

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



**Sistema IGF: Potenciales roles en la
patogenia de la enfermedad quística ovárica
bovina.**

Autora: Lic. Fernanda M. Rodríguez

Directora: Dra. Florencia Rey

Co-Directora: Dra. Natalia R. Salvetti

Tesis para optar por el grado académico

Doctor en Ciencias Veterinarias

**LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
APLICADA- ICIVET LITORAL-UNL CONICET**

-2015-

Todo parece imposible hasta que se hace.

Nelson Mandela

A mis padres por ser ejemplo y acompañarme siempre.

A Flavio por el apoyo y comprensión.

A mi hermana por su incondicionalidad

Agradecimientos...

A mi familia, por su apoyo incondicional. A mi mamá por el esfuerzo y sacrificio de hacer posible y acompañarme en mis logros. A mi hermana y a mi cuñado por estar siempre y escucharme. A mi papá y abuelos que están y estarán siempre guiándome desde algún lugar.

A Flavio, por escuchar, por aconsejarme, por estar, y hacer cada momento feliz.

A la Doctora Florencia Rey, por ser ejemplo, guía, profesora y compañera. Por estar en cada momento, por transmitirme todos los conocimientos necesarios para lograr el fin de este ciclo, por confiar en que podía lograrlo y seguir apostando. Infinitamente GRACIAS!!

A la Doctora Natalia Salvetti por su infinita paciencia y dedicación. Por aportar sus conocimientos y colaborar para resolver las mil dudas surgidas en el transcurso del trabajo.

Al Doctor Hugo Ortega, por brindarme la posibilidad de conocer este maravilloso grupo de trabajo y ser un ejemplo de logros.

Al Doctor Marcelo Zayas por estar siempre presente, por su colaboración desinteresada y su tiempo.

Al Doctor Lucas Monje, a la Doctora María Sol Renna, la Doctora Celina Baravalle, a la Doctora Melisa Velázquez y la Doctora Bibiana Dallard por compartir sus conocimientos y su infinita paciencia.

A la Doctora Ayelén Amweg por ser mi compañera y cómplice de emociones, trabajos y renegadas.

A todos mis compañeros y amigos de trabajo que compartieron y comparten cada momento, cada almuerzo, cada trabajo: Carolina Panzani, Belkis Marelli, Carolina Andreotti, Valentina Matiller, Ma. Eugenia Baravalle, Gustavo Hein, Elizabet Pereyra, Carlos Franco, Mauricio Kern, Silvina Adonna, Natalia Alfaro, Mónica Cadoche, Antonela Stassi, Pablo Díaz, Gustavo Hein, Matías Belotti, Pablo Siroski, Bibiana Dallard, Camila Beccaría, Sofía Sacco, Matías Stangaferro, Leandro Neme, Emilia Huber, Natalia Gareis, Magalí Colombero, Germán Benítez, Paula Silvestrini, Andrea Duré, Ma. Belén Peralta, Adrián Perri, gracias por los lindos momentos en el laboratorio y fuera de él, por las charlas y consejos.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, por brindarme la oportunidad de realizar esta carrera.

A la Universidad Nacional del Litoral que a través del otorgamiento de subsidios permitió la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la Beca que me permitió realizar los estudios de posgrado en la carrera del doctorado en Ciencias Veterinarias.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por los subsidios necesarios para el desarrollo de este trabajo de Tesis.

Gracias a todos los que permitieron que este proyecto se haga realidad.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS UTILIZADAS	I
INDICE DE TABLAS	IV
INDICE DE FIGURAS	V
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Histofisiología ovárica	2
1.1.1 Ovogénesis y foliculogenesis	2
1.2 Ciclo estral	5
1.2.1 Ondas foliculares	6
1.2.2 Regulación del ciclo estral	8
1.3 Enfermedad quística ovárica	11
1.3.2 Factores predisponentes en la formación de quistes	13
1.3.3 Etiología y Patogenia	16
1.4 El sistema de factores de crecimiento análogos a insulina	19
1.4.1 Componentes del sistema IGF	19
1.4.2 Control de la biodisponibilidad de IGFs libres en el ovario	24
1.3.3 Señalización de IGF en el ovario	27
1.3.4 Sistema IGF y foliculogénesis	30
OBJETIVOS	34
2.1 Hipótesis de trabajo	35
2.2 Objetivo general de trabajo	35
2.3 Objetivos específicos	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1 Procedimientos llevados a cabo con animales	37
3.1.1 Modelo experimental	37

