



Análisis in silico de la expresión génica en células de granulosa de folículos preovulatorios en dos especies de bovinos



Jesús Alfredo Berdugo-Gutiérrez ^{a*}

Ariel Marcel Tarazona-Morales ^b

José Julián Echeverry-Zuluaga ^a

Albeiro López-Herrera ^a

^a Universidad Nacional de Colombia- Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación BIOGEM. Carrera 65 No 59 a 110. Medellín, Colombia.

^b Universidad Nacional de Colombia- Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación BIOGENESIS.

*Autor de correspondencia: jaberdugog@unal.edu.co

Resumen:

Los búfalos y vacunos son dos especies de bovinos con gran parecido en su fisiología reproductiva, pero a la vez con gran diferencia en sus parámetros reproductivos. El objetivo del presente trabajo es comparar la expresión génica en células de granulosa de folículos preovulatorios de estas dos especies, basados en información disponible en la literatura, los repositorios de transcriptomas existentes y en el análisis funcional usando Ingenuity Pathway Analysis. Sólo se encontraron dos estudios independientes en los que se comparan búfalos y vacunos en cuanto a la expresión génica en células de la granulosa de folículos preovulatorios. Se analizaron los datos de expresión de forma independiente y combinada. Se encontró que, entre búfalos y vacunos, prácticamente no hay correspondencia entre los procesos evaluados, ni en las vías canónicas, ni en los reguladores corriente arriba, solamente se encuentra alguna correspondencia entre las redes y aspectos fisiológicos de cada proceso. Se concluye que cada especie tiene forma diferente de realizar el mismo proceso y que debe investigarse cada evento de acuerdo con las necesidades de los investigadores.

Palabras clave: Bovinos, Granulosa, Transcriptómica, Folículo, In Silico.

Recibido: 25/02/2020

Aceptado: 22/12/2020

Los búfalos (*Bubalus bubalis*) y vacunos (*Bos taurus*) son bovinos, muy emparentados que solo los diferencia su ADN mitocondrial⁽¹⁾. Búfalos y vacunos son poliéstricos estacionales, con dos o tres ondas foliculares por ciclo estral⁽²⁾; sin embargo en iguales condiciones medioambientales y de manejo su función reproductiva es diferente evidenciado en la tasa de natalidad, expresión de celo y respuesta a las biotecnologías reproductivas. También se ha descrito que el búfalo tiene ovarios de menor tamaño⁽³⁾, diferente diámetro folicular al momento de la desviación y de la ovulación⁽⁴⁾, menor calidad de oocitos y menor tasa de producción de embriones comparados con los vacunos. Li *et al*⁽⁵⁾ encontraron 40 loci (asociados con 28 genes) que pudieron relacionarse con parámetros reproductivos tales como edad al primero, segundo y tercer parto, días abiertos, servicios por concepción e intervalo entre partos^(5,6). La formación de un oocito competente depende del desarrollo folicular, en una la formación de un folículo preantral con un oocito capaz de formar el individuo y la segunda es el desarrollo de este folículo hasta la ovulación, asociado a todos los cambios endocrinos que deben suceder en la hembra para lograrlo^(7,8).

El control de la población folicular depende de la función que ejerce la hormona antimülleriana (AMH), los que van a ovular deben adquirir receptores para la hormona folículo estimulante (FSH), finalmente algún folículo gana receptores para LHR⁽⁸⁾, lo que genera un descenso en la velocidad de crecimiento que se mantiene hasta el pico preovulatorio de LH^(9,10).

Se ha informado que el oocito bufalino es de pobre calidad cuando es evaluado con los parámetros que normalmente se usan para los vacunos, y aunque no se conoce en detalle las razones se ha propuesto como causa: un microambiente folicular adverso, lo que ha motivado a los investigadores a estudiar las proteínas del líquido folicular bufalino⁽¹¹⁾. Se ha demostrado que la comunicación existente entre las células de granulosa y el oocito juegan un papel fundamental para producir oocitos de buena calidad⁽¹²⁾. Hoy en día es factible el análisis en profundidad de los eventos reproductivos en la hembra bovina. Es innegable el avance logrado con los microarreglos y otros sistemas usados en transcriptómica, los datos son depositados en repositorios, que pueden analizarse y permiten al investigador evaluar sus premisas. Sin embargo es una base heterogénea debido a todos los aspectos técnicos y las herramientas computacionales usadas para el análisis de la misma⁽¹³⁾. En un estudio reciente, Khan *et al*⁽¹⁰⁾ generaron una interfase interactiva llamada GranulosaIMAGE, que provee información sobre los perfiles de expresión de los genes y sus isoformas en las células de granulosa de vacunos en diferentes estados de la foliculogénesis (<http://emb.bioinfo.fsaa.ulaval.ca/granulosaIMAGE/>).

