RNA total a partir de células foliculares.

Se utilizaron aleatoriamente 16 pellets de células foliculares individuales (2W, n = 8 y 3W, n = 8), cada pellet de células representa un folículo aspirado. El ARN total se extrajo de las muestras de CF siguiendo el método de fenol-cloroformo usando TriReagent® (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN total se suspendieron en H₂O sin ribonucleasas, la concentración y la integridad del ARN se evaluaron mediante absorbancia a 260 nm utilizando

el espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EE. UU.) y electroforesis en geles de agarosa teñidos con Sybr Green (Biotium). Las muestras fueron tratadas con la enzima ADNsa (AMPD1- Sigma) para evitar cualquier potencial contaminación con ADN genómico. El ARN se incubó 15 min a temperatura ambiente con el buffer de reacción 10X y la ADNsa I. Posteriormente se agregó la solución STOP y se calentó a 70°C por 10 minutos. A partir del ARN total se procedió a sintetizar el ADNc correspondiente, realizando para ello una transcripción reversa. La síntesis se realizó con la enzima SuperScriptIII (Invitrogen) y el cebador oligo dT. Para llevar a cabo la síntesis de ADNc se utilizaron 1,2 µg de ARN total de cada muestra. Se agregó 1 µl de oligo dT, 1 µl dNTPs y H₂O estéril hasta completar el volumen de 13 µl. La mezcla se llevó al termociclador a 65°C por 5 minutos, seguido de una incubación en hielo durante 1 minuto. A continuación, se añadieron 4 µl del Buffer 5X, 1 µl de DTT 0.1 M, 0,5µl RNAsin y 1 µl de la enzima Super Script III RT. Se incubó a 50°C por 60 minutos, seguidos de 15 minutos a 70°C. Las muestras fueron almacenadas y conservadas a -80°C hasta su posterior análisis.

Diseño de cebadores.

Ver sección estudio II.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

Los factores de crecimiento GDF9, BMP15, FGF2 y sus principales receptores: el factor de crecimiento transformante receptor beta 1 (TGFβR1), el receptor de proteína morfogenética ósea, tipo IB (BMPRII) y el factor de crecimiento de fibroblastos receptor (FGFR2) se evaluaron utilizando qPCR. Los cebadores se detallan en la **Tabla I**. Los genes de referencia utilizados en el presente estudio fueron la proteína grande 0 de la proteína ribosomal (RPLP0) y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que también figuran en la **Tabla I**. Además, la calidad y la pureza de las muestras utilizadas se determinaron con cebadores específicos de ovocitos (ZAR1: cigoto arrest-1), células de granulosa (CYP19A1: citocromo P450, familia 19, subfamilia A, polipéptido 1) y células de teca interna (CYP17A1: citocromo P450, familia 17, subfamilia A, polipéptido 1) según lo sugerido por otros autores (Hatzirodos *et al.*, 2015). Se validó previamente la eficiencia de los cebadores para la expresión de GDF9, BMP15, FGF2, TGFβ-R1, BMPRII, FGFR2. La especificidad de los productos de PCR se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Las reacciones en cadena de la polimerasa se realizaron en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA) con un volumen final de 10 μ L, que contenían 3 μ L de ADNc [dilución 1: 3], 0.25 mM de cebadores directos e inversos, y 5 μ L de iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). El programa de PCR consistió en un paso inicial de 5 minutos a 95° C, seguido de 49 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95° C, 30 segundos de hibridación de los cebadores a 58 – 61 °C (dependiendo del gen en estudio, ver Tabla 2) y 30 segundos de extensión a 60° C. Para excluir la posibilidad de contaminación del ADN genómico y como controles negativos, se incluyeron dos controles, uno sin ADNc molde y otro con muestras sin retro transcripción. Además, se realizaron ocho repeticiones biológicas, y el valor del umbral del ciclo medio (Ct) de cada repetición se obtuvo de un triplicado técnico.

Análisis estadístico.

El análisis de la expresión génica se midió según lo propuesto por Mberema *et al.* (2016). El cambio de un gen diana se expresó en muestras normalizadas con genes de referencia. Para cada muestra, las media aritméticas de sus réplicas técnicas los valores de Ct se convirtieron en valores de cuantificación relativos (Q) siguiendo la fórmula delta-Ct $Q = E^{-\Delta Ct}$, donde E es la eficiencia del gen objetivo y ΔCt es la diferencia entre el Ct valor medio del gen diana en control y muestra. Estos valores de Q se dividieron por el valor del factor de normalización (NF) para obtener el nivel de ARNm normalizado de un gen objetivo específico. El valor de NF se derivó de la media geométrica de los valores de Q de los genes de referencia seleccionados (Vandesompele *et al.*, 2002; Bustin, 2004). Los resultados se compararon utilizando la prueba t de Student's para muestras independientes y se expresaron como valores de cambio de pliegue con desviación estándar de la media (SDM). Para cada cebador, la eficiencia de la PCR y el R^2 se calcularon a partir de la pendiente de la curva mediante el trazado de los valores de Ct frente a la concentración de ADNc, mediante la siguiente fórmula: $E = 10^{(-1 / \text{pendiente}) - 1} * 100$. Todo el estudio se llevó a cabo siguiendo las pautas de Información mínima para la publicación de experimentos cuantitativos de PCR en tiempo real (Bustin *et al.*, 2009).

El nivel de significancia se estableció en $P \leq 0.05$ y la tendencia cuando el valor de P estuvo entre > 0.05 y < 0.10 . A menos que se indique lo contrario, los datos se presentan como media \pm SDM.

RESULTADOS

Estudio I.

El patrón 2W se observó en 13/23 (56,5%) y el de 3W en 10/23 (43,5%) ($P = 0,53$). La dinámica del FD y el CL en vaquillonas con 2W y 3W se representan en la **Figura 11**.