3.1.1.2 Animales	37
3.1.2 Grupos de estudio.....	39
3.1.3 Ultrasonografía.....	39
3.2 Obtención de las muestras	40
3.2.1 Obtención de muestras del modelo experimental por ovariectomía bilateral mediante abordaje por el flanco.	40
3.2.2 Obtención de muestras de animales con COD espontánea diagnosticada a campo por ovariectomía bilateral mediante abordaje transvaginal	41
3.2.3 Obtención de muestras de animales con COD espontánea diagnosticada a campo por aspiración folicular guiada por ecografía	42
3.3 Procesamiento de muestras.....	43
3.3.1 Procesamiento de las muestras destinadas a técnicas histológicas	44
3.3.2 Procesamiento de las muestras destinadas a western blot	44
3.3.2.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	45
3.3.3 Procesamiento de las muestras para RT-PCR.....	46
3.3.3.1 Extracción de ARN total	46
3.3.3.2 Transcripción reversa	46
3.3.4 Determinaciones hormonales.....	47
3.4 Análisis de los miembros del sistema IGF	47
3.4.1 Inmunohistoquímica	47
3.4.2 Hibridación in situ	50
3.4.3 Western blot.....	52
3.4.4 Western ligand blot	53
3.4.5 Diseño de cebadores específicos	54
3.4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final	55
3.4.7 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	56
3.4.8 Secuenciación nucleotídica.....	57
3.5 Análisis de imágenes	58
3.6 Cultivos celulares	58

3.6.1 Muestras	58
3.6.2 Obtención de células de la granulosa.....	59
3.6.2.1 Ensayo de medios de cultivo para células de la granulosa	60
3.6.3 Obtención de células de la teca	60
3.6.3.1 Estímulo hormonal en células de la teca.....	61
3.7 Evaluación estadística.....	61
RESULTADOS	63
4.1 Inducción de la enfermedad quística ovárica	64
4.1.1 Diagnóstico y obtención de muestras provenientes de casos con COD espontánea identificados a campo	64
4.2 Concentración de las hormonas esteroides en suero y LF al momento de la ovariectomía	66
4.3 Análisis de los miembros del sistema IGF	67
4.3.1 Evaluación de la expresión de IGF1.....	68
4.3.1.1 Evaluación de IGF1 mediante PCR en tiempo real	68
4.3.1.2 Caracterización y evaluación de IGF1 mediante hibridación in situ	68
4.3.2 Evaluación de la expresión de IGFBP1.....	71
4.3.2.1 Evaluación de IGFBP1 mediante PCR en tiempo real	71
4.3.2.2 Caracterización y evaluación de IGFBP1 mediante hibridación in situ e inmunohistoquímica.....	71
4.3.3 Evaluación de la expresión de IGFBP2.....	71
4.3.3.1 Evaluación de IGFBP2 mediante PCR en tiempo real	71
4.3.3.2 Caracterización y evaluación de IGFBP2 mediante hibridación in situ	72
4.3.3.3 Caracterización y evaluación de IGFBP2 mediante inmunohistoquímica	75
4.3.4 Evaluación de la expresión de IGFBP3.....	77
4.3.4.1 Evaluación de IGFBP3 mediante PCR en tiempo real	77
4.3.4.2 Caracterización y evaluación de IGFBP3 mediante hibridación in situ	77
4.3.4.3 Caracterización y evaluación de IGFBP3 mediante inmunohistoquímica	80
4.3.5 Evaluación de la expresión de IGFBP4.....	82

