



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ANÁLISIS DEL RECEPTOR DE LA HORMONA LUTEINIZANTE
(LHR) DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR DE LA PERRA.**

FERNANDO IGNACIO RAMÍREZ MOYANO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESORA GUÍA: DRA. MONICA DE LOS REYES SOLOVERA

Financiamiento: FONDECYT 1140658

Santiago, Chile

2017



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ANÁLISIS DEL RECEPTOR DE LA HORMONA LUTEINIZANTE
(LHR) DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR DE LA PERRA.**

FERNANDO IGNACIO RAMÍREZ MOYANO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

NOTAFINAL:

FIRMA

PROFESORA GUÍA: Mónica De Los Reyes S.

PROFESOR CONSEJERO: Oscar Peralta T

PROFESOR CONSEJERO: José Manuel Yáñez.

.....
.....
.....

FINANCIAMIENTO: Proyecto FONDECYT 1140658

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Debo partir agradeciendo a todos los miembros que componen el Laboratorio de Reproducción de la Universidad, partiendo por la Dra. Mónica de Los Reyes por ser una persona referente durante mis años de universidad, una gran profesora y una gran guía, eternamente agradecido por su infinita paciencia y su constante preocupación frente al trabajo.

Al Dr. Jaime Palomino por ser uno de los pilares fundamentales en este proyecto, por su disposición a enseñar paso a paso cada protocolo, su gran disposición, ayuda y por tener siempre la altura de miras y la cabeza fría en los momentos más complicados de todo experimento.

A mis compañeros de laboratorio, que son prácticamente que le dan vida y movimiento al lugar, con sus risas, conversaciones y música, generando una instancia muy acogedora para poder trabajar. Muchas gracias a Tomás, Igor, Karla, Georgi, Pablo y Jorge.

Finalmente dedicar todo este trabajo y el esfuerzo que abarcó su realización a mi familia, que entregaron su apoyo incondicional en todo momento, y a mis compañeros y amigos, quienes desde el comienzo de esta maratón estuvieron a mi lado.

Muchas gracias a todos!

Fernando.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1. Características y desarrollo Folicular en la perra	5
2. Hormona Luteinizante	5
3. Receptor de LH	7
4. Luteinización	8
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
1. Recolección de muestras	10
2. Procesamiento de muestras	10
3. q-PCR	11
4. Western Blot	13
5. Análisis Estadístico	17
RESULTADOS	16
Expresión Génica.	16
Evaluación del receptor de LH por Western Blot	18
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	22
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	25
ANEXOS	33

RESUMEN

La hembra canina presenta un ciclo estral con ciertas características únicas si se compara con el de otras especies mamíferas. A lo largo del ciclo estral en la perra, se describe la secreción de hormona luteinizante (LH), la cual cumple variadas funciones en el ámbito reproductivo. Esta gonadotropina ejerce su efecto a través de su receptor, LHR, el cual corresponde a una glicoproteína de transmembrana perteneciente a la superfamilia de receptores asociados a proteína G (GPCR) y que ha sido localizado en diversos tipos celulares, incluyendo el folículo ovárico; sin embargo, la dinámica de expresión de los receptores para LH durante el ciclo reproductivo no se había descrito en la perra. El objetivo de este trabajo fue estudiar a través de q-PCR la expresión génica (mRNA-LHR) de este receptor como también, mediante western blot, la proteína (LHR) en los folículos ováricos de perras a través del desarrollo folicular en las distintas etapas del ciclo estral mediante lupa estereoscópica, se aislaron en forma mecánica células de la teca y de la granulosa tanto de folículos preantrales como antrales provenientes de ovarios de perras en anestro, proestro/estro y diestro. Los resultados, analizados mediante ANOVA y correlación de Pearson, mostraron que los niveles de mRNA-LHR aumentaron a medida que el desarrollo folicular avanzó de anestro a proestro/estro y disminuyendo al pasar a diestro. En el caso de la proteína LHR se identificó una forma de 90 kDa como una de 67 kDa, sin una diferencia significativa entre el volumen de ambas en anestro, pero si presentes en algunos tamaños foliculares de proestro/estro y diestro. El análisis correlativo entre la expresión génica y la proteína presentaron valores positivos muy cercanos a 1 para la forma inmadura del receptor, mientras que, para la forma madura, si bien fueron igualmente positivos, estuvieron más alejados del valor mencionado. Tanto el mRNA del LHR como ambas formas proteicas fueron detectadas desde los folículos preantrales y a lo largo de todo el ciclo folicular. Las proteínas de LHR encontradas corresponderían a la forma madura e inmadura del receptor, siendo esta última la más abundante.

ABSTRACT

The estrous cycle in canines has especial features compared to other mammal species. However, some of the aspects that affect follicular development are still unknown. The secretion of the Luteinizing Hormone (LH) has been described in dogs throughout the entire estrous cycle, playing an important role in reproduction processes. This gonadotrophin exerts its effects through its receptor, LHR, which corresponds to a transmembrane glycoprotein belonging to the G protein couple receptor (GPCR) superfamily that has been localized in many cellular types, including ovarian follicles. However, the expression dynamics of the LH receptors during the reproductive cycle had not been described in the bitch. The objective of this study was to know the gene expression (mRNA-LHR) and also the presence of its encoded protein LHR in the ovarian follicles throughout follicular development over the estrous cycle. Theca and granulosa cells from antral and preantral follicles of ovaries from adult bitches in anestrus, proestrous/estrous and diestrus were isolated mechanically under the stereoscope and evaluated by using q-PCR and western blot analyses. The results were analyzed through ANOVA and Pearson Correlation, using a significance of $P < 0.05$. Both mRNA LHR and LHR proteins were detected from preantral follicles over the reproductive cycle. During anestrus and proestrous/estrous the levels of the mRNA-LHR increased ($P < 0,05$) but during diestrus the messenger levels decreased ($P < 0,05$). A 90 kDa and a67 kDa forms of the LHR protein were identified by western blot analyses, these would correspond to the mature and immature form of the receptor respectively. The immature form was the most abundant in all follicle types.

The correlation between the gene expression and the presence of the protein was positive ($P < 0,05$) for both mature and immature forms.

INTRODUCCIÓN

La hembra canina posee un ciclo reproductivo de tipo monoéstrico no estacional y ovulación espontánea, con un proestro y estro de alrededor de 9 días cada uno, un diestro de 65 días y un anestro de aproximadamente de 150 días (Valentini *et al.*, 2010; Conannon, 2011).

El ciclo reproductivo presenta aspectos particulares en comparación al de las demás especies mamíferas donde muchos mecanismos específicos aún son desconocidos (Conannon, 2011). Dentro de éstas características, probablemente la más significativa es la ovulación de ovocitos inmaduros en estado de vesícula germinativa (GV) y por tanto sin reinicio meiótico a nivel folicular (Chastant-Mailard *et al.*, 2011; De los Reyes *et al.*, 2011), alcanzando el estado de segunda metafase en el oviducto 56 a 72 horas luego de su ovulación (Tsutsui, 1989; Reynaud *et al.*, 2005).

Aunque no está descrito en la perra la dinámica folicular y la existencia de ondas, durante el anestro las concentraciones de FSH permiten el crecimiento de folículos antrales (Conannon, 2009) 60 a 100 días antes de la ovulación (England *et al.*, 2009). Durante todo el ciclo de la perra se describen pulsos de LH (Conannon, 2011) pero tanto sus niveles pulsatilidad aumentan a medida que se avanza de proestro hacia el estro (Conannon, 2011).

Esta hormona puede actuar debido a la presencia de su receptor LHR, el cual corresponde a una glicoproteína de transmembrana perteneciente a la familia de receptores acoplados a la proteína G (Ascoli *et al.*, 2002; Menon *et al.*, 2004; Menon y Menon, 2012; Choi y Smitz, 2014). Este receptor está encargado de la unión, entregando así la especificidad de respuesta hormonal (Sun y Davies, 1995; Choi y Smitz, 2014).

Los receptores de LH en cánidos han sido descritos durante la etapa de proestro y mediante técnica de autoradiografía (Saint-Dizier *et al.*, 2008). En otras especies se describe su presencia en células de la teca de folículos antrales, con un aumento a medida que el folículo crece en respuesta a la FSH (Menon, *et al.*, 2011) y tanto el estradiol como factores paracrinos/autocrinos influyen en su expresión en otras especies estudiadas (Menon, *et al.*, 2011) mientras que su inhibición ocurre en etapas tempranas de la foliculogénesis en muchas

hembras mamíferas e impide la luteinización prematura de los folículos ováricos (Eppig, 2001).

En la perra a diferencia de los demás mamíferos, la luteinización folicular comienza antes del momento de la ovulación (Saint-Dizier *et al.*, 2008; Kowalewski *et al.*, 2015) evidenciándose un incremento preovulatorio de progesterona sérica (Fernandez *et al.*, 2016), antes del alza preovulatoria de LH (Reynaud, *et al.*, 2009). Sin embargo, los factores responsables de esta inducción aún son desconocidos.