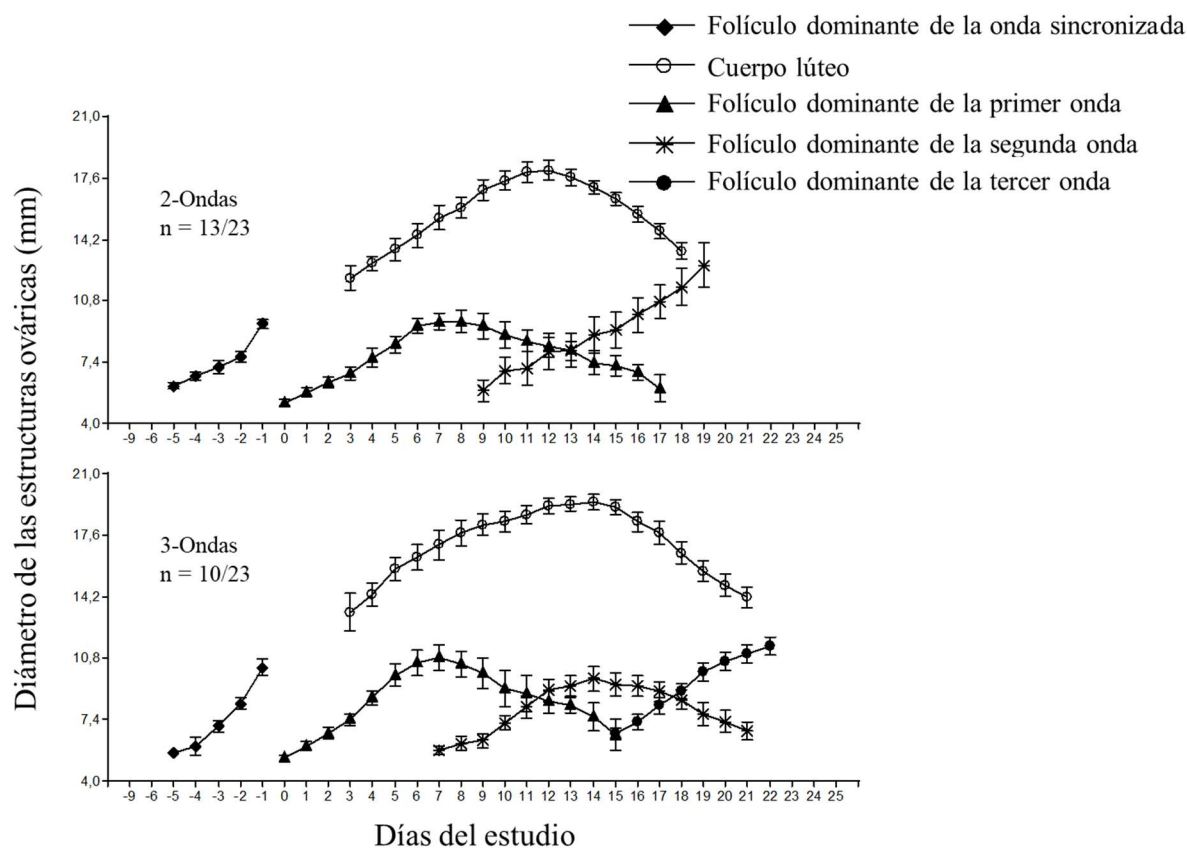


Figura 11: Perfil de diámetro promedio de los folículos dominantes de la onda sincronizada (desde el día -5 hasta el día -1). Perfil de diámetro promedio de los folículos dominantes (primera, segunda y tercera ondas foliculares) y la CL (desde el día 0 hasta el día 22) en vaquillonas con 2 y 3 patrones de ondas foliculares. (Día 0 = ovulación).

Los datos obtenidos de la dinámica folicular y del cuerpo lúteo en vaquillonas con 2W y 3W se describen en la **Tabla 2**. El día de emergencia de la primera onda folicular en vaquillonas 2W y 3W fueron observados después de la ovulación. El período de dominancia del FD de la primera onda manifestó una tendencia estadística, permaneciendo 2 días más en 2W ($P = 0,06$). El diámetro máximo del FD de la primera onda folicular fue de $10,5 \pm 2,1$ mm en el día $8,5 \pm 1,9$ en 2W y de $11,5 \pm 1,9$ mm en el día $7,4 \pm 1,3$ en 3W, no se observaron diferencias en el diámetro ($P = 0,26$).

ni en el día de diámetro máximo ($P = 0,13$). La regresión del FD de la primera onda folicular comenzó 2 días antes en vaquillonas 3W ($P = 0,02$). En este sentido, la fase de emergencia del FD de la segunda onda folicular se observó tres días antes en las vaquillonas 3W que en las 2W ($P < 0,01$). La emergencia del FD apareció en el día $16,2 \pm 1,0$ en las vaquillonas 3W (**Figura 11**).

En el momento de la punción folicular, en los días 19 y 22 en las vaquillonas 2W y 3W respectivamente, no se observaron diferencias en el diámetro del FD preovulatorio ($P = 0,67$). Sin embargo, el folículo preovulatorio tendió a permanecer más tiempo antes de la aspiración folicular en el grupo 2W ($P = 0,09$).

Por otro lado, se observó una tendencia estadística de mayor diámetro máximo de CL en las vaquillonas 3W en comparación con las 2W ($P = 0,08$). Además, el diámetro máximo se observó en el día $11,9 \pm 0,9$ en el 2W y en el día $13,3 \pm 1,1$ en el grupo 3W ($P < 0,01$). También, en las vaquillonas 2W, la regresión de la CL comenzó $1,4 \pm 0,1$ días antes que en el grupo 3W ($P < 0,01$).

Tabla 2. Medias \pm de las características foliculares y del cuerpo lúteo en vaquillonas con 2W vs. 3W.

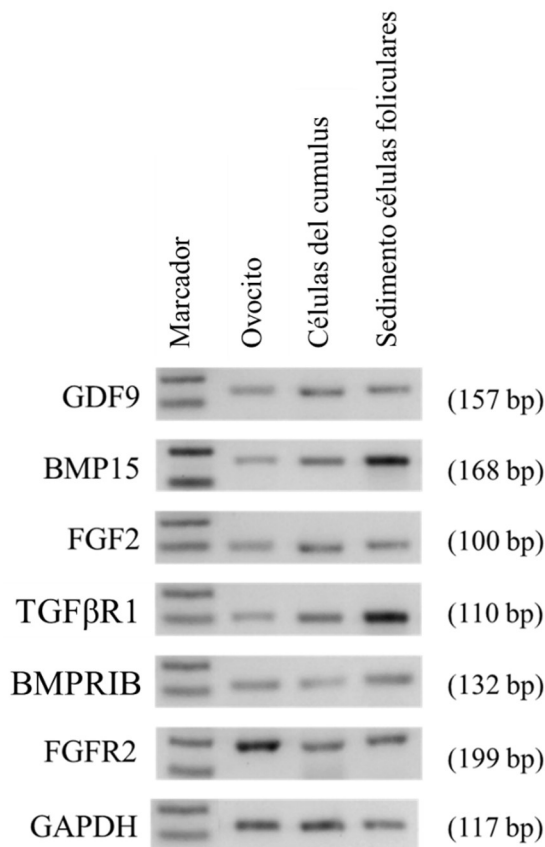
Ítems	Grupos ¹		p-valor
	2W (n = 13)	3W (n = 10)	
Día de emergencia de la primer onda folicular (días) ²	0,5 \pm 0,8	0,6 \pm 0,8	0,69
Días de dominancia del folículo dominante de la primer onda folicular (días) ²	6,8 \pm 1,9	5,1 \pm 2,0	0,06
Máximo diámetro del folículo dominante de la primer onda folicular (mm)	10,5 \pm 2,1	11,5 \pm 1,9	0,26
Día del máximo diámetro del folículo dominante de la primer onda folicular (días) ²	8,5 \pm 1,9	7,4 \pm 1,3	0,13
Inicio de la fase de regresión del folículo dominante de la primer onda folicular (días) ²	10,6 \pm 2,2	8,7 \pm 1,3	0,02
Día de emergencia de la segunda onda folicular (días) ²	11,2 \pm 2,0	8,3 \pm 1,2	< 0,01
Diámetro del folículo preovulatorio, al momento de la punción (mm)	12,5 \pm 4,0	11,9 \pm 2,1	0,67
Persistencia del folículo preovulatorio, antes de la punción (días) ²	8,1 \pm 1,4	7,1 \pm 1,1	0,09
Máximo diámetro del cuerpo lúteo (mm)	18,5 \pm 1,6	19,7 \pm 1,4	0,08
Día del máximo diámetro del cuerpo lúteo (días) ²	11,9 \pm 0,9	13,3 \pm 1,1	< 0,01
Inicio de la fase de regresión del cuerpo lúteo (días) ²	13,0 \pm 1,0	14,3 \pm 1,0	< 0,01

¹ Grupos: 2W, vaquillonas con dos patrones de ondas foliculares; 3W, vaquillonas con tres patrones de ondas foliculares.

² Día 0 = ovulación.

Estudio II.

Usando RT-PCR, este trabajo demostró la presencia de ARNm de GDF9, BMP15, FGF2, TGF β R1, BMPRIIB y FGFR2 en ovocitos, células del cumulus, sedimento de células foliculares (células de granulosa y teca interna) provenientes de folículos antrales de ≤ 6 mm de diámetro. Para todos los ARNm estudiados, fue posible obtener un solo amplicón del tamaño esperado (**Figura 12**).