4.3.5.1 Evaluación de IGFBP4 mediante PCR en tiempo real	82
4.3.5.2 Caracterización y evaluación de IGFBP4 mediante hibridación in situ	82
4.3.5.3 Caracterización y evaluación de IGFBP4 mediante inmunohistoquímica	85
4.3.6 Evaluación de la expresión de IGFBP5	88
4.3.6.1 Evaluación de IGFBP5 mediante PCR en tiempo real	88
4.3.6.2 Caracterización y evaluación de IGFBP5 mediante hibridación in situ	88
4.3.6.3 Caracterización y evaluación de IGFBP5 mediante inmunohistoquímica	91
4.3.7 Evaluación de la expresión de IGFBP6	93
4.3.7.1 Evaluación de IGFBP6 mediante PCR en tiempo real	93
4.3.7.2 Caracterización y evaluación de IGFBP6 mediante hibridación in situ	94
4.3.7.3 Caracterización y evaluación de IGFBP6 mediante inmunohistoquímica	94
4.3.8 Evaluación de la expresión del IGFR tipo 1	96
4.3.8.1 Evaluación de IGFR tipo 1 mediante PCR en tiempo real.	96
4.3.8.2 Caracterización y evaluación de IGFR tipo 1 mediante inmunohistoquímica. .	97
4.3.9 Evaluación de la expresión de la enzima PAPP-A	100
4.3.9.1 Expresión del ARNm de PAPP-A mediante PCR en tiempo real	100
4.3.9.2 Expresión de PAPP-A analizada mediante western blot	100
4.4 Evaluación de la actividad de las IGFBPs	101
4.5 Cultivos celulares. Ensayos preliminares.	102
4.5.1 Ensayo de medios de cultivo para células de la granulosa	103
DISCUSIÓN	107
5.1 Inducción experimental de la enfermedad quística ovárica. Relación con los hallazgos en la enfermedad manifestada espontáneamente en bovinos	108
5.2 Análisis de los niveles hormonales en animales con la enfermedad inducida y los detectados en forma espontánea.	109
5.3 Análisis de los componentes del sistema IGF	110
5.3.1 Expresión de IGF1 en animales controles y con COD espontánea e inducida experimentalmente	110

5.3.2 Expresión de las IGFBPs en animales controles y con COD espontánea e inducida experimentalmente.....	112
5.3.2.1 Análisis de la actividad de IGFBPs en animales controles y animales con COD	116
5.3.3 Análisis de IGFR1 en animales controles y en animales con COD.....	117
5.3.4 Análisis de PAPP-A en animales controles y animales con COD.....	120
5.4 Cultivos.....	123
<i>CONCLUSIONES</i>	126
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	129

ABREVIATURAS UTILIZADAS

βHB	B Hidroxibutirato
11βHSD	11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AKT	Proteína quinasa B
ALS	Subunidad ácido lábil
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BEN	Balance energético negativo
BSA	Albúmina sérica bovina
CaCl₂	Cloruro de calcio
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CL	Cuerpo lúteo
CO₂	Dióxido de carbono
COD	Enfermedad quística ovárica
Ct	Ciclo umbral (del inglés: Cycle thershold)
CYP17A1	Enzima citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa
CYP19A1	Enzima citocromo P450 aromatasa
DAB	3,3-Diaminobencidina
DEPC	Dietil pirocarbonato
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DS	Desvío estándar
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EIA	Enzimoimmunoanálisis

EIA	Enzimoimmunoanálisis
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
FSH	Hormona folículo estimulante
FSHR	Receptor de hormona folículo estimulante
GAP	Proteínas activadoras de GTPasas
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GH	Hormona de crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
IGF	Factor de crecimiento análogo a la insulina
IGFBP	Proteína de unión a IGF
IGFR	Receptor de IGF
IgG	Inmunoglobulina G
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
KCl	Cloruro de potasio
KDa	Kilodalton
KH₂PO₄	Fosfato ácido de potasio
LF	Líquido folicular
LH	Hormona luteinizante
LHR	Receptor de hormona luteinizante
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MEC	Matriz extracelular
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MgSO₄	Sulfato de magnesio
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
NaCl	Cloruro de sodio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
O₂	Oxígeno
PAPP-A	Proteasa plasmática A asociada a la preñez

pb	Pares de bases
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGF2α	Prostaglandina F2 α
PI3K	fosfatidil-inositol-3 quinasa
PKA	Fosfoquinasa A
PM	Peso molecular
ProMBP	Proforma de la proteína básica mayor
RE	Retículo endoplasmático
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
TBS-T	Buffer tris salino-Tween
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
UI	Unidades internacionales

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Condiciones de anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica.	49
Tabla 2	Secuencia de sondas utilizadas en hibridación in situ	52
Tabla 3	Peso molecular de las IGFbPs en muestras de LF (Nicholas y col., 2002)	54
Tabla 4	Secuencia y condiciones de cebadores utilizados en PCR.	55
Tabla 5	Cantidad de ADNc a sembrar	57
Tabla 6	Recuento de las células sembradas	103
Tabla 7	Relación estrógenos/ progesterona para las diferentes concentraciones de células sembradas por pocillo.	105