La luteinización preovulatoria de los folículos de la perra puede implicar una dinámica diferente de los receptores para LH en los folículos caninos, siendo el análisis de la expresión de este receptor un factor indispensable para ayudar a entender los procesos fisiológicos que ocurren durante el desarrollo de la foliculogénesis en esta especie.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Características y desarrollo Folicular en la perra

Durante el desarrollo folicular al momento de la formación del antro ocurre una transición de una regulación básicamente paracrina a una además endocrino, dada por las gonadotrofinas hipofisiarias (Fair, 2003; Concannon, 2009).

Durante la fase pre-antral el folículo crece en concomitancia con el ovocito para luego alcanzar la fase antral de desarrollo (Eppig, 2001), en la transición del folículo pre antral a folículo antral el ovocito adquiere la competencia de maduración y posteriormente para el desarrollo (De los Reyes *et al.*, 2014). El crecimiento folicular antral temprano determina la capacidad de respuesta y la dependencia del folículo en la regulación extra-ovárica gobernada por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Rodrigues y Rodrigues, 2003). Bajo la influencia de gonadotrofinas, el antro crece, resultando posteriormente en la formación de un folículo preovulatorio (De los Reyes *et al.*, 2014). En perras ciclantes, los folículos antrales de 0,2 – 0,6 mm de tamaño al inicio del anestro, pueden llegar a 1 mm hacia el final del anestro (Andersen *et al.*, 1973), para después en las etapas finales del crecimiento folicular en estro, estos pueden llegar a tamaños de 7,5 mm en el momento de la ovulación (Reynaud *et al.*, 2012).

2. Hormona Luteinizante

La Hormona Luteinizante (LH) es una de las gonadotrofinas hipofisiarias que corresponde a una glicoproteína heterodimérica compuesta por una subunidad α y una β asociadas por uniones no covalentes (Choi y Smitz, 2014). En humanos la subunidad α está compuesta por 92 aminoácidos y posee una estructura polipéptida idéntica a la que tiene la FSH, la THS y la hCG, mientras que la subunidad β , compuesta por 121 aminoácidos, posee una estructura aminoacídica única dependiendo de cada hormona ya que es quien confiere la actividad específica (Bulun, 2011). Cada sub unidad es rica en aminoácidos de cisteína y contiene múltiples enlaces disulfuro (Bulun, 2011). La secuencia α es altamente conservada entre diferentes especies mamíferas (idéntica entre bovinos y ovinos, homologa en un 82% entre bovinos y equino y 72% entre bovinos y humanos). Mientras que la composición aminoacídica de la subunidad β es variable dentro de las mismas especies (Muller *et al.*, 2013).

Esta hormona juega un rol de importancia en el ciclo reproductivo, debido a sus funciones en el desarrollo folicular (Choi y Smitz, 2014), esteroidogénesis (Pangas *et al.*, 2015), y ovulación, además de poseer una función luteotrófica post ovulatoria en la mayoría de los mamíferos estudiados (Bulun, 2011), aunque en los caninos esta función es sólo colaborativa (Kowalewski *et al.*, 2015).

En las diferentes especies mamíferas, los niveles de LH varían durante el transcurso del ciclo reproductivo (Aurich, 2011; Bartlewski *et al.*, 2011; Concannon, 2011; Mihm *et al.*, 2011; Soede *et al.*, 2011). En la perra se encuentran bajos durante el anestro temprano ($< 1 - 2$ ng/mL), con pequeñas alzas ocasionales a medida que avanza hacia el anestro medio ($3 - 30$ ng/mL) mientras que en anestro tardío se describen un aumento en la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH con un aumento promedio del 300 al 3000% mayor que los observados en la fase más temprana (Concannon, 2011). Durante el proestro los niveles se vuelven progresivamente más bajos y con pulsos menos detectables debido a la retroalimentación negativa generada por los estrógenos (Concannon 2009). Se describe que la disminución de la proporción estrógeno (E_2)/progesterona (P_4) que ocurre durante el proestro tardío, causada por el aumento de P_4 y de 17-Hidroprogesterona (17α -OH-P) es el desencadenante que lleva al alza de LH y el comienzo de la etapa de estro, causando por una parte la ovulación y por otra el inicio de comportamiento de receptividad sexual por parte de la hembra (Concannon 2009). Siendo esta disminución magnificada y acelerada por retroalimentación positiva causada por el segmento inicial del peak de LH, debido a sus efectos anti-aromatasa y estroidogenesis estimulantes. (Concannon, 2012).

Se describe también que la LH es un factor de importancia para el estímulo del reinicio meiótico y posterior maduración del ovocito antes de la ovulación en la mayoría de las especies mamíferas (Fair, 2003; Palma *et al.*, 2012). Sin embargo, en el caso de los caninos, el alza de LH, si bien estimula la ovulación, no induce el reinicio de la meiosis (Chastant-Mailard *et al.*, 2011), lo que significa que el ovocito es ovulado en estado de diactiateno de la primera división meiótica y no en segunda metafase (Lee *et al.*, 2007; De los Reyes *et al.*, 2011; Reynaud *et al.*, 2012)

3. Receptor de LH

El receptor de LH (LHR) corresponde a una glicoproteína de transmembrana perteneciente a la subfamilia rodopsinas de los receptores ligados a proteína G (GPCR) (Ascoli *et al.*, 2002; Menon *et al.*, 2004; Menon y Menon, 2012). En humanos, se describe que el receptor posee una subunidad α de 92 aminoácidos y una β , encargada de la función y de la unión (Choi y Smitz, 2014) entregándole así la especificidad de respuesta hormonal (Sun y Davies, 1995). En su conjunto, ambas unidades juegan un rol fundamental en la respuesta del folículo a la LH (Saint-Dizier *et al.*, 2008). Se encarga de variadas funciones reproductivas incluyendo esteroidogénesis ovárica, regulando la expresión de $17\alpha\text{OH}$, enzima encargada de transformar pregnenolona en $17\text{-L-OH-pregnenolona}$ (Braw-Tal y Roth, 2005), así como también un papel importante en la ovulación. (Menon y Menon, 2012).

En humanos y en ratas se ha determinado que el receptor de LH posee un dominio extracelular largo, rico en leucina y con múltiples sitios glicosilados (Choi y Smitz, 2014), 7 α -hélices transmembrana y un pequeño dominio carboxi-terminal intracelular (Menon *et al.*, 2004). Su peso varía según especie y se ha descrito, utilizando técnicas de western blot, la presencia de la proteína madura, y de su precursor o forma inmadura (Tao *et al.*, 2004), cuyos pesos varían entre los 73 a 92 kDa y 67 a 85 kDa respectivamente (Tao *et al.*, 2004, Fabritz *et al.*, 1998). Ascoli *et al.* (2002) describen su peso como receptor maduro en la superficie celular de entre 85 a 95kDa.

La presencia de LHR abarca diversos tipos celulares, como piel (Welle *et al.*, 2006), cerebro (Bukovsky *et al.*, 2003) y hasta musculo liso (Welle *et al.*, 2006), mientras que en tejido reproductivo de hembras mamíferas se describe en células tecales, células diferenciadas de la granulosa y células luteales, entre otros (Ascoli *et al.*, 2002; Choi y Smitz, 2014) pero con una expresión dinámica a lo largo del ciclo ovárico normal en humanos (Choi y Smitz, 2014), Estos aspectos se desconocen en la perra, aunque se ha descrito en ella, mediante técnicas de autoradiografía, que previo a la ovulación hay presencia de sitios de unión para LHR cuando el diámetro folicular es un 20% del diámetro ovulatorio, (Saint-Dizier *et al.*, 2008), en comparación al 50% encontrado en otras especies (Monniaux *et al.*, 1997; Driancourt, 2001).

Si bien, los mecanismos que gobiernan estos cambios en los niveles de expresión no han sido totalmente dilucidados en mamíferos, se cree que involucran regulación tanto transcripcional como post transcripcional (Choi y Smitz, 2014). En la mayoría de las especies debido a factores paracrinicos y autocrinos, hay una supresión de su expresión en etapas temprana de la foliculogénesis, lo que impide la luteinización prematura de los folículos (Eppig, 2001; Gilchrist *et al.*, 2008). Estudios en humanos y ratas describen su expresión en pequeñas cantidades en folículos antrales, los cuales aumentan en cantidad a medida que el éste crece en respuesta a FSH, estradiol y otros factores paracrinicos (Menon y Menon, 2012; Choi y Smitz, 2014).

4. Luteinización

En la mayoría de las especies, la luteinización corresponde al proceso en el cual luego de la ovulación, las células de la granulosa y de la teca experimentan cambios morfológicos y bioquímicos transformándose en células grandes (granulosas luteales) y pequeñas (tecales luteales) respectivamente para generar el cuerpo lúteo (Bulun, 2011).