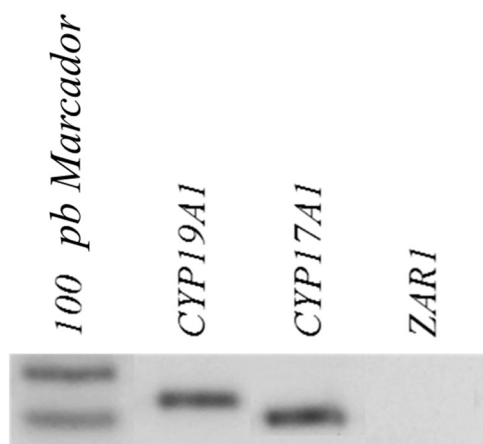
Los tipos de células se indican en la parte superior, cada gen en el marco izquierdo de la figura y en la derecha el peso molecular de cada uno de ellos. Se incluyó un marcador de cien pares de bases para estimar el tamaño del fragmento. GDF9: factor de diferenciación del crecimiento, BMP15: proteína morfogenética ósea 15, FGF2: factor de crecimiento fibroblástico 2, TGF β R1: factor de crecimiento transformante, receptor beta 1, BMPRIIB: receptor de proteína morfogenética ósea, tipo 1B, FGFR2: receptor del factor de crecimiento fibroblástico 2.

Figura 12: Expresión de GDF9, BMP15, FGF2, TGF β -RI, BMPR-IB, FGFR2 y GAPDH en diferentes tipos de células en ovarios bovinos. Adaptado y modificado de (Reineri *et al.*, 2018)

Para descartar una posible contaminación cruzada cuando se aisló cada tipo de célula, se realizó una RT-PCR con cebadores específicos. La expresión del ARNm del gen CYP19A1 solo se detectó en el cumulus y el sedimento de células foliculares, el gen CYP17A1 se detectó solo en el sedimento de células foliculares. Finalmente, las transcripciones de ZAR1 se detectaron solo en el molde de ADNc de los ovocitos, pero no en la plantilla de ADNc de las células de cumulus y el sedimento de células foliculares.

Estudio III.

Se evaluó la pureza del sedimento de las CF y se determinó la presencia de células de la granulosa (CYP19A1) y de la teca interna (CYP17A1). Además, los sedimentos estaban libres de ovocitos, ya que el factor ovárico ZAR1 no se expresaba en las muestras (**Figura 13**).



Se muestran las bandas de 100 y 200 pares de bases (pb). CYP17, (17 a-hidroxilasa) citocromo P450, familia 17, subfamilia A, polipéptido 1; CYP19, (aromatasa) citocromo P450, familia 19, subfamilia A, polipéptido 1; ZAR1, detención de cigoto-1.

Figura 13: Expresión de los genes CYP19A1, CYP17A1 y ZAR1 en sedimentos de células foliculares. Se incluyó un marcador de cien pares de bases para estimar el tamaño del fragmento.

Los datos de expresión génica se presentan en la **Tabla 3**, como una relación de tasa de cambio (FC, Fold-change) que tiene como referencia al grupo 2W. La expresión génica de los factores de crecimiento y sus receptores principales no mostró diferencias significativas entre las vaquillonas 2W y 3W.

Tabla 3. Nivel de ARNm de los factores de crecimiento GDF9, BMP15 FGF2 y sus receptores TGFBR1, BMPR1B y FGFR2.

Gen ¹	FC ²	SEM ³	p-valor
GDF9	0,18	0,28	0,107
TGFβ-R1	0,05	0,37	0,496
BMP15	0,02	0,47	0,076
BMPR-IB	2,31	1,06	0,371
FGF2	0,80	0,39	0,165
FGFR2	0,28	0,24	0,494

¹ Gen, GDF9: factor de diferenciación del crecimiento, BMP15: proteína morfogenética ósea 15, FGF2: factor de crecimiento fibroblástico 2, TGFBR1: factor de crecimiento transformante, receptor beta 1, BMPRIB: receptor de proteína morfogenética ósea, tipo 1B, FGFR2: receptor del factor de crecimiento fibroblástico 2.

² FC, Fold-change (tasa de cambio), normalizado contra los genes de referencia GAPDH y RPLP0.

³ Desviación estándar de la media.

Sin embargo se observó una tendencia para BMP15 (FC = 0,02, P = 0,076), manifestando niveles relativos más altos en el grupo 2W.

DISCUSIÓN

La presente tesis doctoral ha permitido complementar información *in vivo*, respecto a los efectos de la dinámica de las estructuras ováricas y a la cuantificación génica de los factores de crecimiento en células foliculares, sobre el número de ondas foliculares presentes en un ciclo estral en vaquillonas para carne (estudios I y III). Específicamente, el tiempo de permanencia del FD de la primera onda folicular y los niveles de BMP-15 en células foliculares provenientes del folículo dominante preovulatorio. Ambas causas, podrían explicar el posible efecto sobre la vida media del CL, que determinará el número de ondas foliculares manifestadas por ciclo estral. Además, incrementar el conocimiento actual, sobre los factores de crecimiento y su expresión génica en células foliculares, provenientes de ovarios obtenidos de vaquillonas para carne (*ex vivo*, estudio II).

La proporción de vaquillonas con 2W o 3W observada en el presente trabajo fue similar a otros estudios (Ginther *et al.*, 2013), en los cuales no se observaron diferencias en la cantidad de vaquillonas con 2 o 3 ondas foliculares. Sin embargo, otros trabajos mostraron una mayor probabilidad de aparición de 2W (Townson *et al.*, 2002) o 3W (Rhodes *et al.*, 1995). Posiblemente, estas divergencias están asociadas a la raza, edad y propósito de los animales estudiados.

En el presente estudio, la duración de la fase de dominancia del FD en la primera onda folicular fue más larga y el inicio de la fase de regresión del FD fue más tardía en 2W que en 3W, lo que provocó el retraso en la aparición de la segunda onda folicular en 2W. Además, la regresión del CL comenzó antes en el grupo 2W que en el grupo 3W, similar a los resultados descritos por otros autores (Adams *et al.*, 2008; Jaiswal *et al.*, 2009; Ginther y Bashir, 2013; Ginther *et al.*, 2014).

Entre los factores que determinan el patrón 2W o 3W, se describen la duración de la fase lútea, así como el inicio temprano de la luteólisis (Adams *et al.*, 2008), la concentración de progesterona y FSH (Ginther *et al.*, 2013, Ginther, 2014) y el papel regulador del FD de la primera onda folicular (Jaiswal *et al.*, 2009; Reineri *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos en este presente trabajo de tesis, en lo que respecta a la dinámica del FD de la primera onda folicular, apoyan la hipótesis de las causas que determinan el patrón de número de ondas foliculares por ciclo estral. En este sentido, la vida media más larga del FD de la primera onda, retrasará el pico FSH y, posteriormente, la aparición de la segunda onda. Además, la prolongada fase estrogénica del FD de la primera onda ejerce un efecto negativo en la vida de CL (Villa-Godoy *et al.*, 1985). Por el contrario, los períodos de breve dominancia del FD de la primera onda folicular aumentan la proporción del número de ondas foliculares (Berman, 1995; Wolfenson *et al.*, 2000).

Sin embargo, no sólo los factores endocrinos son responsables de coordinar la foliculogénesis, ya que investigaciones anteriores sugieren que, durante el desarrollo folicular, las CF sintetizan y acumulan ARN y proteínas que son necesarias para su crecimiento y maduración (Sánchez *et al.*, 2009). En este sentido, las células de la granulosa de los folículos primordiales, folículos secundarios, el desarrollo pre-antral y antral temprano son dependientes de factores de transcripción génica y factor de crecimiento (Braw-Tal y Roth, 2005). Concomitantemente, estudios previos sugieren que los niveles de ARNm de GDF9 y BMP15 en CF podrían usarse como biomarcadores para predecir el potencial de desarrollo de los ovocitos (Wu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014). Los factores de crecimiento GDF9 y BMP15 contribuyen a la proliferación de las células de la granulosa, estimulando la mitosis y contribuyendo a su diferenciación, desde los folículos primordiales a las etapas antrales (Sharma *et al.*, 2010; Hosoe *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014). De allí la importancia de detectar la expresión y cuantificación de estos factores de crecimiento en las diferentes células que componen el folículo ovárico y observar su relación con el número de ondas foliculares.