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	(A) Desarrollo folicular. (B) Principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento con sus componentes	4
Figura 2	Diagrama del ciclo estral bovino mostrando los niveles hormonales en cada una de las etapas de las fases folicular y luteal.	6
Figura 3	Reclutamiento, selección y dominancia en un patrón de tres ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino	7
Figura 4	Esquema de las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipófisis y el ovario.	10
Figura 5	Esquema de los factores más relevantes que influyen en el desarrollo de la COD en bovinos.	15
Figura 6	Componentes del sistema de factores de crecimiento análogos a insulina (IGF)	20
Figura 7	Diagrama esquemático del sistema IGF	21
Figura 8	Mecanismos de acción del sistema IGF en folículos ováricos.	25
Figura 9	Control de la señalización de IGF por medio de PAPP-A.	26
Figura 10	Representación gráfica de las vías de transducción de señales reguladas por las gonadotropinas y los IGFs.	29
Figura 11	Participación de diferentes componentes del sistema IGF durante el crecimiento folicular	32
Figura 12	Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes ováricos foliculares mediante ACTH.	38
Figura 13	Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje por flanco izquierdo.	41
Figura 14	Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje transvaginal.	42
Figura 15	Técnica de aspiración folicular guiada por ecografía.	42
Figura 16	Ovarios controles (A) y ovarios con COD (B).	44
Figura 17	Procesamiento para obtención de células de la granulosa.	59
Figura 18	Procesamiento para obtención de células de la teca.	61
Figura 19	Características morfológicas de los folículos preovulatorios y los quistes en el momento de la ovariectomía.	65
Figura 20	(A) Imagen ecográfica de un quiste espontáneo en el momento de la aspiración folicular guiada por ecografía. (B) Ovarios de una vaca con COD espontánea obtenidos mediante ovariectomía bilateral.	66
Figura 21	Concentraciones de 17 β -estradiol, progesterona y testosterona en suero y LF de folículos grandes y quísticos al momento de la ovariectomía.	67
Figura 22	Expresión relativa de ARNm de IGF1 por PCR en tiempo real	68

Figura 23	Expresión genica relativa de IGF1 en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C).	69
Figura 24	Expresión genica relativa de IGF1 por hibridación in situ en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS) terciarios (FT) y quistes (Q).	70
Figura 25	Imágenes representativas de la localización y expresión relativa de ARNm de IGF1 en folículos terciarios del grupo control (A) y en folículos quísticos de los grupos con COD inducida con ACTH (B) y con COD espontánea (C).	70
Figura 26	Cuantificación relativa del ARNm de IGFBP1 por PCR en tiempo real	71
Figura 27	Cuantificación relativa del ARNm de IGFBP2 por PCR en tiempo real	72
Figura 28	Expresión genica relativa de IGFBP2 en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C).	73
Figura 29	Expresión genica relativa de IGFBP2 por hibridación in situ en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS) terciarios (FT) y quistes (Q).	74
Figura 30	Imágenes representativas de ARNm de IGFBP2 en folículos terciarios del grupo control (A), terciarios del grupo de animales con COD inducida (B) y en folículos quísticos de los grupos con COD espontánea (C) e inducida con ACTH (D).	74
Figura 31	Expresión proteica relativa de IGFBP2, medida como porcentaje de área inmunopositiva, en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C).	75
Figura 32	Expresión proteica relativa de IGFBP2, medida como porcentaje de área inmunopositiva, en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los diferentes grupos analizados.	76
Figura 33	Imágenes representativas de la inmunomarcación de IGFBP2 en folículos terciarios del grupo control (A), en folículos terciarios (B) y quistes del grupos con COD inducida con ACTH (C).	76
Figura 34	Cuantificación relativa del ARNm de IGFBP3 por PCR en tiempo real	77
Figura 35	Expresión genica relativa de IGFBP3 en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C).	78
Figura 36	Expresión génica relativa de IGFBP3 por hibridación in situ en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS) terciarios (FT) y quistes (Q).	79
Figura 37	Imágenes representativas de la localización de la expresión relativa de ARNm de IGFBP3 en folículos terciarios del grupo control (A), en quistes del grupo con COD espontánea (B) y quistes inducidos con ACTH (C).	79
Figura 38	Expresión proteica relativa de IGFBP3 en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C).	80
Figura 39	Expresión proteica relativa de IGFBP3 en células de la granulosa y de la teca interna de	81

folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quísticos (Q) de animales controles, con COD inducida y espontánea.