En los cánidos, sin embargo, ocurre una luteinización folicular pre ovulatoria, reflejada por aumentos en los niveles séricos de progesterona 1 a 2 días antes del peak de LH (Concannon *et al.*, 1977) e involucra tanto células de la teca como de la granulosa, pero sin una diferenciación a células luteales grandes y pequeñas como es común en los demás mamíferos (Kowalewski *et al.*, 2015).

La razón del porqué ocurre esta luteinización temprana aún es desconocida, reportándose que sucede 60–70 h antes de la ovulación y el alza preovulatoria de progesterona se observa justo antes o en coincidencia con la iniciación del alza de LH (Reynaud, 2009; Saint-Dizier *et al.*, 2008). Además, se desconoce cómo se adquieren los LHR, sugiriendo que al igual que en los cerdos, hay una mayor cantidad de cambios paracrinicos y autocrinos responsables de su adquisición (Concannon, 2009).

Siendo la LH una de las hormonas involucradas en la actividad reproductiva de las hembras mamíferas, tanto en el desarrollo folicular, ovulación y en el proceso de luteinización, el estudio de su receptor durante el crecimiento folicular cobra importancia, más aún cuando prácticamente no ha sido estudiado en caninos, desconociéndose aún la dinámica de expresión durante el ciclo reproductivo en esta especie.

HIPÓTESIS

La expresión de los LHR, tanto a nivel de mRNA como de proteína ocurre tempranamente en los folículos ováricos de perras, presentando una dinámica que variará de acuerdo al desarrollo folicular y ciclo reproductivo de ésta.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión de LHR (mRNA y proteína) en los folículos ováricos de perras a través del desarrollo folicular en las distintas etapas de su ciclo estral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la dinámica de expresión del gen de LHR (LHR mRNA) y su proteína (LHR) a través del desarrollo de los folículos ováricos
2. Relacionar la influencia de la etapa del ciclo estral en la presencia de LHR a nivel de su mRNA y de la proteína.
3. Establecer la relación temporal que hay entre la expresión del gen de LHR y la su proteína codificante durante el desarrollo folicular en las perras.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET). Las muestras se obtuvieron y se procesaron de acuerdo al protocolo aprobado por los comités de Bioética de FONDECYT y de FAVET.

1. Recolección de muestras

Los ovarios se obtuvieron de perras mestizas y de raza, no preñadas, clínicamente sanas, entre 8 meses y 6 años de edad por medio de ovariectomía realizadas en el Centro de Atención Primaria de Mascotas Santo Tomás y en el Centro de Salud Veterinaria El Roble. Éstos fueron transportados en solución salina 0,9% NaCl, suplementada con 100 UI de penicilina G sódica (Sigma #K5021, ST. Louis, MO, USA) y 50 µg/mL de estreptomicina (Sigma #S-9137) (De los Reyes *et al.*, 2012), a 5°C. Paralelamente durante la cirugía se obtuvo una muestra de 5 ml de sangre a través de la cánula para determinar los niveles de progesterona sérica. En el laboratorio los ovarios se mantuvieron en solución buffer fosfato salino 1x (PBS; (KCl 0.02%, Na₂HPO₄ 0.142%, NaCl 0.8%, KH₂PO₄ 0.024%) durante su manipulación a temperatura ambiente (22°C) y fueron procesados dentro de las primeras 2 horas posteriores a la cirugía. Se evaluó cada gónada utilizando una lupa estereoscópica (A.Krüss Optronic GmNH, Hamburgo, Alemania) para determinar mediante sus estructuras presentes y el grado de desarrollo de éstas y estimar la etapa del ciclo estral en la cual se encontraba.

La etapa del ciclo estral se corroboró mediante el análisis de la concentración de progesterona sérica a través de ensayos de ELISA, de acuerdo a las técnicas establecidas en el laboratorio (Fernández *et al.*, 2016).

2. Procesamiento de muestras

Utilizando un bisturí, se seccionó la porción cortical de cada ovario en trozos los cuales fueron mantenidos por 90 minutos en una digestión enzimática con colagenasa (C0130-100MG Sigma, MO, USA) a concentración de 1 mg/mL en agua destilada a

temperatura ambiente (22 °C), con el fin de disgregar el tejido ovárico y facilitar la obtención de las células foliculares.

La recolección de las células foliculares se realizó bajo una lupa estereoscópica (A.Krüß Optronic GmNH, Hamburgo, Alemania), donde los folículos fueron clasificados según su estado de desarrollo en preantrales (< 300 µm de diámetro), antrales pequeños (~ 300 – 490 µm de diámetro), antrales medianos (~ 500 – 990 µm de diámetro) y antrales grandes (>1000µm). Las muestras obtenidas fueron divididas para el análisis del LHR mediante q-PCR (mRNA) y para la proteína del mismo mediante Western Blot.

3. q-PCR

Las células recolectadas fueron depositadas en tubos eppendorf (1,5 mL) con 0,5 mL de solución RNA *later* Stabilization Solution (Ambion, ThermoFisher Scientific, Budapest, Hungría) y clasificadas según el tamaño del folículo de origen y la etapa del ciclo estral en el que se encontraban, siendo rotulados y almacenados a -20°C hasta su análisis.

3.1. Diseño de Partidores

Los partidores para el LHR se diseñaron en base a la secuencia publicada en GenBank ([AF389885](#)), de forma similar a lo realizado por Welle *et al.*, (2006) (Tabla 1), utilizando el programa PRIMER 3PLUS y sintetizados por Biosearch Technologies (California, Estados Unidos). Además, las condiciones del q-PCR se optimizaron en función de la concentración óptima de los partidores y su eficiencia mediante curva de calibrado. Como genes de referencia se utilizaron β-actina e Histona H2A, con partidores ya diseñados y estandarizados (Palomino y De los Reyes, 2016)

Tabla 1: Secuencia de Partidores para LHR

Receptor	Número Acceso GeneBank	Secuencia
LH	AF389885	5'- CTCGCCATCGTGGGAAATGT 3' (forward) 5'- GCACTACACCCACTCCCTGT 3' (reverse)

(Welle *et al.*, 2006)

3.2. Extracción de RNA

El RNA total se extrajo de las muestras, luego de descongelarlas a temperatura ambiente, mediante columnas de afinidad utilizando el Kit GeneJET RNA Purification (Fermentas LifeSciences, Budapest, Hungría), siguiendo las instrucciones del fabricante bajo un gabinete de bioseguridad, en condiciones libres de RNAsas. La concentración de RNA fue determinada mediante fluorometría en un Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Budapest, Hungría) utilizando el kit de cuantificación Qubit RNA Assay (Molecular Probes Invitrogen, Budapest, Hungría) utilizando una alícuota de 0,5µL de cada muestra, en tubos eppendorf libres de RNAsas siguiendo las instrucciones del fabricante, las que se mantuvieron en tubos eppendorf (1,5 mL) con agua libre de RNAsas a -80°C hasta el análisis de cDNA

3.3. Transcripción Reversa

La transcripción reversa se realizó con el conjugado enzimático SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Budapest, Hungría) siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración del DNA complementario (cDNA) se determinó con el kit de cuantificación Qubit ssDNA Assay (Molecular Probes Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Budapest, Hungría) utilizando una alícuota de 0,5µL de cada muestra en el preparado del Qubit, en tubos eppendorf libres de RNAsas siguiendo las instrucciones del fabricante, para luego almacenar las muestras de cDNA originales en tubos eppendorf (1,5 mL) libres de DNAsas a -20°C hasta su uso en los protocolos de q-PCR.

3.4. PCR en tiempo real o qPCR

La amplificación de los genes se realizó mediante q-PCR, utilizando el kit Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (ThermoFisher Scientific, Budapest, Hungría), según las cantidades por reacción indicadas por el fabricante (Anexo 1). Las soluciones elaboradas utilizaron cDNA de cada tamaño folicular, cargados en placas de 48 pocillos, utilizando una placa por cada etapa del ciclo estral. Muestras de control sin el transcripto reverso y sin el templado se incluyeron en cada placa como controles negativos. Se sellaron con film óptico adhesivo (Illumina Inc. San Diego, CA. USA), para luego ser analizadas en el termociclador EcoReal-Time PCR System (Illumina Inc. San Diego, CA. USA) utilizando las condiciones dadas por el fabricante del kit empleado (Anexo 2) con 40 ciclos en total.

3.5. Cuantificación Relativa

Luego de la estandarización de las condiciones del PCR se evaluó la expresión relativa de los genes de LHR según el tamaño folicular y la etapa en el ciclo estral de la perra donante.

Los niveles de expresión génica fueron guardados como valores de Ct, que corresponde al número de ciclos donde la señal fluorescente fue detectada por sobre un valor umbral. Utilizando Microsoft Excel se calcularon los promedios de los Cts para cada replica biológica (según cada tamaño y etapa del ciclo) y transformados en valores relativos o Quantity (Q) por medio del método $\Delta\Delta Ct$ (Bustin *et al.*, 2009; Vandesompele *et al.*, 2002). Luego la cuantificación relativa en la expresión del LHR para cada estado del ciclo se estimó con el cociente entre el valor de Q y un factor de normalización (NF), que fue calculado en base a la media genómica de los valores de Q de los genes de referencia. Tanto para la amplificación de LHR como de los genes de referencia, se utilizaron 10 ng de cDNA, (Anexo 1). La expresión relativa fue expresada con el promedio \pm desviación estándar.