En el presente trabajo, la expresión génica de los factores de crecimiento y sus principales receptores fue similar en las células foliculares de los folículos preovulatorio de vaquillonas con diferente número de ondas foliculares en un ciclo estral. Posiblemente, porque estos factores tienen una acción importante en las primeras etapas de crecimiento y del desarrollo folicular (Silva *et al.*, 2004). Sin embargo, se observó una tendencia en los niveles relativos de ARNm de BMP15, que denota una mayor expresión en el grupo 2W que en el grupo 3W (Reineri *et al.*, 2020). Este hallazgo, podría influir en la vida más corta del CL en el grupo 2W. Como está descrito, BMP15 puede inhibir la biosíntesis de progesterona inducida por FSH, ya que puede inhibir las acciones de FSH, al suprimir la expresión del receptor de la hormona estimulante del folículo (FSHR) en células de granulosa de rata (Shimasaki *et al.*, 2004; Moore y Shimasaki, 2005; Otsuka *et al.*, 2011). En consecuencia, se inhiben las vías bioquímicas que eventualmente conducen a la síntesis de progesterona por las células granulosas. Por lo tanto, la proteína reguladora aguda esteroideogénica (StAR), la enzima de escisión de la cadena lateral P450 (P450_{scc}), la deshidrogenasa de 3β-hidroxiesteroide (3β-HSD), el receptor LH y las subunidades de inhibina / activina (α, βA y βB) también son inhibidas por BMP15 (Shimasaki *et al.*, 2004; Moore y Shimasaki, 2005; Otsuka *et al.*, 2011).

Otro tema importante de discusión, es la expresión de los factores de crecimiento estudiados en células foliculares obtenidas de ovarios provenientes de vaquillonas faenadas para carne. Al comparar especies que manifiestan ciclos estrales incompletos (ratones, ratas) con animales de ciclos estrales completos (humanos, cabras, cerdos y vacas), el GDF9 y el BMP15 aparecen en

diferentes tejidos. La expresión de ARNm de los factores de crecimiento transformantes-beta estudiados fueron detectados exclusivamente en ovocitos de roedores (Mester *et al.*, 2015). Mientras que, en otras especies, incluyendo humanos (Li *et al.*, 2014), cabras (Pan *et al.*, 2015), ovejas (Kona *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016), cerdos (Paradis *et al.*, 2009) y vacas (Hosoe *et al.*, 2011; Reineri *et al.*, 2018) se expresaron en células del cumulus, así como en ovocitos (Hosoe *et al.*, 2011; Reineri *et al.*, 2018). De acuerdo con otros autores, estas diferencias podrían explicarse por las divergencias en las formas fisiológicas y reproductivas de las especies estudiadas, sugiriendo que estos factores regulan la tasa de ovulación y la fertilidad de la hembra de forma específica para cada especie (Al-Musawi *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2017). Recientemente, estas diferencias funcionales específicas para cada especie entre animales mono y poli ovulatorios se atribuyeron al distinto momento de la transformación de la proteína BMP15 en un BMP15 funcionalmente maduro (Hosoe *et al.*, 2011). Los factores de crecimiento GDF9 y BMP15 se unen a receptores específicos para activar sus mecanismos de acción en la célula diana. Se detectó expresión de ARNm TGF β -R1 en células de la granulosa de ovejas y vacas (Juengel *et al.*, 2004; Haas *et al.*, 2016). El ARNm BMPR-IB se detectó en folículos caprinos, ovinos, porcinos y bovinos (Silva *et al.*, 2016; Zoheir *et al.*, 2017). Sin embargo, recientemente se reportó, por primera vez, que los ARNm de TGF β -R1 y BMPR-IB se expresaron en ovocitos bovinos (Reineri *et al.*, 2018).

La expresión de ARNm del FGF2 se detectó en ovocitos, células del cumulus, células murales de la granulosa y células de la teca interna, fortaleciendo el papel sistémico durante la foliculogénesis (Schams *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2016). También, se ha propuesto que el FGF2 derivado de los ovocitos podría promover la transición de los folículos primordiales a primarios mediante la señalización de las células de la granulosa y del estroma ovárico (Nilsson *et al.*, 2001).

Conjuntamente, la capacidad angiogénica de FGF2 en los folículos, genera la proliferación de capilares que acompañan la selección del folículo preovulatorio, lo que resulta en un mayor suministro de nutrientes y precursores, favoreciendo el crecimiento del FD (Berisha *et al.*, 2004). Aunque la importancia biológica de la expresión de estos factores en las células somáticas foliculares no se ha dilucidado del todo, los informes anteriores y los resultados del presente estudio indican la posibilidad de que estos factores, tanto en las células somáticas como en los ovocitos, puedan regular la selección del folículo y/o la ovulación en especies con un ciclo estral completo. La presencia de transcripciones de GDF9, BMP15, FGF2, TGF β -R1, BMPR-IB y FGFR2 en las células estudiadas indica que estos factores podrían actuar como reguladores parácrinos y autócrinos en la foliculogénesis. Los resultados muestran la presencia de un complejo sistema de regulación intrafolicular, compuesto por GDF9, BMP15, FGF2 y sus principales

receptores en ovarios bovinos, en concordancia con estudios previos sobre diferentes especies y células foliculares. Estos hallazgos apoyan el concepto de que las primeras etapas del crecimiento y desarrollo folicular ovárico, están reguladas por factores intra-ováricos. Además, los datos mostraron que el concepto inicial de que el GDF9, el BMP15 y el FGF2 son producidos exclusivamente por el ovocito no puede mantenerse para la especie bovina (Reineri *et al.*, 2018). Finalmente, los resultados muestran claramente que los factores estudiados, también se expresan en CF de los folículos preovulatorio bovinos, reflejando potencialmente las interacciones de las células somáticas específicas de la especie.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente tesis, bajo estas condiciones de trabajo, confirman parcialmente la hipótesis de que existe una relación directa entre el número de ondas foliculares, las estructuras ováricas, los factores de crecimiento y sus receptores en vaquillonas para carne.

Según los resultados derivados en el estudio I, el número de ondas foliculares estuvo regulado por el tiempo de desarrollo del folículo dominante de la primera onda y la vida media del cuerpo lúteo. A consecuencia de que, el período de dominancia del folículo dominante de la primera onda permaneció durante más tiempo en 2W y su regresión comenzó dos días después. Además, la fase de regresión del cuerpo lúteo se inició más temprano en 2W.

Aunque los factores de crecimiento evaluados en el estudio III, no mostraron diferencias entre los grupos estudiados, la tendencia observada en los niveles relativos de ARNm de BMP15 podrían influir en la vida más corta del cuerpo lúteo en el grupo W2, ya que se describe que BMP15 puede inhibir la biosíntesis de progesterona.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en el estudio I y III podrían explicar el origen del número de ondas foliculares presentes por ciclo estral.

Este es el primer estudio que investiga la expresión de estos ligandos y sus receptores en células foliculares, provenientes de folículos dominante preovulatorio de vaquillonas para carne con diferente número de ondas foliculares por ciclo estral. En este sentido, es fundamental realizar más experimentos para sumar información.

Además, los resultados del estudio II, indican que, tanto en las células foliculares somáticas como en los ovocitos, hubo expresión de GDF9, BMP15, FGF2, TGF β -R1, BMPR-IB y FGFR2. Lo que indica que estos factores podrían actuar como reguladores parácrinos y autócrinos en la foliculogénesis. Conjuntamente, los datos mostraron que el concepto inicial de que el GDF9, BMP15 y FGF2 son producidos exclusivamente por el ovocito no puede mantenerse para la especie bovina.