Una herramienta importante es Ingenuity Pathway Analysis (IPA) que es una base de datos que se usa para el análisis, integración e interpretación de los datos relacionados con experimentos basados en información obtenida mediante RNAseq, principalmente IPA permite en un solo análisis, identificar las moléculas reguladoras, lo que facilita la explicación de los patrones de expresión, prediciendo las consecuencias del control sugerido sobre la biología celular y sobre la presentación de las enfermedades⁽¹⁴⁾. El programa hace los cálculos basados en algoritmos y datos experimentales⁽¹⁵⁾ finalmente en los cuales los genes expresados diferencialmente en el experimento son asociados con aquellos que se han informado más frecuentemente en una función particular o vía metabólica⁽¹⁶⁾ y sus sistemas de control⁽¹⁷⁾.

Los desarrollos en bioinformática permiten el estudio de fenómenos biológicos de una forma compleja: en este caso las diferencias en la expresión génica de folículos de búfalos y de vacunos, de una forma más global, que permiten por lo menos considerar todos los posibles genes que se expresan en un momento dado, mostrando los detalles de la expresión génica y de las posibles alternativas que la naturaleza ha generado para la realización de un mismo proceso. El objetivo del presente trabajo es evaluar si existen diferencias en la expresión génica de células de granulosa de folículos preovulatorios búfalos y vacunos tendientes a buscar explicaciones al diferencial de respuesta a las biotecnologías reproductivas observado entre las especies mencionadas.

Este trabajo fue realizado en dos fases: la primera, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva, en las bases de datos de PUBMED y Google Académico, enfocándola en información correspondiente a los análisis de expresión génica entre búfalos y vacas y cuyos archivos estuvieran depositados en GEO (Gene Expression Omnibus) hasta marzo del 2018, la segunda, se realizó el análisis de los reportes encontrados. El criterio de inclusión fue: experimentos donde hubiera comparación de datos; o si no había comparación, que los datos fueran obtenidos de la misma forma y procesados de forma similar.

Se encontraron dos estudios de transcriptomas de folículo preovulatorio^(18,19). En el caso de las vacas el RNA fue extraído con RNeasy mini kit (Qiagen) y en el de búfalo con TRIZOL seguido de purificación con RNeasy mini kit, en ambos casos se obtuvo cDNA y fueron hibridizados con un Chip de Affimetrix (Affymetrix Gene - Chip Bovine Genome Arrays), que contenían 24,128 sondas, representando 23,000 transcritos y sus variantes, incluyendo 19,000 clúster unigénicos. Aquellos genes con un cambio en la expresión ≥ 2 con una tasa falsa de descubrimiento ($FDR < 0.05$) fueron considerados como expresados diferencialmente, posteriormente se realizó una RT-PCR semi cuantitativa para la validación de los resultados con los siguientes genes: receptor de LH (LHR), receptor de la progesterona (PR) y ciclooxigenasa COX-2 en búfalos, y dos genes del citocromo P450 relacionados con la producción de estrógenos, Citocromo 450 CPY19A1, CPY17A1, 18s, para los vacunos.

Posteriormente, los datos crudos de cada microarreglo se corrigieron mediante la remoción del ruido de fondo (Background) y normalización (loess) utilizando el software FlexArray 1.6.1, y todos los datos fueron exportados a archivos de excell (Microsoft Office) para ser analizados de forma funcional usando Ingenuity® Pathway Analysis (IPA). Se utilizó como genoma de comparación UMD *Bos taurus* 3.1.1 para ambos casos, dado que el genoma bufalino aún no está totalmente secuenciado. Se obtuvo de una lista de genes diferencialmente expresados de los folículos preovulatorios de cada especie y se cuantificó esta diferencia, se agruparon de acuerdo a su función biológica y a los potenciales reguladores corriente arriba (upstream). La información se procesó individualmente y compararon entre las dos especies. El programa funciona asignándole un valor probabilístico a la asociación entre los genes sobre o sub expresados y las principales funciones biológicas. Para el análisis de los reguladores corriente arriba, IPA® compara los resultados del experimento con su propia base de datos de los efectos conocidos de los genes y moléculas sobre la expresión. De cada regulador se calculan dos valores, un valor de sobreposición (overlap p) y un valor de activación (Z score), que corresponde a un promedio numérico calculado de los efectos conocidos de la molécula o gen (up or down regulation) y sus respectivos blancos. Se considera un valor de Z significativo cuando tiene un valor mayor a 2 (Z-score > 2) para activación y (Z-score < 2) para inhibición, los valores intermedios se consideran que no pueden ser atribuibles a la experimentación⁽¹⁴⁾.

Se encontraron 21 reportes de expresión génica en células de la granulosa bovina en los que hubiera al menos una base de datos depositada, y de estos solamente uno tenía información de búfalos. No hubo reportes de comparación de expresión diferencial de genes entre búfalos y vacas. Finalmente los requisitos se cumplieron por dos reportes: “Transcriptome profiling of granulosa cells of bovine ovarian follicles during growth from small to large antral sizes”, número de acceso GSE39589 con cuatro repeticiones⁽¹⁹⁾, y “Buffalo Gene expression profiling of preovulatory follicle in the buffalo cow: effects of increased IGF-I concentration on periovulatory events”, número de acceso GSE11312, con tres repeticiones⁽¹⁸⁾.

En los trabajos iniciales se informa que existen en las búfalas 110 genes diferencialmente expresados que pertenecen a 14 vías metabólicas de acuerdo con la base de datos de Ontología Génica (Gene ontology), para las vacas se encontraron 446 genes que pertenecían a 10 vías metabólicas.