4. Western Blot

Las muestras fueron depositadas separadamente en tubos Eppendorf (1,5 mL) con 0,5 mL de buffer fosfato salino (PBS) 1x, previamente rotulados con el número de muestra y el estado de desarrollo folicular, y luego fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

4.1. Extracción de Proteínas

Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente para luego extraer 1 mL de cada una. Las proteínas totales se extrajeron adicionando 1 mL buffer de lisis (Tris 20 mM, HCl (pH 7), NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton 100x 1%) (Hou *et al.*, 2010) suplementado con 0.8 µL de cocktail inhibidor de proteasas y fosfatasa (ThermoFisher Scientific, Budapest, Hungría). Las muestras se sonicaron con pulso de 50% por 30 segundos utilizando un Sonicador Digital Branson S-450D (Emerson Electric Co. St Louis, Misuri, Estados Unidos), perteneciente al Laboratorio de Biología de FAVET.

La concentración de proteínas fue determinada mediante fluorimetría en un Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Budapest, Hungría) utilizando el kit de cuantificación Qubit Protein Assay (Molecular Probes Invitrogen, Budapest, Hungría) usando una alícuota de 0,1 µL de cada muestra.

4.2. Electroforesis

Previo a la electroforesis, se extrajo 30 µL de cada muestra de proteína a concentración de 0,93 µg/µL y se les adicionó 10 µL de Buffer de Carga 5x (GeneScrip, Piscataway, NJ, Estado Unidos) para luego ser calentadas en baño de agua por 5 minutos. Se utilizó una cámara electroforética Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, California, Estados Unidos) en la cual fueron colocados Geles al 12% de SDS-Poliacrilamida (ExpressPlus PAGE Gels, GeneScrip, Piscataway, NJ, Estados Unidos) con 12 pocillos, dejando el primero únicamente para correr un estándar de peso molecular (M00443 GeneScrip Piscataway, NJ, Estados Unidos) mientras que en los demás carriles se depositaron las muestras ordenadas según tamaño folicular. Se rellenó la cámara con solución de corrida 1% (TRIS 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1% en agua destilada) e inició la electroforesis a 120 V.

Se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Immobilon-P, Millipore Corporation, Billerica MA, Estados Unidos) utilizando la misma cámara electroforética, en solución de transferencia (TRIS 25 mM, glicina 192 mM y Metanol 20% en agua destilada, a pH 8,3) a 350 mA por una hora.

Posterior a la transferencia, se procedió al realizar el bloqueo de la membrana utilizando leche descremada al 5% en TBST (Tris 35 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Tween 20 0,1% en agua destilada a pH 8,0) a temperatura ambiente y agitación constante por una hora.

Luego del bloqueo, se prosiguió con la incubación con el anticuerpo primario anti LHR P-17, Sc-26342, goat polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, Estados Unidos) (dilución 1:100) durante toda una noche a 4°C y con agitación constante.

Tras la primera incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBST a la membrana para continuar la incubación con el anticuerpo secundario SC- 2020 donkey anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, Estados Unidos) (dilución 1:500) conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1:50) durante una hora, con protección a la luz, agitación constante y a temperatura ambiente.

Se realizaron 3 lavados posteriores en TBST de 10 minutos cada uno antes del revelado, las bandas de la proteína se visualizaron con sustrato NBT/BCIP 50x (Sc-24981, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, Estados Unidos) y Solución de Tinción (Tris 10 mM, NaCl 10 mM y MgCl₂ 0,025 mM, en 100 mL de Agua Destilada, a pH 9,5) utilizando 200 µL y 10 mL respectivamente. Sumergiendo la membrana y agitando constantemente por no más de 15 minutos.

4.3. Intensidad de Bandas

La densitometría de la intensidad de las bandas del Western Blot se evaluó usando el programa BIOTOP Gel Imaging System (Bio-Tech Co., Ltd, Shangai, China) Se determinó la cantidad de pixeles en la misma área en cada banda y se expresó como integridad óptica integrada (IOD).

5. Análisis Estadístico

Los datos del qPCR fueron obtenidos utilizando el Software EcoStudy y los de western blot midiendo la integridad óptica integrada obtenida tras la densitometría. Ambos resultados fueron analizados mediante ANOVA de dos vías, seguido de la Prueba de Tuckey

para determinar diferencias para ambos experimentos. Se utilizó el Software InfoStat (InfoStat Professional Program, Version 2015).

El análisis de correlación se realizó de acuerdo a los datos obtenidos de la expresión relativa del receptor (qPCR) y los obtenidos como intensidad de banda del receptor (Western blot) según cada tamaño folicular, mediante la Prueba de Correlación de Pearson.

Para todos los análisis se utilizará un valor de significancia de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Expresión del gen de LHR.

La extracción del RNA necesaria para los experimentos de qPCR se realizó utilizando un total de 70 perras, de las cuales se obtuvieron y evaluaron 1173 folículos, clasificados según tamaño y estado del ciclo que se encontraba las donantes (Tabla 2).

Se realizaron en total tres réplicas para cada etapa del ciclo y tamaño folicular, donde se evaluaron células de folículos preantrales, antrales pequeños, medianos y grandes. Fue posible detectar la expresión relativa de mRNA del LHR en todos los tamaños foliculares y durante todas las etapas del ciclo estral de la perra (Figura 1).

Tabla 2. Total de folículos utilizados para extracción de RNA según las distintas categorías de clasificación.

Ciclo	Desarrollo Folicular				Total
	PA	AP	AM	AG	
Anestro	297	177	93	-	567
Pro/Est	163	124	45	15	347
Diestro	137	56	66	-	259
Total	597	357	204	15	1173

PA: Pre Antral. AP: Antrales Pequeños. AM: Antrales Medianos. AG: Antrales Grandes.

Según el tamaño folicular, la expresión del gen que codifica para LHR no mostró diferencias ($P < 0,05$) entre los folículos pre antrales comparando entre las diferentes etapas del ciclo, pero si hubo ($P < 0,05$) en los folículos antrales, en todos los tamaños y en todas las etapas, con excepción de los folículos antrales pequeños de anestro. En el caso de los

folículos antrales grandes presentes solo en la etapa de proestro/estro, hubo diferencias ($P < 0,05$) en comparación al resto de los tamaños foliculares estudiados.

En la expresión según cada etapa se observaron diferencias ($P < 0,05$) entre todos los tamaños foliculares de las etapas de proestro/estro y diestro, mientras que en anestro variaron solo entre folículos pre antrales y antrales medianos.

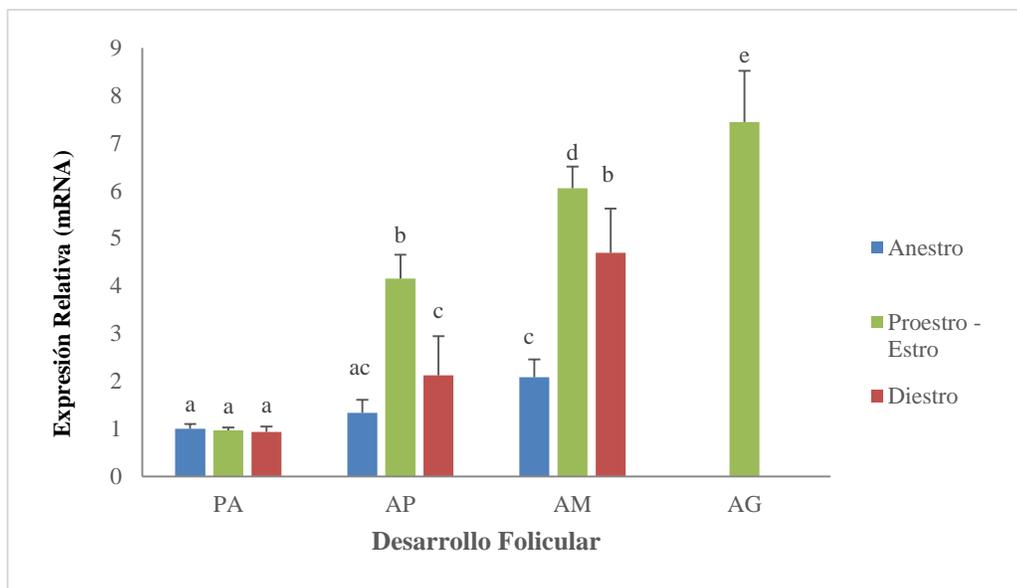


Figura 1. Expresión relativa (mRNA) del LHR según las etapas de Anestro, Proestro/Estro y Diestro; y según tamaños foliculares (Preantral, Antral Pequeño, Antral Mediando y Antral Grande). Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$). PA: Pre Antral. AP: Antral Pequeño. AM: Antral Mediano. AG: Antral Grande.