Si bien es ineludible realizar más estudios para complementar estos resultados, el uso de ultrasonografía, asociada con las determinaciones moleculares, podrían utilizarse como una herramienta sencilla y efectiva para estudiar la dinámica folicular. Esto permitiría generar y ampliar investigaciones vinculadas a la fisiología ovárica, en ese sentido, al diseño de protocolos para inseminación artificial, re sincronización y transferencia embrionaria a tiempo fijo, con la finalidad de desarrollar estrategias que mejoren los índices reproductivos y/o faciliten la logística de aplicación de los protocolos utilizados actualmente, no solo en la especie bovina, sino también, en otras especies de interés productivo.

PRODUCCIÓN SURGIDA DE LA PRESENTE TESIS

Artículos científicos

Publicados

Reineri P.S., Coria M.S., Barrionuevo M.G., Hernandez O., Callejas S. y Palma G.A. Gene expression of growth factor BMP15, GDF9, FGF2 and their receptors in bovine follicular cells. 2018. Journal MVZ Córdoba. V23 (3), p 6778-6787. doi:10.21897/rmvz.1367

Reineri P.S., Coria M.S., Callejas S, Palma G.A. 2020. Follicular wave dynamics and Growth factors gene expression in Braford heifers. Anatomy Histology Embryology 49:820–829. <https://doi.org/10.1111/ahe.12587>.

Manuscrito en preparación.

Reineri PS, Coria MS, Callejas S, Parellada E, Principi S y Palma G. 2020. Effect of different hormonal treatments on pregnancy rate and growth factors (GDF9, BMP15 and FGF2).

Reineri PS, Coria MS, Callejas S, y Palma G. 2020. Review Roles of growth factors (GDF9, BMP15, and FGF2) on folliculogénesis.

Presentaciones en Simposios y Congresos

Reineri P.S., Coria M.S, Callejas S, Palma G.A. Caracterización de la dinámica folicular ovárica, la expresión de los factores de crecimiento (GDF9, BMP15, FGF2) y sus receptores (TGFBFR1, BMPRII, FGFR2) en vaquillonas para carne. 2019, Trabajo presentado en el 13 Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina, 28 al 30 de agosto. 1a edición especial. ISBN 978-987-4428-03-5. Pag. 350.

Artículo con fines docentes

Reineri P.S., Coria MS, Callejas S y Palma G. 2019. Manejo e implementación de tecnologías para mejorar la eficiencia reproductiva del rodeo de cría. En: I Jornada de Producción de Bovinos para Carne. Santiago de Estero. Santiago del Estero, 29 de octubre de 2019. Pp 13-17.

Reineri, P.S., Coria, M.S, Callejas, S., Palma, G.A. Rol de los factores de crecimiento GDF9, BMP15 y FGF2 en la foliculogénesis y su importancia en la producción bovina ha sido aprobado para ser publicado en Libro de Divulgación Científica del Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional de Santiago del Estero y Editorial EDUNSE (En prensa).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, F.M., Geary, T.W., Coutinho, M.A., Cruppe, L.H., Mussard, M.L., Madsen, C.A., Martins, T., Bridges, G.A., Harstine, B.R., Day, M.L., 2018. Role of progesterone concentrations during early follicular development in beef cattle: II . Ovulatory follicle growth and pregnancy rates. *Anim Reprod Sci* 196, 69–76. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.06.011.
- Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi, P., 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69, 72–80. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.09.026.
- Aerts, J.M.J., Bols, P.E.J., 2010. Review Article Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species . Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reprod Dom Anim* 45, 171–179. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x.
- Aguilar, L.M.C., Silva, S.M., Moulton, S.E., 2019. Growth factor delivery: Defining the next generation platforms for tissue engineering. *J. Control. Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2019.05.028.
- Al-musawi, S.L., Walton, K.L., Heath, D., Simpson, C.M., Harrison, C.A., 2013. Species differences in the expression and activity of bone morphogenetic protein 15. *Endocrinology* 154, 888–899. doi:10.1210/en.2012-2015.
- Almeida, A.P., Saraiva, M.V.A., Filho, J.G.A., Silva, G.M., Gonc, R.F.B., 2012. Gene Expression and Immunolocalization of Fibroblast Growth Factor 2 in the Ovary and Its Effect on the In Vitro Culture of Caprine Preantral Ovarian Follicles. *Reprod Dom Anim* 47, 20–25. doi:10.1111/j.1439-0531.2011.01793.x.
- Barbeito, C.G., Laube, P.F.A., 2005. Growth factors . Basic considerations and potential therapeutics. *Aanalecta Vet.* 25, 8–27.
- Belov, A.A., Mohammadi, M., 2013. Molecular Mechanisms of Fibroblast Growth Factor Signaling in Physiology and Pathology. *Cold Spring Harb. Lab. Press* 5:a015958, 1–24.
- Berisha, B., Sinowatz, F., Schams, D., 2004. Expression and Localization of Fibroblast Growth Factor (FGF) Family Members During the Final Growth of Bovine Ovarian Follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 162–171. doi:10.1002/mrd.10386.
- Berman, A., 1995. Effect of Heat Stress on Follicular Development during the Estrous Cycle in Lactating Dairy Cattle. *Biol. Reprod.* 1113, 1106–1113.
- Billings, P.C., Pacifici, M., 2015. Interactions of signaling proteins, growth factors and other

- proteins with heparan sulfate: Mechanisms and mysteries. *Connect Tissue Res* 56, 272–280. doi:10.3109/03008207.2015.1045066.
- Braw-tal, R., 2002. The initiation of follicle growth : the oocyte or the somatic cells ? *Mol. Cell. Endocrinol.* 187, 11–18.
- Braw-Tal, R., Roth, Z., 2005. Gene expression for LH receptor, 17 alpha-hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction* 129, 453–61. doi:10.1530/rep.1.00464.
- Chang, H.-M., Qiao, J., Leung, P.C.K., 2016. Oocyte–somatic cell interactions in the human ovary—novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Hum. Reprod. Update* 23, 1–18. doi:10.1093/humupd/dmw039.
- Chaves, R.N., Helena, M., Matos, T. De, A, R.D.F., 2012. The fibroblast growth factor family : involvement in the regulation of folliculogenesis. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 905–915. doi:10.1071/RD11318.
- Chen, H., Liu, C., Jiang, H., Gao, Y., Xu, M., Wang, J., Liu, S., Fu, Y., Sun, X., Xu, J., Zhang, J., Dai, L., 2017. Regulatory Role of miRNA-375 in Expression of BMP15/GDF9 Receptors and its Effect on Proliferation and Apoptosis of Bovine Cumulus Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 41, 439–450. doi:10.1159/000456597.
- de Caestecker, M., 2004. The transforming growth factor- B superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 1–11. doi:10.1016/j.cytogfr.2003.10.004.
- Dumesic, D.A., Meldrum, D.R., Katz-jaffe, M.G., Krisher, R.L., 2015. Oocyte environment : follicular fl uid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil. Steril.* 103, 303–316. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.11.015.
- Elvin, J. a, Clark, a T., Wang, P., Wolfman, N.M., Matzuk, M.M., 1999. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the Mammalian Ovary. *Mol. Endocrinol.* 13, 1035–1048. doi:10.1210/mend.13.6.0310.
- Elvin, J.A., Yan, C., Matzuk, M.M., 2000. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E 2 EP2 receptor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (18), 10288–10293.
- European Union (EU). Council Lregulation (EC) N° 1099/2009 on the protection of animals at the time of killing. Brussels, Belgium; 2009. <http://www.fao.org/faolex/results/details/en/?details=LEXFAOC090989>.