El análisis de IPA muestra que las más importantes vías metabólicas canónicas asociadas con el patrón de expresión observado en el búfalo fueron: Ubiquitinación de proteínas, disfunción mitocondrial, fosforilación oxidativa y la señalización asociada al receptor de estrógenos y de las sirtuinas, en las vacas las vías canónicas más importantes son la síntesis de triacilglicéridos, traductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3), maduración de fagosomas, Proteína Kinasa Janus 2 (JAK 2) en la señalización de hormonas parecidas a las citoquinas y la de la Oncostatina (Cuadro 1).

Cuadro 1: Principales rutas metabólicas en el folículo de búfalo y vaca

Ruta	Valor p	Sobreposición (%)	Moléculas
Folículo de búfala			
Ubiquitinación de proteínas	1.11 E -11	19.70	53/269
Disfunción mitocondrial	2.41 E-11	22.30	42/188
Fosforilación oxidativa	7.80 E-10	25.20	30/119
Señales del receptor de estrógenos	9.46 E -10	23.90	32/134
Señalización de la sirtuina	3.46 E -08	16.00	52/325
Folículo de vaca			
Biosíntesis de triacilglicerol	1.41 E-03	6.90	4/58
Via STAT3	1.83 E -03	4.80	5/104
Maduración de los fagosomas	1.97 E-03	3.90	6/155
Papel de la señalización de JAK2*	2.84 E -03	8.80	.3/34
Señalización de la oncostatin M	4.53 E-03	7.50	.3/40

* hormona parecida a las citokinas.

El análisis del IPA mostró que estaban activados los genes o moléculas de las siguientes rutas HNF4A, RICTOR, EIF4E, 1-2-dithiol-3-thione, STI926 en los búfalos, sin estar ninguno caracterizado en búfalos y para las vacas fueron factor transformante beta 1 (TGFB1), Receptor de estrógenos tipo B2 (ERBB2), dexametasona, beta-estradiol, D-glucosa (Cuadro 2).

Cuadro 2: Principales reguladores corriente arriba

	Valor p
Búfalos	
HNF4A	2.70 E-27
RICTOR	2.15 E -17
EIF4E	1.38 E -15
1,2-dithiol-3-thione	4.9 E-15
STI926	5.64 E-15
Vacas	
TGFB1	7.64 E-09
ERBB2	1.2 E -08
Dexametasona	1.3 E E-07
beta-estradiol	5.21 E-07
D-glucosa	2.10 E -06

Las redes funcionales más importantes para los búfalos fueron: 1) transporte molecular, tráfico del RNA y modificaciones postraduccionales, 2) señalización celular, modificaciones postraduccionales, y síntesis proteica, 3) ensamblaje y organización celular, desórdenes del

desarrollo y hereditarios, 4) modificaciones postranscripcionales del RNA, síntesis proteica y expresión génica, mantenimiento y función celular, modificaciones postraduccionales y doblamiento de proteínas. Para las vacas 1) organización y ensamblaje de la célula, desordenes del desarrollo y enfermedades neurológicas, 2) metabolismo de lípidos, bioquímica de moléculas pequeñas, señalización e interacción intracelular, 3) muerte y supervivencia de las células, interacción entre ellas y cáncer, 4) transporte molecular, señalización celular y metabolismo de vitaminas y minerales (Cuadro 3).

Cuadro 3: Redes funcionales más importantes

Nombre de las redes y sus funciones	Puntaje
Búfalos	
Transporte molecular, tráfico del RNA y modificaciones postraduccionales	153
Señalización celular, modificaciones postraduccionales, y síntesis proteica	146
Ensamblaje y organización celular, desordenes del Desarrollo y hereditarios	141
Modificaciones postranscripcionales del RNA, síntesis proteica y expresión génica	139
Mantenimiento y función celular, modificaciones postraduccionales y doblamiento de proteínas	123
Vacas	
Nombre de las redes y sus funciones	Score
Organización y ensamblaje de la célula, desordenes del Desarrollo y enfermedades neurológicas	163
Metabolismo de lípidos, bioquímica de moléculas pequeñas, señalización e interacción intracelular	79
Muerte y sobrevivencia de las células, interacción entre ellas y cáncer	73
Transporte molecular, señalización celular y metabolismo de vitaminas y minerales	11

En este trabajo se comparó: la expresión génica en folículos preovulatorios entre dos especies muy relacionadas, la forma de hacerlo es un abordaje novedoso para tener más conocimiento. A primera vista no se encuentra una estricta relación entre los conceptos enunciados en la introducción y los resultados del experimento. Este hecho se puede considerar para ser discutido pues antes de hacer el análisis el pensamiento de los investigadores estaba centrado en el conocimiento existente sobre el control endocrino y el desarrollo del folículo en las especies y los resultados muestran una información asociada a aspectos relacionados casi exclusivamente con biología celular y molecular.