Evaluación del receptor de LH por Western Blot

Para la extracción de proteínas necesarias para los ensayos de Western Blot, se utilizó un total de 68 perras, de las cuales se evaluaron 895 folículos, clasificados según tamaño y estado del ciclo que se encontraba la perra donante (Tabla 3).

Tabla 3. Total de folículos utilizados para la extracción de proteínas, según las distintas categorías de clasificación.

Ciclo	Desarrollo Folicular				Total
	PA	AP	AM	AG	
Anestro	112	107	15	-	234
Proestro/Estro	49	195	71	21	336
Diestro	94	176	55	-	325
Total	255	478	141	21	895

PA: Pre Antral. AP: Antrales Pequeños. AM: Antrales Medianos. AG: Antrales Grandes.

Se realizaron en total 4 réplicas para cada etapa del ciclo y tamaño folicular. A partir de las muestras analizadas se observó la presencia de dos bandas, una de 90 kDa y otra de 67 kDa (Figura 2) lo que correspondería a la forma madura e inmadura del receptor respectivamente. Ambas marcas del LHR se pueden apreciar en los tamaños foliculares estudiados y durante todas las etapas del ciclo estral de la perra, pero con diferentes intensidades.

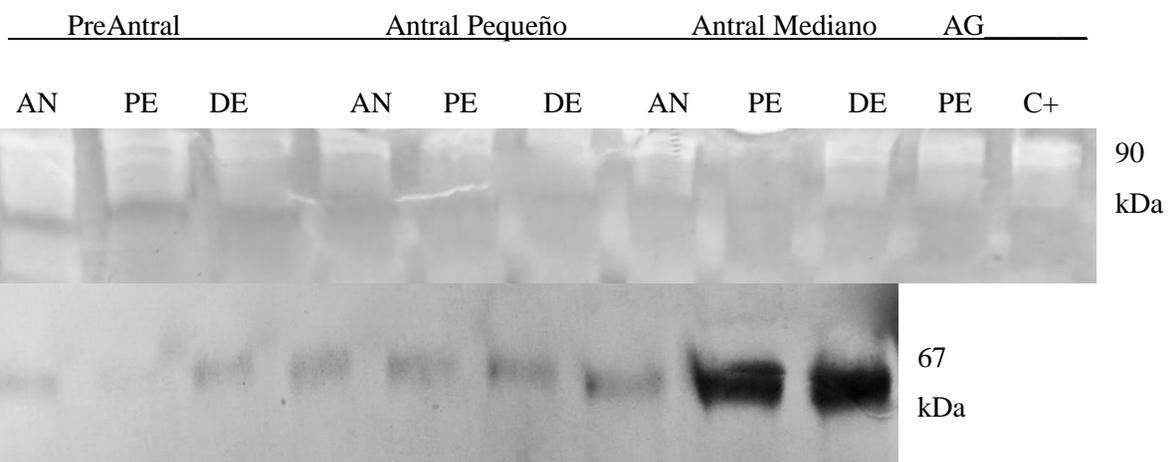


Figura 2: Fotografía de una de las membranas obtenidas luego del proceso de transferencia y revelado obtenido tras la electroforesis de proteínas de LHR

AN: anestro, **PE:** proestro/estro, **DE:** diestro, **AG:** antral grande, **C+:** control positivo utilizado (cuerpo lúteo)

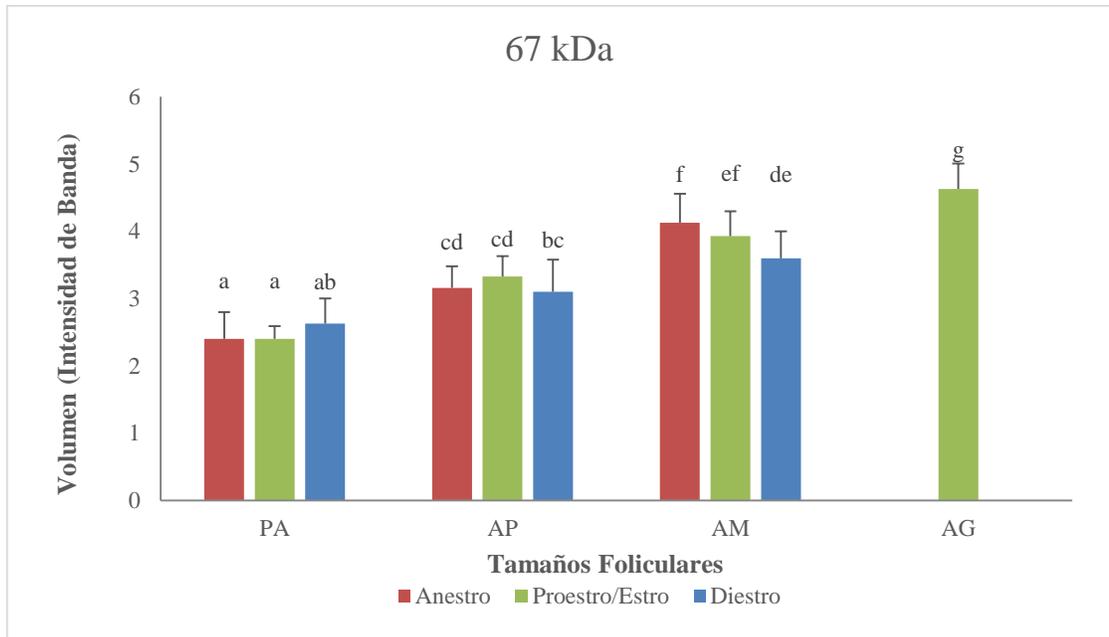
La intensidad de bandas de la proteína del LHR mostró una predominancia en su forma inmadura (67 kDa) en comparación con la madura (90 kDa) (Figura 3). En la etapa de anestro ambas bandas fueron incrementando su nivel de intensidad al pasar de pre antral a antrales.

La forma madura en anestro presentó mayores concentraciones en comparación con las etapas de proestro/estro y diestro, pero con menor intensidad en comparación a la forma inmadura.

En proestro/estro, la forma inmadura fue también predominante en comparación a la forma madura. La intensidad en ambas formas fue aumentando con el incremento del tamaño folicular, presentando diferencias ($P < 0,05$) entre folículos pre antrales hasta antrales grandes.

En la etapa de diestro se mantuvieron las diferencias de intensidad de banda entre la forma madura y el precursor inmaduro ($P < 0,05$), presentando ésta mayor cantidad en todos los tamaños foliculares y aumentado desde los folículos preantrales hasta los antrales medianos.

A.



B.