- Evans, A.C.O., Komar, C.M., Wandji, S-A. and Fortune J.E. 1997. Changes in Androgen Secretion and Luteinizing Hormone Pulse Amplitude Are Associated with the Recruitment and Growth of Ovarian Follicles during the Luteal Phase of the Bovine Estrous Cycle. *Biology of Reproduction* 57, 394-401.
- Field, S.L., Dasgupta, T., Cummings, M., Orsi, N.M., 2014. Cytokines in Ovarian Folliculogenesis, Oocyte Maturation and Luteinisation. *Mol. Reprod. Dev.* 81, 284–314. doi:10.1002/mrd.22285.
- Gasperin, B.G., Ferreira, R., Rovani, M.T., Bordignon, V., Duggavathi, R., Buratini, J., Oliveira, J.F.C., Gonçalves, P.B.D., 2014. Expression of receptors for BMP15 is differentially regulated in dominant and subordinate follicles during follicle deviation in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 144, 72–78. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.12.002.
- Ginther, O.J., 2016. The theory of follicle selection in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 57, 85–99. doi:10.1016/j.domaniend.2016.06.002.
- Ginther, O.J., Baldrighi, J.M., Siddiqui, M.A.R., Bashir, S.T., Rakesh, H.B., 2016. Mechanism for greater frequency of contralateral than ipsilateral relationships between corpus luteum and ovulatory follicle for wave 3 in heifers. *Theriogenology* 85, 361–367. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.08.016.
- Ginther, O.J., Bashir, S.T., 2013. Length of the luteal phase and frequency of the four permutations between two or three follicular waves and ipsilateral or contralateral locations of the corpus luteum and preovulatory follicle in heifers. *Theriogenology* 80, 114–119. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.03.016.
- Ginther, O.J., Bashir, S.T., Hoffman, M.M., Beg, M.A., 2013. Endocrinology of number of follicular waves per estrous cycle and contralateral or ipsilateral relationship between corpus luteum and preovulatory follicle in heifers. *Domest. Anim. Endocrinol.* 45, 64–71. doi:10.1016/j.domaniend.2013.05.002.
- Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Kulick, L.J., Kot, K., 2000. Selection of the Dominant Follicle in Cattle : Role of Two-Way Functional Coupling Between Follicle-Stimulating Hormone and the Follicles. *Biol. Reprod.* 62, 920–927.
- Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Kulick, L.J., Kot, K., 1999. Selection of the dominant follicle in cattle: Establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. *Theriogenology* 52, 1079–1093. doi:10.1016/S0093-691X(99)00196-X.

- Ginther, O.J., Knopf, L., Kastelic, J.P., 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.* 87, 223–230.
- Ginther, O.J., Rakesh, H.B., Bashir, S.T., Hoffman, M.M., 2014. Relationship between days of the luteolytic period and locations of the preovulatory follicle and CL in interovulatory intervals with two or three follicular waves in heifers. *Theriogenology* 81, 787–796. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.12.025.
- Gode, F., Gulekli, B., Dogan, E., Korhan, P., Dogan, S., Bige, O., Cimrin, D., Atabey, N., 2011. Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality. *Fertil. Steril.* 95, 2274–2278. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.03.045.
- Goetz, R., Beenken, A., Ibrahim, O.A., Kalinina, J., Olsen, S.K., Eliseenkova, A. V, Xu, C., Neubert, T.A., Zhang, F., Linhardt, R.J., Yu, X., White, K.E., Inagaki, T., Kliewer, S.A., Yamamoto, M., Kurosu, H., Ogawa, Y., Kuro-o, M., Lanske, B., Razzaque, M.S., Mohammadi, M., 2007. Molecular Insights into the Klotho-Dependent , Endocrine Mode of Action of Fibroblast Growth Factor 19 Subfamily Members. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3417–3428. doi:10.1128/MCB.02249-06.
- GP Adams, RL Matteri, JP Kastelic, J.K. and O.G., 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 94, 177–188.
- Haas, C.S., Rovani, M.T., Oliveira, F.C., Vieira, A.D., Bordignon, V., Gonçalves, P.B.D., Ferreira, R., Gasperin, B.G., 2016. Expression of growth and differentiation Factor 9 and cognate receptors during final follicular growth in cattle. *Anim. Reprod.* 13, 756–761. doi:10.21451/1984-3143-AR789.
- Han, P., Guerrero-netro, H., Estienne, A., Price, C.A., 2018. Molecular and Cellular Endocrinology Effects of fibroblast growth factors and the transcription factor , early growth response 1, on bovine theca cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 476, 96–102. doi:10.1016/j.mce.2018.04.013.
- Hatzirodos, N., Hummitzsch, K., Irving-Rodgers, H.F., Rodgers, R.J., 2015. Transcriptome comparisons identify new cell markers for theca interna and granulosa cells from small and large antral ovarian follicles. *PLoS One* 10, 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0119800.
- Haughian JM, Ginther OJ, Diaz FJ, Wiltbank MC. Gonadotropin- releasing hormone, estradiol, and inhibin regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone surges: implications for follicle emergence and selection in heifers. *Biol Reprod* 2013;88:165. 1–10. doi

10.1095/biolreprod.112.107342.

- Hosoe, M., Kaneyama, K., Ushizawa, K., Hayashi, K.-G., Takahashi, T., 2011. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9, 33. doi:10.1186/1477-7827-9-33.
- Hui, Q., Jin, Z., Li, X., Liu, C., Wang, X., 2018. FGF Family : From Drug Development to Clinical Application. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1875, 1–15. doi:10.3390/ijms19071875.
- Hung, K., Li, T., Mah, Y., 2013. Functional roles of fibroblast growth factor receptors (FGFRs) signaling in human cancers. *Apoptosis* 18, 1447–1468. doi:10.1007/s10495-013-0886-7.
- Hussein, T.S., Froiland, D.A., Amato, F., Thompson, J.G., Gilchrist, R.B., 2005. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J. Cell Sci.* 118 (pt 22, 5257–5268. doi:10.1242/jcs.02644.
- Van Wezel I., Umaphysivam K., Tilley W, R.R., 1995. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Mol. Cell. Endocrinol.* 115, 133–140.
- Ireland, J.J., 1987. Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fertil.* 34, 39–54.
- Ireland, J.J., Folger, J., Bettgowda, A., Scheetz, D., Walsh, S., Mossa, F., Knight, P.G., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2009. Variation in the Ovarian Reserve Is Linked to Alterations in Intrafollicular Estradiol Production and Ovarian Biomarkers of Follicular Differentiation and Oocyte Quality in Cattle. *Biol. Reprod.* 964, 954–964. doi:10.1095/biolreprod.108.073791.
- Itoh, N., Ornitz, D.M., 2004. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families 20, 14–20. doi:10.1016/j.tig.2004.08.007.
- Jaiswal, R.S., Singh, J., Marshall, L., Adams, G.P., 2009. Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 72, 81–90. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.02.014.
- Juengel, JL and McNatty, K.P., 2005. The role of proteins of the transforming growth factor- b superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum. Reprod. Update* 11, 144–161. doi:10.1093/humupd/dmh061.
- Juengel, J.L., Bibby, A.H., Reader, K.L., Lun, S., Quirke, L.D., Haydon, L.J., McNatty, K.P., 2004. The role of transforming growth factor-beta (TGF-beta) during ovarian follicular