Es importante resaltar la dificultad para encontrar información comparable, y dado el enfoque biológico del escrito, se decide evitar la discusión técnica sobre la forma de obtención de los datos y su análisis, que es tan frecuente en este tipo de publicaciones. En un trabajo previo del grupo⁽²⁰⁾, donde se describe lo informado en los dos artículos evaluados en este estudio,

se muestra que en los folículos preovulatorios de vacas y búfalos solamente hay coincidencia en la expresión de tres genes (20 %): activador tisular del plasminógeno (PLAT), regulador agudo esteroideogénico, (STAR), receptor parecido I al factor II de coagulación (F2RL-1), con diferencias en los niveles de expresión (expresión relativa) 9,7 vs 17,5, 8,74 vs 3,4, and 7,7 vs 5,3 veces para PLAT, STAR y F2RL-1 respectivamente, mostrando las diferencias entre las especies. Adicionalmente no se ha informado que alguno de los genes encontrados tenga que ver directamente sobre la ovulación, el desarrollo folicular o que sean marcadores de los mismos procesos biológicos.

PLAT es una serina-proteasa secretada que convierte la proenzima plasminógeno en plasmina, una proteína fibrinolítica. Un aumento de su función causa hiperfibrinólisis que se evidencia por el excesivo sangrado y una disminución de su función causa hipofibrinólisis que se evidencia por trombosis y embolismo se ha informado sobre expresada en células de granulosa de folículos ovulatorios y se ha asociado con la ruptura folicular⁽²¹⁾.

STAR, tiene un papel importante en la regulación aguda de la síntesis de hormonas esteroidales, permite el rompimiento del colesterol a pregnenolona para facilitar su transporte de la membrana externa a la interna en la mitocondria. En búfalos se ha informado que la expresión esta aumentada (up regulated) en las células de granulosa y pared folicular después del tratamiento de hormona de crecimiento bovina⁽¹⁸⁾, adicionalmente un sinergismo entre el factor de crecimiento insulinoide 1 y las gonadotropinas para aumentar la expresión de STAR⁽²²⁾.

F2RL-1, es una proteína que pertenece a la familia de las que están asociadas al receptor tipo I de las proteínas G, tiene además función sobre la respuesta inflamatoria, en la inmunidad innata y adaptativa⁽²³⁾. La señalización a través de este gen (F2RL-1) media la citogénesis *in vitro* de las células endoteliales y promueve la vasodilatación y permeabilidad microvascular, pasos fundamentales de la angiogénesis. Se ha observado la sobreexpresión del gen F2RL-1 que explican en parte los cambios de crecimiento de los vasos sanguíneos de las células de la teca, y la invasión de las células de granulosa murales después de la ruptura folicular⁽²⁴⁾.

Aunque hay una correspondencia baja entre las dos especies, los genes comunes están asociados a los mecanismos de ovulación, genes asociados con la forma como la célula realiza su función. No se observan genes expresados diferencialmente asociados a los fenómenos que dirigen el proceso como gonadotropinas o esteroides sexuales. En consecuencia, se debe encontrar una forma nueva de ver y analizar los datos obtenidos, ya que lo encontrado es más bien la descripción de cómo se ejecuta un fenómeno que en este caso serían los factores proteolíticos para el rompimiento del folículo, los cambios en la vasculatura para el remodelamiento del órgano y la acumulación de estrógenos para generar el pico de LH. Para algunos autores la ovulación ha sido asociada con inflamación⁽²⁵⁾, pudiera entonces suponerse que las dos especies hacen lo mismo, con un grupo de moléculas maestras

generales y otro de efectoras que pueden ser muy específicas y marcar las diferencias observadas.

La ubiquitinación de proteínas es la ruta más importante para la degradación de proteínas reguladoras de vida media. Hatzirodos *et al*⁽²⁰⁾, encontraron que esta ruta está involucrada en la transición de un folículo pequeño a grande. Otros investigadores, lo encontraron como regulador de los receptores de andrógenos en los humanos⁽²⁶⁾.

Las mitocondrias son los principales consumidores de oxígeno de la célula; se ha informado el efecto que tiene el buen funcionamiento de la vía para la competencia del oocito por su papel en la formación de especies reactivas de oxígeno⁽²⁷⁾. En mujeres, se ha propuesto la transferencia de mitocondrias como una alternativa para el tratamiento de oocitos provenientes de pacientes con enfermedades que incluyen alteraciones en las mitocondrias⁽²⁸⁾, también en humanos obesos que la disfunción mitocondrial se asocia con alteraciones en la fertilidad. Se ha informado en búfalos que la suplementación de los medios de maduración para producir embriones *in vitro*, con cistina con o sin cisteamina incrementa significativamente la proporción de oocitos que presentan fertilización normal, clivaje y producción de blastocistos⁽²⁹⁾.

La fosforilación oxidativa es el proceso mediante el cual la célula produce ATP. Li *et al*⁽⁶⁾ reportaron en los búfalos que la fosforilación oxidativa es importante para las primeras fases del desarrollo folicular. También se ha informado su rol en el proceso ovulatorio dada la naturaleza hipóxica del procesos, se ha mostrado evidencia en la que el folículo necesita producir más moléculas para la respuesta hipóxica en los folículos antrales preovulatorios⁽⁵⁾. Las sirtuinas pertenecen a la clase III de enzimas deacetilasas que utilizan el NAD⁺ como sustrato para realizar su función, se ha reportado que existen 7 en mamíferos con múltiples funciones (SIRT 1-7), tienen función como reguladores de la transcripción en envejecimiento, metabolismo, cáncer, inflamación, reparación del ADN y respuesta celular al stress⁽³⁰⁾.