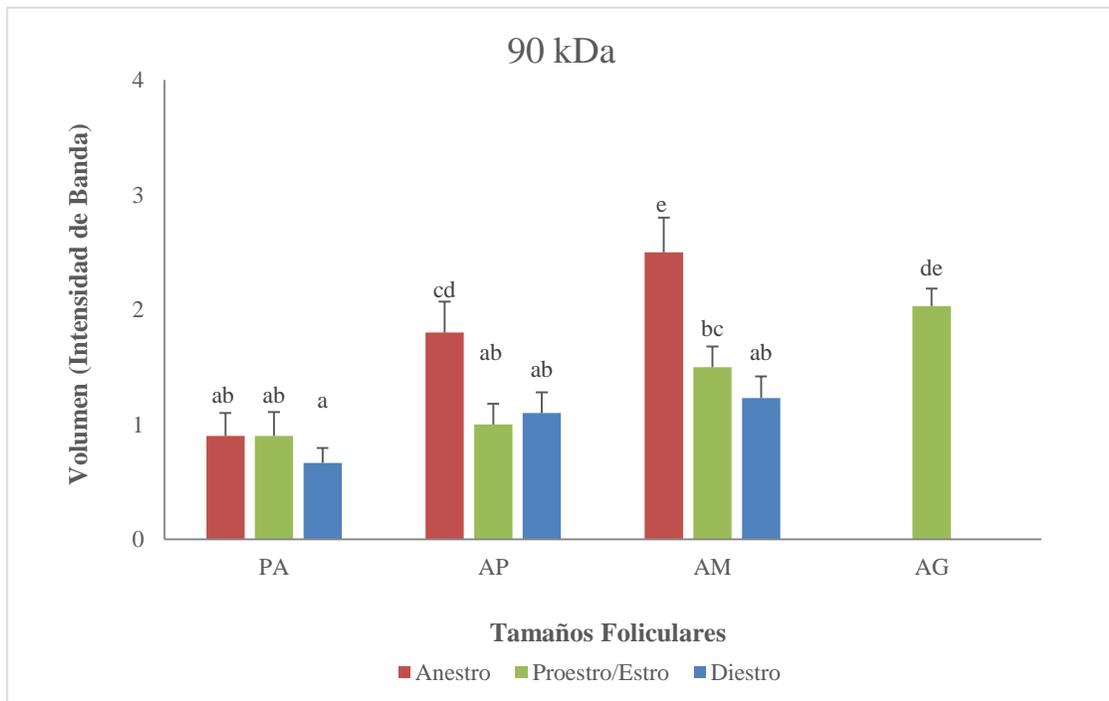


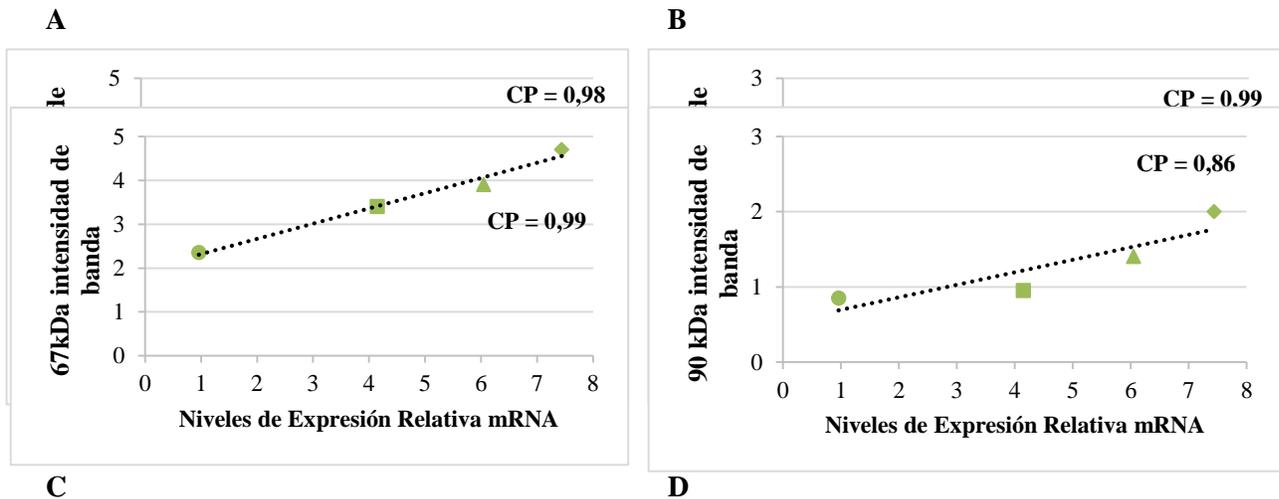
Figura 3. Intensidad de Banda para LHR como proteína inmadura (67 kDa) (A) como proteína madura (90 kDa) (B) según las etapas del ciclo estral y según tamaños foliculares. Letras distintas

indican diferencias significativas ($P < 0,05$). PA: Pre Antral. AP: Antral Pequeño. AM: Antral Mediano. AG: Antral Grande.

Relación mRNA – Proteína

Debido a la presencia de la forma madura (90 kDa) y de la inmadura (68 kDa), se realizaron para cada uno un análisis de correlación de Pearson relacionando la expresión relativa del mensajero (mRNA-LHR) y la intensidad de banda del receptor de LH.

Se observó una correlación positiva ($P < 0,05$) tanto para la forma madura e inmadura con la expresión del gen del receptor en las etapas del ciclo estral evaluadas (Figura 4).



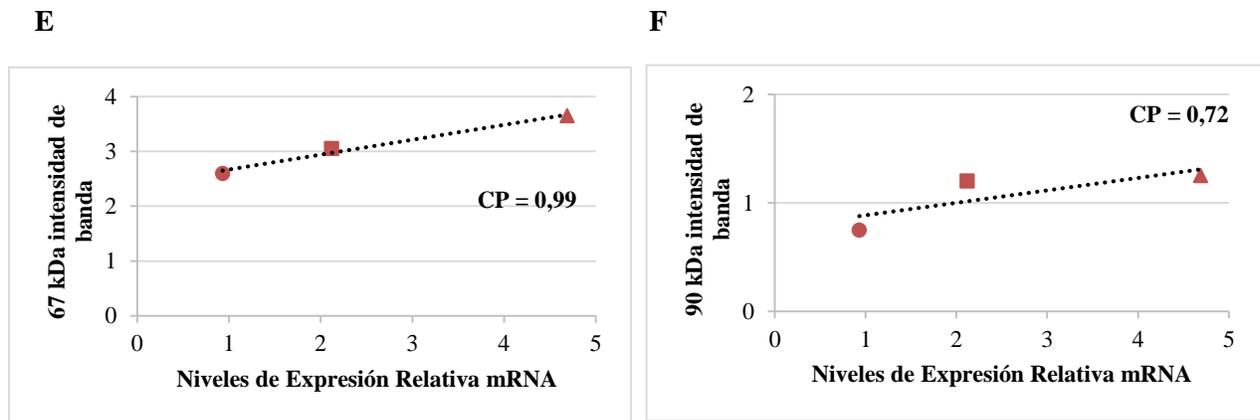


Figura 4. Correlación entre Intensidad de Banda y mRNA del LHR durante las etapas de Anestro (A y B), Proestro/Estro (C y D) y Diestro (E y F). ●: Folículo Preantral; ■: Folículo Antral Pequeño; ▲: Folículo Antral Mediano; ◆: Folículo Antral Grande

DISCUSIÓN

El presente estudio determinó por primera vez el patrón de expresión del receptor de LH tanto a nivel del gen como de la proteína en folículos de perra, demostrando su presencia durante todo el ciclo a través del crecimiento folicular en caninos.

Se demostró tanto la presencia del mRNA como de la proteína durante todo el desarrollo folicular, incluso desde los folículos preantrales y en las tres etapas del ciclo estudiadas. Existe evidencia, en especies mamíferas como ratas (Kishi y Greenwald, 1999; Teerds y Dorrington, 1995), cerdas (Meduri *et al.*, 1992), vacas (Wandji *et al.*, 1992), hámsters (Roy *et al.*, 1987) y humanos (Takao *et al.*, 1997) utilizando técnicas como la autoradiografía de la existencia de sitios de unión para LH en folículos, mientras que en perras, utilizando la misma técnica, detectaron lugares de unión de la hormona pero solamente en folículos mayores a 350 μm y estando solamente acotado a la etapa de proestro/estro (Saint-Dizier *et al.*, 2008).

La expresión de mRNA-LHR ha sido encontrada desde folículos secundarios en bovinos (Nogueira *et al.*, 2010), ovinos (Tisdall *et al.*, 1995) y humanos (Oktay *et al.*, 1997). No existiendo hasta la fecha información equivalente en la perra. La presencia temprana del transcrito del receptor, en comparación a las otras especies mamíferas, podría sugerir la existencia de alguna función de la LH durante el desarrollo folicular temprano, sobre todo en

anestro que presenta aumentos paulatinos en la concentración de esta hormona (Concanon, 2009) Sumado a que se podría relacionar con el proceso de luteinización preovulatoria que posee la hembra canina durante la etapa de proestro/estro, ya que al existir mRNA de LHR, tanto de forma previa como durante el desarrollo a folículos antrales grandes, indicaría ya la traducción de estos a receptores y con ello una respuesta anticipada de estos folículos a la LH (previo al peak de ella) que comience los cambios morfológicos tanto en la células de la teca como de la granulosa.

El aumento de la expresión del transcrito del receptor en relación al tamaño de los folículos, encontrado en este estudio, se relacionaría con el aumento de la síntesis del LHR. Esto concuerda con estudios en otras especies, donde se ha descrito que existiría una correlación positiva entre el diámetro folicular y la cantidad de sitios de unión para LH en oveja (Abdennebi *et al.*, 1999), rata (Monniaux y de Reviere, 1989), hámster (Oxberry y Greenwald, 1982), humano (Shima *et al.*, 1987), cerda (Nakano *et al.*, 1983), gata (Saint-Dizier *et al.*, 2007) y en época periovular en perras (Saint-Dizier *et al.*, 2008) donde los folículos antrales grandes o preovulatorios, presentan una mayor expresión en comparación a los demás tamaños.

Uno de los mayores incrementos de mRNA-LHR fue durante proestro/estro, siendo esta ya una etapa final de desarrollo, el folículo requiere la capacidad para poder responder al peak de LH generando como respuesta la ovulación (Russel y Robker, 2007).

Mediante western blot se evidenció en el presente estudio dos bandas inmunoreactivas, una con un peso equivalente a 90 kDa y otra de 67 kDa, indicando que las formas encontradas corresponderían a la proteína madura e inmadura respectivamente de acuerdo a lo descrito en otras especies mamíferas como equinos (Goudet *et al.*, 1999), porcinos (Vulhai-Luuthi *et al.*, 1990; Loosfelt *et al.*, 1989), ratas (Ascoli *et al.*, 2002; Apaja *et al.*, 2005) y humanos (Ascoli *et al.*, 2002; Tao *et al.*, 2004), donde señalan la presencia de dos formas de LHR con pesos que varían entre los 55 a 73 kDa para la proteína inmadura y de 70 a 90 kDa para la forma madura.