- development in sheep. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 78. doi:10.1186/1477-7827-2-78.
- Kaivo-oja, N., Bondestam, J., Ka, M., Vitt, U., Cranfield, M., Vuojolainen, K., Kallio, J.P., Olkkonen, V.M., Hayashi, M., Moustakas, A., Groome, N.P., Dijke, P.T.E.N., Hsueh, A.J.W., Ritvos, O., 2003. Growth Differentiation Factor-9 Induces Smad2 Activation and Inhibin B Production in Cultured Human Granulosa-Luteal Cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 755–762. doi:10.1210/jc.2002-021317.
- Kona, S.S.R., Praveen Chakravarthi, V., Siva Kumar, A.V.N., Srividya, D., Padmaja, K., Rao, V.H., 2016. Quantitative expression patterns of GDF9 and BMP15 genes in sheep ovarian follicles grown in vivo or cultured in vitro. *Theriogenology* 85, 315–322. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.022.
- Kretzschmar, M., Massague, J., 1998. SMADs : mediators and regulators of TGF-B signaling. *Genet. Dev.* 8, 103–111.
- Lan, Z., Gu, P., Xu, X., Jackson, K.J., Demayo, F.J., Malley, B.W.O., Cooney, A.J., 2003. GCNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility. *EMBO J.* 22, 4070–4081.
- Lenis, Y., Sc, M., Ramón, N., Sc, M., Restrepo, J., Sc, M., 2010. Bovine interferon tau in the bovine maternal-embryonic recognition window. *Rev. U.D.C.A Actual. Divulg. Científica* 13 (1), 17–28.
- Li, S., Lin, M., Hwu, Y., Lu, C., Yeh, L., Chen, Y., Lee, R.K., 2015. Correlation of cumulus gene expression of embryo development. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13:93, 1–8. doi:10.1186/s12958-015-0091-3.
- Li, Y., Li, R., Ou, S., Zhang, N., Ren, L., Wei, L., Zhang, Q., Yang, D., 2014. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12:81, 1–9. doi:http://www.rbej.com/content/12/1/81.
- Luo, W., Gumen, A., Haughian, J.M., Wiltbank, M.C., 2011. The role of Luteinizing Hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 84, 369–378. doi 10.1095/biolreprod.110.085274.
- Mahesh, Y.U., Gibence, H.R.W., Shivaji, S., Rao, B.S., 2017. Effect of different cryo-devices on in vitro maturation and development of vitrified-warmed immature buffalo oocytes. *Cryobiology* 75, 106–116. doi:10.1016/j.cryobiol.2017.01.004.

- McGEE, E, Hsueh, A., 2000. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocr. Rev.* 21, 200–214.
- Mckenzie, L.J., Pangas, S.A., Carson, S.A., Kovanci, E., Cisneros, P., Buster, J.E., Amato, P., Matzuk, M.M., 2004. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum. Reprod.* 19, 2869–2874. doi:10.1093/humrep/deh535.
- McNatty, K.P., Juengel, J.L., Reader, K.L., Lun, S., Myllymaa, S., Lawrence, S.B., Western, A., Meerassahib, M.F., Mottershead, D.G., Groome, N.P., Ritvos, O., Laitinen, M.P.E., 2005. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction* 129, 481–487. doi:10.1530/rep.1.00517.
- Mester, B., Ritter, L.J., Pitman, J.L., Bibby, A.H., Gilchrist, R.B., McNatty, K.P., Juengel, J.L., McIntosh, C.J., 2015. Oocyte expression, secretion and somatic cell interaction of mouse bone morphogenetic protein 15 during the peri-ovulatory period. *Reprod. Fertil. Dev.* 27, 801–811. doi:10.1071/RD13336.
- Mishra, S.R., Thakur, N., Somal, A., Parmar, M.S., Reshma, R., Rajesh, G., Yadav, V.P., Bharti, M.K., Bharati, J., Paul, A., Chouhan, V.S., Sharma, G.T., Singh, G., Sarkar, M., 2016. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family in buffalo ovarian follicle during different stages of development and modulatory role of FGF2 on steroidogenesis and survival of cultured buffalo granulosa cells. *Res. Vet. Sci.* 108, 98–111. doi:10.1016/j.rvsc.2016.08.012.
- Moore, R.K., Otsuka, F., Shimasaki, S., 2003. Molecular Basis of Bone Morphogenetic Protein-15 Signaling in Granulosa Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 304–310. doi:10.1074/jbc.M207362200.
- Moore, R.K., Shimasaki, S., 2005. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Mol. Cell. Endocrinol.* 234, 67–73. doi:10.1016/j.mce.2004.10.012.
- Mueller, T.D., Nickel, J., 2012. Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett.* 586, 1846–1859. doi:10.1016/j.febslet.2012.02.043.
- Neuvians, T.P., Berisha, B., Schams, D., 2004. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Fibroblast Growth Factor (FGF) Expression During Induced Luteolysis in the Bovine Corpus Luteum. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 389–395. doi:10.1002/mrd.20032.
- Nilsson, E., Parrott, J. a., Skinner, M.K., 2001. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 175, 123–130.

doi:10.1016/S0303-7207(01)00391-4.

- Nilsson, E.E., Skinner, M.K., 2004. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition 214, 19–25. doi:10.1016/j.mce.2003.12.001.
- Okada-ban, M., Thiery, J.P., Jouanneau, J., 2000. Fibroblast growth factor-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 263–267.
- Orisaka, M., Orisaka, S., Jiang, J.-Y., Craig, J., Wang, Y., Kotsuji, F., Tsang, B.K., 2006. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol. Endocrinol.* 20, 2456–68. doi:10.1210/me.2005-0357.
- Ornitz, D.M., Itoh, N., 2001. Protein family review Fibroblast growth factors Gene organization and evolutionary history. *Genoma Biol.* 2 (3) : re, 1–12.
- Otsuka, F., McTavish, K., Shimasaki, S., 2011. Integral Role of GDF-9 and BMP-15 in Ovarian Function. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 9–21. doi:10.1002/mrd.21265.
- Otsuka, F., Moore, R.K., Iemura, S., Ueno, N., Shimasaki, S., 2001. Follistatin Inhibits the Function of the Oocyte-Derived Factor BMP-15. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 961–966. doi:10.1006/bbrc.2001.6103.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8060–8065.
- Otsuka, F., Yao, Z., Lee, T., Yamamoto, S., Erickson, G.F., Shimasaki, S., 2000. Bone Morphogenetic Protein-15. *J. Biol. Chem.* 275, 39523–39528. doi:10.1074/jbc.M007428200.
- Pan, Z.Y., Di, R., Tang, Q.Q., Jin, H.H., Chu, M.X., Huang, D.W., He, J.N., Liu, Q.Y., Hu, W.P., Wang, X.Y., Yao, Y.X., Liu, L., Song, C.L., 2015. Tissue-specific mRNA expression profiles of GDF9, BMP15, and BMP1B genes in prolific and non-prolific goat breeds. *Czech J. Anim. Sci.* 60, 452–458. doi:10.17221/8525-CJAS.
- Paradis, F., Novak, S., Murdoch, G.K., Dyck, M.K., Dixon, W.T., Foxcroft, G.R., 2009. Temporal regulation of BMP2, BMP6, BMP15, GDF9, BMP1A, BMP1B, BMP2 and TGFBR1 mRNA expression in the oocyte, granulosa and theca cells of developing preovulatory follicles in the pig. *Reproduction* 138, 115–129. doi:10.1530/REP-08-0538.
- Paulini, F., Melo, E.O., 2011. The Role of Oocyte-Secreted Factors GDF9 and BMP15 in Follicular Development and Oogenesis. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 354–361.

doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01739.x.