Se ha reportado que SIRT1, SIRT2 and SIRT3 tienen función protectora para el envejecimiento del oocito después de la ovulación, además SIRT3 tiene un papel en la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la foliculogénesis y los procesos de luteinización de las células de granulosa⁽³¹⁾. Pacella-Ince, *et al*, han descrito que niveles bajos de mRNA de la SIRT 5 mitocondrial están asociados con una reducida reserva ovárica y envejecimiento del ovario en humanos⁽³²⁾.

Dentro de las vías metabólicas más importantes en vacas se encuentran:

Biosíntesis de triacilglicerol. En la literatura está ampliamente documentado el efecto de las gotas lipídicas sobre la calidad y función de los oocitos⁽³³⁾. Hoy en día se consideran como

un organelo aparte con sus propias enzimas asociadas. En humanos, el perfil lipídico de las células de granulosa se ha asociado con éxito en la gestación, en oocitos de vaca ha sido asociada con calidad, y en humanos con efecto en la maduración⁽³⁴⁾.

La maduración del fagosoma es un proceso en el cual algunas partículas que se internalizan se mueven sobre estructuras acidificadas, que se integran en un mecanismo de apoptosis. Este proceso necesariamente involucra la maduración, que se puede ver por la fusión secuencial de los diferentes estadios de los lisosomas que terminan la formación de un fagolisosoma. Hay muy poca información sobre el papel de esta vía en la formación del folículo o la calidad del oocito; se ha sugerido como una vía alternativa para el control de la muerte del oocito y que puede activarse durante la formación del folículo para los procesos de autofagia. La alteración de algunos genes que codifican proteínas para autofagia causan una gran pérdida de oocitos, sugiriendo un papel de la autofagia en la regulación de su sobrevivencia⁽³⁵⁾.

Las quinasas Janus, son una familia de 4 tirosina quinasas. Estas juegan un papel importante en el crecimiento celular, supervivencia y diferenciación; se expresan ampliamente en el folículo preovulatorio y se inhibe su expresión por la inyección intrafolicular, también se ha informado que en las células de granulosa, la IL-6 promueve la expresión inducida por FSH de VEGF por la vía JAK/STAT3⁽³⁶⁾.

Las citoquinas son los principales mediadores intercelulares, estos activan en el ovario células inmunes y no inmunes que facilitan la constante reorganización del estroma ovárico a través de vías proteolíticas, facilitando las modificaciones de la membrana basal de las células de granulosa, y la invasión vascular endotelial. Martins, *et al.*, informaron que los receptores para la oncostatina M están regulados en las células de granulosa durante la atresia folicular, ovulación y luteólisis, y que la proteína oncostatina proveniente de otras células regulan la función de genes de viabilidad celular en la granulosa y las células luteales⁽³⁷⁾. Muchas moléculas involucradas en desarrollo folicular que afectan las señales para la ovulación disparan la expresión de citoquinas como TNFa, interleukina7, and CDKN1A⁽³⁸⁾.

Cuando se hace la comparación de la expresión de los genes entre las dos especies y se analizan las 10 vías canónicas activadas con mayor valor de P, solo se comparten unas pocas con los análisis individuales, para el caso del búfalo 5 de las 10, mientras que para las vacas solo 1 (Cuadro 4).

Cuadro 4: Comparación de las principales rutas metabólicas en las dos especies

Rutas metabólicas	Valor p	Relación	Score- z
Vía de señalización de las sirtuinas	5.02E+00	1.63E-01	2.191
Papel de las proteínas CHK. Proteínas en el control del ciclo celular	4.74E+00	2.78E-01	1.897
Fosforilación oxidativa	4.61E+00	2.19E-01	-4.583
Biosíntesis de novo de ribonucleótidos de piridina	4.38E+00	2.89E-01	-1.941
Papel mitótico de las Polo-like quinasas	4.07E+00	2.46E-01	-1.667
Inter conversión de los ribonucleótidos de pirimidina	3.93E+00	2.79E-01	-1.732
Señalización de andrógenos	3.85E+00	1.83E-01	0.378
Degradación de 3-phosphoinositidol	3.76E+00	1.74E-01	-1.569
Regulación de las señales de eIF4 and p70S6K	3.67E+00	1.72E-01	0.632
Biosíntesis de D-mio-inositol (1,4,5,6)-tetrakisfosfato	3.65E+00	1.78E-01	-1.225

De los reguladores corriente arriba, en los búfalos:

El factor nuclear del hepatocito 4A (HNF4A), está involucrado en la gluconeogénesis y el metabolismo lipídico. Este factor ha sido reportado por Khan *et al*⁽¹¹⁾, como un regulador corriente arriba en células de granulosa de vacas después de ser estimulados con FSH. RIPTOR, es un gen que produce una molécula que, acompaña al blanco de la rapamicina. Se ha informado en células humanas que una quinasa asociada a mTOR es necesaria para que se fosforile la Ser⁴⁷³, inhibiendo la vía metabólica Akt/PKB que está involucrada en apoptosis y maduración de oocito.