La abundancia de cada tipo de proteína del LHR ha sido observada por diversos estudios siendo descrito en humanos (Ascoli *et al.*, 2002) que la forma madura es más

abundante que la inmadura, mientras que en ratas existen resultados contradictorios, con mayor cantidad de la forma inmadura (Ascoli *et al.*, 2002; Apaja *et al.*, 2005). En el presente estudio se pudieron determinar variaciones en la intensidad del LHR a lo largo del ciclo estral y de los diferentes tamaños foliculares, donde la forma inmadura fue más abundante que la forma madura en todas las etapas, pudiendo indicar un proceso de maduración ineficaz o lento.

Al igual con lo que ocurre con el mRNA del receptor, hubo un aumento en la cantidad de LHR a medida que los folículos aumentan en tamaño. En la etapa de anestro se evidenció un aumento en ambas formas del receptor pudiendo estar relacionado con el aumento que posee la LH durante la fase más tardía de esta etapa del ciclo (Concannon, 2011). Durante proestro/estro, la forma inmadura sigue siendo la más abundante con un incremento en la expresión a medida que el folículo crece y llega a tamaños preovulatorios al igual que su forma madura, además, esta etapa es la que presenta el mayor aumento en los niveles de mRNA LHR sugiriendo que existe un alto nivel de transcripción al igual que de traducción. En el diestro, la forma inmadura es la más expresada al igual que se observaron altos del mensajero indicando un proceso activo de transcripción.

CONCLUSIONES

- Tanto el mRNA como la proteína del LHR se expresan temprano en el desarrollo folicular de la perra, a partir de folículos preantrales.
- El gen como la proteína del receptor de la LH se expresan durante todo el ciclo estral, pero con variaciones de acuerdo al ciclo reproductivo de la perra.
- Las formas proteicas encontradas corresponderían a la del receptor maduro y la del receptor inmaduro, siendo más abundante en los folículos ováricos de perra la forma inmadura.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abdennebi, L.; Monget, P.; Pisselet, C.; Remy, J.; Salesse, R.; Monniaux, D. 1999. Comparative expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in ovarian follicles from high and low prolific sheep breeds. *Biol. Reprod.* 60:845 – 854.

Andersen, A.; Simpson, M. 1973. Ovarian development, from birth to puberty. In: *The Ovary and the Reproductive Cycle of the Dog (Beagle)*. Geron-X Inc. Los Altos, California. pp: 48 – 102.

Apaja, P.; Aatsinki, J.; Rajaniemi, H.; Petäjä-Repo, U. 2005. Expression of the mature luteinizing hormone receptor in rodent urogenital and adrenal tissues os developmentally regulated at a posttranslational level. *Endocrinology.* 146(9): 3224 – 3232.

Ascoli, M.; Fanelli, F.; Segaloff, D. 2002. The Lutropin/Choriogonadotropin Receptor, A 2002 Perspective. *Endocr Rev.* 23:141 – 174.

Aurich, C. 2011. Reproductive cycles on horses. *Anim Reprod Sci.* 124: 220 – 228.

Bartlewski, P.; Baby, T.; Giffin, J. 2011. Reproductive cycles in sheep. *Anim Reprod Sci.* 124: 259 – 268.

Braw-Tal, R.; Roth, Z. 2005. Gene expression for LH receptor, 17 α -hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction* 129: 453 – 461.

Bukovsky, A.; Indrapichate, K.; Fujiwara, H.; Cekanova, M.; Ayala, M.; Dominguez, R.; Caudle, M.; Wimalsena, J.; Elder, R.; Copas, P.; Foster, J.; Fernando, R.; Henley, D.; Upadhyaya, N. 2003. Multiple luteinizing hormone receptor (LHR) protein variants, interspecies reactivity of anti-LHR mAb clone 3B5, subcellular localization of LHR in human placenta, pelvic floor and brain, and possible role for LHR in the development of abnormal pregnancy, pelvic floor disorders and Alzheimer's disease. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 1:46

Bulun, S. 2011. Physiology and pathology of the female reproductive axis. **In:** Williams Textbook of Endocrinology. Doceava Edición. Elsevier Saunders. Philadelphia. pp. 581–660.

Bustin, S.; Benes, V.; Garson, J.; Helleemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Muelles, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.; Shipley, G.; Vandesompele, J.; Wittwer, C. 2009. The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55(4): 611 – 622.

Chastant-Maillard, S.; Viaris de Lesegno, C.; Chebrou, M.; Thoumire, S.; Meylheuc, T.; Fontbonne, A.; Chodkiewicz, M.; Saint-Dizier, M.; Reynaud, K. 2011. The canine oocyte: uncommon features if *in vivo* and *in vitro* maturation. *Reprod Fertil Dev.* 23: 391 – 402.

Choi, J.; Smitz, J. 2014. Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: Origins of difference. *Mol Cell Endocrinol.*383:203 – 213.

Concannon, P.; Hansel, W.; McEntee, K. 1977. Changes in LH, Progesterone and Sexual Behavior behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod.* 17:604 – 613.

Concannon, P. 2009. Endocrinologic Control of Normal Canine Ovarian Function. *Reprod Domestic Anim.* 44: 3 – 15.

Concannon, P. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci.* 124: 200 – 210.

Concannon, P. 2012. Research challenges in endocrine aspects of canine ovarian cycles. *Reprod Domestic Anim.* 47: 6 – 12.

De Los Reyes, M.; Palomino, J.; Jofré, S.; Villarroel, A.; Moreno R. 2012. Golgi Apparatus and Endoplasmic Reticulum dynamic during meiotic development in canine oocytes. *Reprod Domestic Anim.* 47: 93 – 97.

De los Reyes, M.; Palomino, J.; Parraguez, VH.; Hidalgo, M.; Saffie, P. 2011. Mitochondrial distribution and meiotic progression in canine oocytes during *in vivo* and *in vitro* maturation. *Theriogenology.* 75:346 – 353.

De los Reyes, M.; Palominos, J.; Parraguez, VH.; Rojas, C. 2014. Growth factors during the ovarian follicular development in the bitch. **In:** II Latin American Symposium on Anim Reprod Sci. Santiago, Chile. November 13th-14th 2014. pp. 40 – 45.

Driancourt, M. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology.* 55: 1211 – 1239.

England, G.; Russo, M.; Freeman, S. 2009. Follicular dynamics, ovulation and conception rates in bitches. *Reprod Dom Anim.* 44(2):53–58.

Eppig, J. 2001. Oocyte Control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction.* 122:829- 838

Fabritz, J.; Ryan, S.; Acolli, M. 1998. Transfected cells express mostly the intracellular precursor of the lutropin/choriogonadotropin receptor but this precursor binds choriogonadotropin with high affinity. *Biochemistry*. 37(2): 664 – 672.

Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of development competence. *Anim Reprod Sci*. 78:203 – 216.

Fernandez, T.; Palomino, J.; Parraguez, V.; Peralta, O.; De los Reyes, M. 2016. Differential expression of GDF-9 and BMP-15 during follicular development in canine ovaries evaluated by flow cytometry. *Anim Reprod Sci*. 167:59 – 67.

Gilchrist, R.; Lane, M.; Thompson, J. 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*. 14:159 – 177.

Goudet, G.; Belin, F.; Bézard, J.; Gérard, N. 1999. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, α -inhibin, and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Biol Reprod*. 60: 1120 – 1127.

Hou, X.; Arvisais, E.; Davis, J. 2010. Luteinizing hormone stimulates mammalian target of Rapamycin signaling in Bovine Luteal Cells via pathways independent of AKT and Mitogen-Activated protein kinase: Modulation of Glycogen Synthase Kinase 3 and AMP-Activated Protein Kinase. *Endocrinology*. 151(6):2846 – 2857.

Kishi, H.; Greenwald, G. 1999. Autoradiographic analysis of follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod*. 61: 1171 – 1176.

Kowalewski, M.; Ihle, S.; Siemienuich, M.; Gram, A.; Boos, A.; Zdunczyk, S.; Fingerhut, J.; Hoffman, B.; Schuler, G.; Jurczak, A.; Domsławska, A.; Janowski, T. 2015. Formation of the early canine CL and the role of PGE2 in regulation of its function: An *in vivo* approach. *Theriogenology*. 83(2015):1038 – 1047.

Lee, H.; Seo, Y.; Yin, X.; Cho, S.; Lee, S.; Kim, H.; Cho, S.; Kong, I. 2007. Effect of Follicle Stimulation Hormone and Luteinizing Hormone in Cumulus Cell Expansion and *In Vitro* Nuclear Maturation of Canine Oocytes. *Reprod Domestic Anim*. 42: 561 – 565.

Loosfelt, H.; Misrahi, M.; Atger, M.; Salesse, R.; Vu Hai-Luu Thi, M.; Jolivet, A.; Guiochon-Mantel, A.; Sar, S.; Jallal, B.; Garnier, J.; Milgrom, E. 1989. Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science*. 245: 525 – 528.