- Paulini, F., Silva, R.C., de Paula Rôlo, J.L.J., Lucci, C.M., 2014. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *J. Ovarian Res.* 7, 102. doi:10.1186/s13048-014-0102-6.
- Peluso, J.J., 2003. Basic fibroblast growth factor (bFGF) regulation of the plasma membrane calcium ATPase (PMCA) as part of an anti-apoptotic mechanism of action. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1363–1369. doi:10.1016/S0006-2952(03)00486-6.
- Peluso, J.J., Pappalardo, A., Fernandez, G., 2001. Homeostasis and Granulosa Cell Viability by Stimulating Calcium Efflux via a PKC δ -Dependent Pathway. *Endocrinology* 142, 4203–4211.
- Plotnikov, A.N., Hubbard, S.R., Schlessinger, J., Mohammadi, M., 2000. Crystal Structures of Two FGF-FGFR Complexes Reveal the Determinants of Ligand-Receptor Specificity. *Cell* 101, 413–424.
- Reineri, Pablo S, M., Coria, M.S., Barrionuevo, María G, Olegario Hernández M, S.C. and, Palma, G.A., 2018. Gene expression of growth factor BMP15, GDF9, FGF2 and their receptors in bovine follicular cells. *Rev.MVZ Córdoba* 23, 6778–6787. doi:10.21897/rmvz.1367.
- Reineri P.S, Coria M.S, Callejas S, Palma G.A. 2018. Caracterización de la dinámica folicular ovárica, la expresión de los factores de crecimiento (GDF9, BMP15, FGF2) y sus receptores (TGFBR1, BMPRII, FGFR2) en vaquillonas para carne. Trabajo presentado en el 13 Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina, 28 al 30 de agosto de 2019. 1a edición especial. ISBN 978-987-4428-03-5. Pag. 350.
- Reineri P.S, Coria M.S, Callejas S, Palma G.A. 2020. Follicular wave dynamics and Growth factors gene expression in Braford heifers. *Anat Histol Embryol.* 49:820–829. <https://doi.org/10.1111/ahe.12587>.
- Rhodes, F.M., De, G., Entwistle, K.W., 1995. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim Reprod Sci* 38, 265–277.
- Roche, J.F., Crow, M.A., Bolandb, M.P., 1992. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* 28, 371–378.
- Rodgers, R.J., Irving-rodgers, H.F., 2010. Minireview Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid 1. *Biol. Reprod.* 1029, 1021–1029. doi:10.1095/biolreprod.109.082941.
- Ross, S., Hill, C.S., 2008. How the Smads regulate transcription. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40,

- 383–408. doi:10.1016/j.biocel.2007.09.006.
- S., B.-T.R. and Y., 1997. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 109, 165-171.
- Sánchez F., Adriaenssens tT., Romero S., S.J., 2009. Quantification of oocyte-specific transcripts in follicle-enclosed oocytes during antral development and maturation in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 539–550. doi:10.1093/molehr/gap051.
- Schams, Berisha, 2004. Regulation of Corpus Luteum Function in Cattle – an Overview. *Reprod Dom Anim* 39, 241–251.
- Schams, D., Berisha, B., 2002. Angiogenic Factors (VEGF , FGF and IGF) in the Bovine Corpus Luteum. *J. Reprod. Dev.* 48, 233–242.
- Schams, D., Steinberg, V., Steffl, M., Meyer, H.H.D., Berisha, B., 2009. Expression and possible role of fibroblast growth factor family members in porcine antral follicles during final maturation. *Reproduction* 138, 141–149. doi:10.1530/REP-09-0033.
- Shimasaki, S., Moore, R.K., Otsuka, F., Erickson, G.F., 2004. The Bone Morphogenetic Protein System in Mammalian Reproduction. *Endocr. Rev.* 25, 72–101. doi:10.1210/er.2003-0007.
- Shimizu, K., Nakamura, T., Nakanishi, N., Kasahara, Y., Nagai, T., 2019. Molecular mechanism of FSHR expression induced by BMP15 in human granulosa cells. *J. Assist. Reprod. Genet.* 36, 1185–1194.
- Silva, J.R.V., van den Hurk, R., Figueiredo, J.R., 2016. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 55, 123–135. doi:10.1016/j.domaniend.2015.12.006.
- Silva, J.R. V, Van Den Hurk, R., Van Tol, H.T. a, Roelen, B. a J., Figueiredo, J.R., 2004. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol. Reprod. Dev.* 70, 11–19. doi:10.1002/mrd.20127.
- Skinner, M.K., 2005. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum. Reprod. Update* 11, 461–71. doi:10.1093/humupd/dmi020.
- Sopory, S., Nelsen, S.M., Degnin, C., Wong, C., Christian, J.L., 2006. Regulation of Bone Morphogenetic Protein-4 Activity by Sequence Elements within the Prodomain. *J. Biol. Chem.* 281, 34021–34031. doi:10.1074/jbc.M605330200.
- Spicer, L.J., Aad, P.Y., Allen, D.T., Mazerbourg, S., Payne, A.H., Hsueh, A.J., 2008. Growth

- Differentiation Factor 9 (GDF9) Stimulates Proliferation and Inhibits Steroidogenesis by Bovine Theca Cells : Influence of Follicle Size on Responses to GDF9 1. *Biol. Reprod.* 253, 243–253. doi:10.1095/biolreprod.107.063446.
- Su, Y., Sugiura, K., Wigglesworth, K., Brien, M.J.O., Affourtit, J.P., Pangas, S.A., Matzuk, M.M., Eppig, J.J., 2008. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 135, 111–121. doi:10.1242/dev.009068.
- Sugiura, K., Pendola, F.L., Eppig, J.J., 2005. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev. Biol.* 279, 20–30. doi:10.1016/j.ydbio.2004.11.027.
- Sugiura, K., Su, Y., Diaz, F.J., Pangas, S.A., Sharma, S., Wigglesworth, K., Brien, M.J.O., Matzuk, M.M., Shimasaki, S., Eppig, J.J., Sugiura, K., Su, Y., Diaz, F.J., Pangas, S.A., Sharma, S., Wigglesworth, K., Brien, M.J.O., Matzuk, M.M., Shimasaki, S., Eppig, J.J., 2008. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development* 134, 2593–2603. doi:10.1242/dev.020024.
- Testart, J., Th, A., Lef, B., 1983. The endogenous gonadotrophin surge. *J. Reprod. Fertil.* 68, 413–418.
- Townson, D.H., Tsang, P.C., Butler, W.R., Frajblat, M., Griel, L.C., Johnson, C.J., Niksic, G.M., Pate, J.L., Tsang, P.C.W., Milvae, R.A., 2002. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 80, 1053–1058.
- Vitt, U.A., Gee, E.A.M.C., Hayashi, M., Hsueh, A.J.W., 2000. In Vivo Treatment with GDF-9 Stimulates Primordial and Primary Follicle Progression and Theca Cell Marker CYP17 in Ovaries of Immature Rats. *Endocrinology* 141, 3814–3820.
- Wang, J., Roy, S.K., 2004. Growth Differentiation Factor-9 and Stem Cell Factor Promote Primordial Follicle Formation in the Hamster: Modulation by Follicle-Stimulating Hormone. *Biol. Reprod.* 70, 577–585. doi:10.1095/biolreprod.103.023234.
- Wolfenson, D., Roth, Z., Meidan, R., 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle : basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 535–547.
- Wu, Y.T., Tang, L., Cai, J., Lu, X.E., Xu, J., Zhu, X.M., Luo, Q., Huang, H.F., 2007. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Hum. Reprod.* 22, 1526–1531.

doi:10.1093/humrep/dem029.

- Xu, Z., Garverick, H.A., Smith, G.W., Smith, M.F., Hamilton, S.A., Youngquist, R.S., 1995. Expression of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acids in Bovine Follicles during the First Follicular Wave. *Biol. Reprod.* 957, 951–957.
- Xuemei Wu, M.M., 2002. GDF-9 and BMP-15 : Oocyte Organizers. *Endocr. Metab. Disord.* 3, 27–32.
- Zhang, X., Ph, D., Jafari, N., Ph, D., Barnes, R.B., Confino, E., 2005. Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertil. Steril.* 83, 1169–1179. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.11.030.
- Zoheir, K.M.A., Harisa, G.I., Allam, A.A., Yang, L., Li, X., Liang, A., Abd-Rabou, A.A., Harrath, A.H., 2017. Effect of alpha lipoic acid on in vitro development of bovine secondary preantral follicles. *Theriogenology* 88, 124-130. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.09.013.