El factor de inicio de la traducción, EIF4E, produce una proteína que ayuda al inicio de la traducción reclutando ribosomas en el extremo 5'- de la subunidad, limita el inicio de la traducción. Se ha informado que su función se incrementa en la transición de folículo primordial a folículo primario⁽³⁹⁾, en el oocito para el inicio de la traducción de mRNA asociados a la continuación de la meiosis, y en la inhibición de la función de TORC1 para el consumo de los aminoácidos.

IPA también informa sobre el papel de algunas moléculas reguladoras de la función génica, evalúa los genes asociados al control de la función como 1-2-dithiol-3-thiona que tiene efecto sobre enzimas antioxidantes y ST1926 que es una molécula parecida al ácido retinoico con

efectos sobre el crecimiento y la diferenciación⁽⁴⁰⁾. No hay reportes de la acción de estas moléculas sobre la función de las células de granulosa.

De los reguladores corriente arriba en vacas:

El factor transformante beta-1 pertenece a la superfamilia de las proteínas de los factores transformantes beta, han sido descritos en una gran cantidad de actividades de regulación en el ovario, desarrollo folicular y ovulación, en diferentes especies. Landry, *et al* informan que tiene un papel en la producción de un oocito competente y en la inducción de atresia en el caso de folículos persistentes⁽¹⁰⁾.

ERBB2 codifica una tirosina quinasa, que pertenece a la familia de los receptores epidermales de crecimiento, la amplificación o sobreexpresión de este gen ha sido asociada con tumores de mama y de ovario⁽³⁰⁾ y el desarrollo folicular⁽¹⁹⁾, en la regulación de la expresión del gen de supresión tumoral TP53 durante la proliferación de las células de granulosa bajo el estímulo de la FSH y después del pico de LH⁽⁴¹⁾.

Estrógenos, Dexametasona y D- Glucosa son moléculas reportadas con efectos sobre el desarrollo folicular de los vacunos⁽⁴²⁾. La estrona y el estradiol, son hormonas esteroidales sintetizadas en el ovario, críticas para la función reproductiva, la principal enzima de esta ruta es la aromatasas CPY19A1⁽⁴³⁾.

En este punto es fácilmente entendible, que, a pesar de ser bovinos, cada especie tiene su forma diferente de realizar el fenómeno, y ese es uno de los resultados importantes de este trabajo, la evidencia muestra que cada especie desarrolla el folículo de forma o modo diferente. Dado que se observa que cada especie ovula con eventos distintos, no se puede cumplir el objetivo de explicar las diferencias reproductivas en el comportamiento reproductivo entre estas dos especies.

La alta correspondencia del resultado obtenido cuando se analizan las redes o funciones biológicas más frecuentes en el evento estudiado entre las dos especies analizadas, se muestra que ambas están teniendo el mismo evento biológico: crecimiento de una estructura dentro del organismo con alta producción metabólica, proliferación celular, producción de señales para todos los eventos que sucederán, cuya consecuencia es la ovulación. La comparación entre redes muestra como hacen lo mismo con un número de moléculas diferente, los búfalos involucran más moléculas que las vacas lo que les pudiera dar una ventaja para la ovulación, al tener más opciones de rutas celulares disponibles. En el análisis comparativo entre especies, los búfalos no comparten solamente la vía del metabolismo de lípidos con las vacas, sugiriendo que deberían existir diferencias a este nivel en el líquido folicular o los oocitos, sin que hasta la fecha haya reportes al respecto en la literatura.

Solo algunas publicaciones en reproducción, han tratado de hacer comparaciones entre búfalos y vacas con enfoque global del problema, es interesante ver como la evidencia de las diferencias está en aumento. Se puede encontrar con facilidad reportes sobre las diferencias en genes específicos en eventos puntuales como la señalización para el reinicio de la meiosis⁽⁴⁴⁾, o el papel de los factores transformantes sobre el desarrollo folicular⁽⁴⁵⁾. Para la fisiología de las células de granulosa y su papel en el desarrollo folicular se conoce mucha información en vacas, pero es escasa en búfalos y mucho menos su comparación. Solo se encuentra un artículo en el estudio de la transcriptómica de las células de granulosa bufalinas, utilizando RNA seq y material de planta de faenado, encontrando expresión diferencial en 595 genes, cuando se comparan los estados iniciales con los finales del desarrollo folicular⁽⁵⁾.

La comparación entre especies es un abordaje novedoso en el área de la biología reproductiva, estudiar el mismo fenómeno en igualdad de condiciones entre búfalos y vacas muestra como cada especie ha desarrollado su propia forma de realizar sus procesos, que la regulación de los mismos tienen vías diferentes entre *Bos indicus* y *Bubalus bubalis*, por lo cual los fenómenos deben estudiarse de forma particular para cada especie y que debe evitarse la extrapolación de la información obtenida entre especies y ser base para el análisis de la complejidad de los fenómenos estudiados, con la obligatoriedad de verlos de una manera diferente, no reduccionista.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín y la Asociación Colombiana de Criadores de Búfalos por la financiación de este trabajo. A Minciencias por la financiación del estudiante Doctoral JAB.