Meduri, G.; Vuhai-Luuthi, M.; Jolivet, A.; Milgrom, E. 1992. New functional zonation in the ovary as shown by immunohistochemistry of luteinizing hormone receptor. *Endocrinology*. 131: 366 – 373.

Menon, B.; Franzo-Romain, M.; Damapour, S.; Menon, K. 2011. Luteinizing hormone receptor mRNA down-regulation is mediated through ERK-Dependent induction of RNA binding protein. *Mol Endocrinol*. 25:282-290.

Menon, K.; Menon, B. 2012. Structure, Function and regulation of Gonadotropin Receptors – A perspective. *Mol Cell Endocrinol*. 356:88 – 97.

Menon, K.; Munshi, U.; Clouser, C.; Nair, A. 2004. Regulation of Luteinizing Hormone/Human Chorionic Gonadotropin Receptor Expression: A Perspective. *Biol Reprod*. 70: 861 – 866.

Mihm, M.; Gangooly, S.; Muttukrishna, S. 2011. The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci* 124: 229 – 236.

Monniaux, D.; de Reviere, M. 1989. Quantitative autoradiographic study of FSH binding sites in prepubertal ovaries of three strains of rats. *J. Reprod. Fertil*. 85 pp: 151 – 162.

Monniaux, D.; Huet, C.; Besnard, N.; Clement, F.; Bosc, M.; Pisselet, C.; Monget, P. 1997. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *Journal of Reproduction and Fertility*. 51: 3 – 23.

Muller, M.; Cooke, D.; Crow, M. 2013. Structural and Functional roles of FSH and LH as Glycoproteins Regulating Reproduction in Mammalian Species. **In:** *Gonadotropin*. In Technology Rijeka, Croatia. pp: 174 – 190.

Nakano, R.; Sasaki, K.; Shima, K.; Kitayama, S. 1983. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor on porcine granulosa cells during follicular maturation: an autoradiographic study. *Exp Clin Endocrinol.* 81: 17 – 23.

Nogueira, M.; Fernandes, P.; Ereno, R.; Simoes, R.; Buratini Junior, J.; Barros, C. 2010. Luteinizing hormone receptor (LHR): basic concepts in cattle and other mammals. A review. *Anim Reprod Sci.* 7: 51 – 64.

Oktay, K.; Briggs, D.; Gosden, R. 1997. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 82: 3748 – 3751.

Oxberry, B.; Greenwald, G. 1982. An Autoradiographic study of the binding of ¹²⁵I-labeled follicle-stimulating hormone, human chorionic gonadotropin and prolactin to the hamster ovary throughout the estrous cycle. *Biol Reprod.* 27: 505 – 516.

Palomino, J.; De los Reyes, M. 2016. Temporal expression of GDF-9 and BMP-15 mRNAs in canine ovarian follicles. *Theriogenology.* 86: 1541 – 1549.

Palma, G.; Argañaraz, M.; Barrera, A.; Rodler, D.; Mutto, A.; Sinowatz, F. 2012. Biology and Biotechnology of Follicle Development. *Sci World J.* pp: 1 – 14.

Pangas, S.; Rajkovic, A. 2015. Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Cuarta Edición. Academic Press. pp: 947 – 995.

Reynaud, K.; Fontbonne, A.; Marseloo, N.; Thoumire, S.; Chebrout, M.; de Lesegno, C.; Chastant-Maillard, S. 2005. *In vivo* meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction.* 130: 193 – 201.

Reynaud, K.; Fontbonne, A.; Saint-Dizler, M.; Thoumire, S.; Marnier, C.; Thair, MZ.; Meylheuc, T.; Chastant-Maillard, S. 2012. Folliculogenesis, Ovulation and Endocrine Control of Oocytes and Embryos in the Dog. *Reprod Domestic Anim.* 47: 66 - 69.

Reynaud, K.; Viaris de Lesegno, C.; Chebrou, M.; Thoumire, S.; Chastant-Maillard, S. 2009. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology*. 72: 1120-1131.

Rodrigues, B.; Rodrigues, J. 2003. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology*. 60:59 – 66.

Roy, S.; Wang, S.; Greenwald, G. 1987. Radioreceptor and autoradiographic analysis of FSH, hCG and prolactin binding sites in primary to antral hamster follicles during preovulatory period. *Journal of Reproduction and Fertility*.79: 307 – 313.

Russel, Darryl.; Robker, R. 2007. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update*. 13(3): 289 – 312.

Saint-Dizier, M.; Jaffre', N.; Reynaud, K.; Remy, B.M; Thoumire, S.; Chastant-Maillard, S. 2008. Expression of Follicle Stimulating Hormone and Luteinising Hormone binding sites in the bitch ovary during the follicular phase. *Reprod Fertil Dev*. 20: 925 – 934.

Saint-Dizier, M.; Malandain, E.; Thoumire, S.; Remy, B.; Chastant-Maillard, S. 2007. Expression of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone receptors during follicular growth in the domestic cat ovary. *Mol Reprod Dev*. 74: 989 – 996.

Shima, K.; Kitayama, S.; Nakano, R. 1987. Gonadotropin binding sites in human ovarian follicles and corpora lutea during the menstrual cycle. *Obstet Gynecol*. 69: 800 – 806.

Soede, N.; Langendijk, P.; Kemp, B. Reproductive cycles in pigs. *Anim Reprod Sci* 124: 251 – 258.

Sun, PD.; Davies, DR. 1995. The Cystine-Knot Growth-Factor Superfamily. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 24:269 – 291.

Tao, YX.; Johnson, N.; Segaloff, D. 2004. Constitutive and Agonist-dependent self-association of the Cell surface human Lutropin Receptor. *Biol Chem*, 279(7):5904 – 5914.

Takao, Y.; Honda, T.; Ueda, M.; Hattori, N.; Yamada, S.; Maeda, M.; Fujiwara, H.; Mori, T.; Wimalasena, J. 1997. Immunohistochemical localization of the LH/hCG receptor in human ovary: hCG enhances cell Surface expression of LH/hCG receptor on luteinizing granulosa cells *in vitro*. *Molecular Human Reproduction*.3: 569 – 578.

Teerds, K.; Dorrington, J. 1995, Immunolocalization of transforming growth factor alpha and luteinizing hormone receptor un healthy and atretic follicles of the adult rat ovary. *Biol Reprod*. 52: 500 – 508.

Tisdall, D.; Watanabe, K.; Hudson, N.; Smith, P.; McNatty, K. 1995. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep.*J Mol Endocrinol*.15: 273 – 281.

Tsutsui, T. 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs.*J. Reprod. Fertil. Suppl*.39. pp: 269 – 275.

Valentini, L.; Iorga, A.; De Santis, T.; Ambruosi, B.; Reynaud, K.; Chastant-Maillard, S.; Guaricci, A.; Caira, M.; Dell' Aquila, M. 2010. Mitochondrial distribution patterns in canine oocytes as related to the reproductive cycle stage. *Anim Reprod Sci*.117:166-177.

Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3:1 – 11.

Vuhai-Luuthi, M.; Jolivet, A.; Jallal, B.; Salesse, R.; Bidart, J.; Houllier, A.; Guiochon-Mantel, A.; Garnier, J.; Milgrom, E. 1990. Monoclonal antibodies against luteinizing hormone receptor. Immunohistochemical characterization of the receptor. *Endocrinology*. 127: 2090 – 2098.

Wandji, S.; Pelletier, G.; Sirard, M. 1992. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I-labeled insulin-like growth factor-I, ¹²⁵I-labeled follicle-stimulating hormone, and ¹²⁵I-labeled human chorionic gonadotropin binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. *Biol Reprod*. 47: 814 – 822.

Welle, M.; Reichler, I.; Barth, A.; Forster, U.; Sattler, U.; Arnold, S. 2006. Immunohistochemical localization and quantitative assessment of GnRH-, FSH-, and LH-

receptor mRNA Expression in canine skin: a powerful tool to study the pathogenesis of side effects after spaying. *Histochemical Cell Biology*. 126:527-535.

ANEXOS

Anexo 1: Componentes y cantidades por reacción del kit Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific).

Componente	Cantidad por reacción
Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X)*	6,25 µL
Partidor Forward	0,5 µM según cada partidor
Partidor Reverse	0,5 µM según cada partidor
Templado o cDNA	Volumen equivalente a 10 ng cDNA
Agua DEPC	Hasta completar un volumen total de 9 µL

*Incluye la DNA polimerasa *Taq* Maxima®Hot Start (enzima termoestable que replica DNA), dNTPs, SYBR®Green I (colorante intercalante para detectar DNA de doble hebra) y fluoresceína (colorante pasivo de referencia).

Anexo 2: Perfil térmico usado en los qPCR.

Fase	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	50°C	2 minutos	1
Activación Polimerasa	90°C	10 minutos	1
Denaturación	95°C	15 segundos	40
Alineación	60°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	