Literatura citada:

1. Buntjer JB, Otsen M, Nijman IJ, Kuiper MT, Lenstra JA. Phylogeny of bovine species based on AFLP fingerprinting. *Heredity* 2002;88(1):46-51.
2. Berdugo J, Posada I, Angel J. Need of reevaluation of the parameters of semen straws to be used in artificial insemination programs. *Ital J Anim Sci* 2007;6(suppl 2):619-21.
3. Drost M. Bubaline versus bovine reproduction. *Theriogenology* 2007;68(3):447-449.
4. Santos SS, Ferreira MA, Lima MY, Sampaio RV, Cordeiro MS, Silva TV, *et al.* Quantification, morphology and ultrastructure of preantral follicles of buffalo (*Bubalus bubalis*) foetuses. *Reprod Dom Anim* 2011;46(1):e17-22.

5. Gimenes LU, Fantinato Neto P, Arango JS, Ayres H, Baruselli PS. Follicular dynamics of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. *Anim Reprod* 2009;6(1):256.
6. Li J, Liu J, Campanile G, Plastow G, Zhang C, Wang Z, *et al.* Novel insights into the genetic basis of buffalo reproductive performance. *BMC Genom* 2018;19(1):1-1.
7. Blondin P, Vigneault C, Nivet AL, Sirard MA. Improving oocyte quality in cows and heifers-What have we learned so far? *Anim Reprod* 2018;9(3):281-290.
8. Baldrigli JM, Sá Filho MF, Batista EOS, Lopes RN, Visintin JA, Baruselli PS, *et al.* Anti-mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. *Reprod Domest Anim* 2014;49(6):1015–1020.
9. Nivet AL, Bunel A, Labrecque R, Belanger J, Vigneault C, Blondin P, *et al.* FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction* 2012;143(2):165–171.
10. Carvalho NA, Soares JG, Porto Filho RM, Gimenes LU, Souza DC, Nichi M, *et al.* Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a timed artificial insemination protocol in buffalo during the nonbreeding season. *Theriogenology* 2013;79(3):423-428.
11. Khan DR, Landry DA, Fournier É, Vigneault C, Blondin P, Sirard MA. Transcriptome meta-analysis of three follicular compartments and its correlation with ovarian follicle maturity and oocyte developmental competence in cows. *Physiol Genom* 2016;48(8):633-643.
12. Fu Q, Huang Y, Wang Z, Chen F, Huang D, Lu Y, *et al.* Proteome profile and quantitative proteomic analysis of buffalo (*Bubalus bubalis*) follicular fluid during follicle development. *Int J Mol Sci* 2016;17(5):618.
13. Mondadori RG, Luque MC, Santin TR, Báo SN. Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. *Anim Rep Sci* 2007;97(3-4):323-333.
14. Robert C. Microarray analysis of gene expression during early development: A cautionary overview. *Reproduction* 2010;140(6):787–801.
15. Krämer A, Green J, Pollard Jr J, Tugendreich S. Causal analysis approaches in ingenuity pathway analysis. *Bioinformatics* 2014;30(4):523-530.

16. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, *et al.* The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 2006;313(5795):1929-1935.
17. Abatangelo L, Maglietta R, Distaso A, D'Addabbo A, Creanza TM, Mukherjee S, *et al.* Comparative study of gene set enrichment methods. *BMC Bioinfo* 2009;10(1):1-2.
18. Pollard Jr J, Butte AJ, Hoberman S, Joshi M, Levy J, Pappo J. A computational model to define the molecular causes of type 2 diabetes mellitus. *Diab Tech Ther* 2005;7(2):323-336.
19. Rao JU, Shah KB, Puttaiah J, Rudraiah M. Gene expression profiling of preovulatory follicle in the buffalo cow: effects of increased IGF-I concentration on periovulatory events. *PloS One* 2011;6(6):e20754.
20. Hatzirodos N, Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Harland ML, Morris SE, Rodgers RJ. Transcriptome profiling of granulosa cells from bovine ovarian follicles during atresia. *BMC Genom* 2014;15(1):1-26.
21. Berdugo JA, Echeverri JJ, Tarazona AM, López A. Differences in transcriptomic data from preovulatory follicles of buffalo (*Bubalus bubalis*) and (*Bos indicus*) cattle: A meta-analysis No Title. *Anim Reprod* 2018;15(Suppl 1):1161.
22. Lussier JG, Diouf MN, Lévesque V, Sirois J, Ndiaye K. Gene expression profiling of upregulated mRNAs in granulosa cells of bovine ovulatory follicles following stimulation with hCG. *Reprod Biol Endocrinol* 2017;15(1):1-6.
23. Natesampillai S, Kerkvliet J, Leung PC, Veldhuis JD. Regulation of Kruppel-like factor 4, 9, and 13 genes and the steroidogenic genes LDLR, StAR, and CYP11A in ovarian granulosa cells. *Am J Physiol-End Metab* 2008;294(2):E385-91.
24. Castilho AC, Dalanezi FM, Franchi FF, Price CA, Ferreira JC, Trevisol E, *et al.* Expression of fibroblast growth factor 22 (FGF22) and Its receptor, FGFR1B, during development and regression of bovine corpus luteum. *Theriogenology* 2019;125:1-5.
25. Harlow CR, Hillier SG. Connective tissue growth factor in the ovarian paracrine system. *Mol Cell End* 2002;187(1-2):23-27.
26. Ruebel ML, Cotter M, Sims CR, Moutos DM, Badger TM, Cleves MA, *et al.* Obesity modulates inflammation and lipid metabolism oocyte gene expression: a single-cell transcriptome perspective. *J Clin End Metab* 2017;102(6):2029-38.
27. Lim JJ, Lima PD, Salehi R, Lee DR, Tsang BK. Regulation of androgen receptor signaling by ubiquitination during folliculogenesis and its possible dysregulation in polycystic ovarian syndrome. *Scientific Reports* 2017;31;7(1):1-2.

28. Benkhalifa M, Ferreira YJ, Chahine H, Louanjli N, Miron P, Merviel P, *et al.* Mitochondria: participation to infertility as source of energy and cause of senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;55:60-64.
29. Cecchino GN, Seli E, Da Motta EL, García-Velasco JA. The role of mitochondrial activity in female fertility and assisted reproductive technologies: overview and current insights. *Reprod Biomed Online* 2018;36(6):686-697.
30. Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay I, *et al.* Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology* 2006;65(2):275–287.
31. Li J, Li Z, Liu S, Zia R, Liang A, Yang L. Transcriptome studies of granulosa cells at different stages of ovarian follicular development in buffalo. *Anim Reprod Sci* 2017;(187):181–192.
32. Sirotkin AV. The role and application of sirtuins and mTOR signaling in the control of ovarian functions. *Cells* 2016;5(4):42.
33. Fu H, Wada-Hiraike O, Hirano M, Kawamura Y, Sakurabashi A, Shirane A, *et al.* SIRT3 positively regulates the expression of folliculogenesis-and luteinization-related genes and progesterone secretion by manipulating oxidative stress in human luteinized granulosa cells. *Endocrinol* 2014;155(8):3079-3087.
34. Pacella-Ince L, Zander-Fox DL, Lane M. Mitochondrial SIRT5 is present in follicular cells and is altered by reduced ovarian reserve and advanced maternal age. *Reprod Fert Develop* 2014;26(8):1072-1083.
35. Dunning KR, Russell DL, Robker RL. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction* 2014;148(1):R15-27.
36. Fayezi S, Ghaffari-Novin M, Darabi M, Norouzian M, Nouri M, Farzadi L, *et al.* Primary culture of human cumulus cells requires stearoyl-coenzyme a desaturase 1 activity for steroidogenesis and enhancing oocyte *in vitro* maturation. *Reprod Sci* 2018;(6):844-853.
37. Gawriluk TR, Hale AN, Flaws JA, Dillon CP, Green DR, Rucker EB. Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary. *Reproduction* 2011;141(6):759.
38. Yang M, Wang L, Wang X, Wang X, Yang Z LJ. IL-6 promotes FSH-induced VEGF expression through JAK/STAT3 signaling pathway in bovine granulosa cells. *Cell Physiol Biochem* 2017;44(1):293–302.

39. Martins KR, Haas CS, Ferst, JG, Rovani, MT, Goetten AL, Duggavathi R. *et al.* Oncostatin M and its receptors mRNA regulation in bovine granulosa and luteal cells. *Theriogenology* 2019;125:324–330.
40. Stassi AF, Baravalle ME, Belotti EM, Rey F, Gareis NC, Díaz PU, *et al.* Altered expression of cytokines IL-1 α , IL-6, IL-8 and TNF- α in bovine follicular persistence. *Theriogenology* 2017;97:104-112.
41. Ernst EH, Grøndahl ML, Grund S, Hardy K, Heuck A, Sunde L, Franks S, *et al.* Dormancy and activation of human oocytes from primordial and primary follicles: molecular clues to oocyte regulation. *Hum Reprod* 2017;32(8):1684-1700.
42. El Hajj H, Khalil B, Ghandour B, Nasr R, Shahine S, Ghantous A, *et al.* Preclinical efficacy of the synthetic retinoid ST1926 for treating adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 2014;124(13):2072-2080.
43. Sirotkin AV, Ovcharenko D, Benčo A, Mlynček M. Protein kinases controlling PCNA and p53 expression in human ovarian cells. *Funct Integr Genom* 2009;(2):185-195.
44. Noma N, Kawashima I, Fan HY, Fujita Y, Kawai T, Tomoda Y, *et al.* LH-induced neuregulin 1 (NRG1) type III transcripts control granulosa cell differentiation and oocyte maturation. *Mol End* 2011;25(1):104-116.
45. Baufeld A, Vanselow J. A tissue culture model of estrogen-producing primary bovine granulosa cells. *Journal of visualized experiments: JoVE* 2018;(139):58208.