Figura 40	Imágenes representativas de la inmunomarcación de IGFBP3 en folículos terciarios del grupo control (A), en folículos quísticos de los grupos con COD inducida con ACTH (B) y con la COD espontánea (C).	81
Figura 41	Cuantificación relativa del ARNm de IGFBP4 por PCR en tiempo real	82
Figura 42	Expresión genica relativa de IGFBP4 en células de la granulosa y de la teca de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C).	83
Figura 43	Expresión genica relativa de IGFBP4 por hibridación in situ en células de la granulosa y de la teca de folículos primarios (FP), secundarios (FS) terciarios (FT) y quistes (Q).	84
Figura 44	Imágenes representativas de la localización del ARNm de IGFBP4 en folículos terciarios del grupo control (A), folículos terciarios del grupo con COD espontánea (B) y en folículos quísticos de los grupos con COD inducida con ACTH (C) y con COD espontánea (D).	85
Figura 45	Expresión proteica relativa de IGFBP4, medida como porcentaje de área inmunopositiva, en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C).	86
Figura 46	Expresión proteica relativa de IGFBP4 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quísticos (Q) de animales controles, con COD inducida y con COD espontánea.	87
Figura 47	Imágenes representativas en 40X de la inmunomarcación de IGFBP4 en folículos terciarios del grupo control (A), y en folículos quísticos de los grupos con COD inducida con ACTH (B) y con COD espontánea (C).	87
Figura 48	Cuantificación relativa del ARNm de IGFBP5 por PCR en tiempo real	88
Figura 49	Expresión genica relativa de IGFBP5 en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C).	89
Figura 50	Expresión genica relativa de IGFBP5 por hibridación in situ en células de la granulosa folículos primarios (FP), secundarios (FS) terciarios (FT) y quistes (Q).	90
Figura 51	Imágenes representativas en de la localización de la expresión de ARNm de IGFBP5 en folículos terciarios del grupo control (A), en quistes inducidos con ACTH (B) y en quistes espontáneos (C).	90
Figura 52	Expresión proteica relativa de IGFBP5, medida como porcentaje de área inmunopositiva en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C).	91
Figura 53	Expresión proteica relativa de IGFBP5 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quísticos (Q) de los animales controles, con COD inducida y con COD espontánea.	92
Figura 54	Imágenes representativas de la inmunomarcación de IGFBP5 en folículos terciarios del grupo control (A), en folículos quísticos de los grupos con COD inducida con ACTH (B) y	93

en folículos quísticos del grupo con la COD espontánea (C).

Figura 55	Cuantificación relativa del ARNm de IGFBP6 por PCR en tiempo real	94
Figura 56	Expresión proteica relativa de IGFBP6, medida como porcentaje de área inmunopositiva, en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C).	95
Figura 57	Expresión proteica relativa de IGFBP6 en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quísticos (Q) de los animales controles, con COD inducida y con COD espontánea.	95
Figura 58	Imágenes representativas de la inmunomarcación de IGFBP6 en folículos terciarios del grupo control (A), en folículos terciarios (B) y quísticos de los grupos con COD inducida con ACTH (C).	96
Figura 59	Cuantificación relativa del ARNm de IGFR1 por PCR en tiempo real	97
Figura 60	Expresión proteica relativa de IGFR1, medida como porcentaje de área inmunopositiva, en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C).	98
Figura 61	Expresión proteica relativa del IGFR1 en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quísticos (Q) de los animales controles, con COD inducida y con COD espontánea.	98
Figura 62	Imágenes representativas de la inmunomarcación de IGFR1 en folículos terciarios del grupo control (A), folículos terciarios del grupo con COD espontánea (B) y quistes de los grupos con COD inducida con ACTH (C) y con COD espontánea (D).	99
Figura 63	Cuantificación relativa del ARNm de PAPP-A por PCR en tiempo real	100
Figura 64	Imagen representativa del western blot que muestra la PAPP-A a 181KDa en folículos terciarios pequeños (TP), medianos (TM), grandes (TG) y quistes (Q).	100
Figura 65	Detección de PAPP-A mediante western blot en líquido folicular proveniente de folículos controles terciarios pequeños (TP), medianos (TM) y grandes (TG) y en folículos quísticos (Q).	101
Figura 66	Imagen representativa del western ligand blot que muestra las IGFBPs unidas a IGF1 biotinilado.	102
Figura 67	Cuantificación de las IGFBPs en líquido folicular por western ligand blot en folículos terciarios pequeños (TP), medianos (TM), grandes (TG) y quistes (Q).	102
Figura 68	Fotografías en microscopio invertido de las células sembradas con DMEM:F12 y suplementado con FHS e insulina (A), con insulina- transferrina- selenio (B), con selenio- transferrina (C) y sin suplementos (D) a las 72 horas de cultivo.	103
Figura 69	Relación estrógenos/progesterona correspondientes al medio de cultivo con diferentes suplementos obtenidos a diferentes tiempos.	104
Figura 70	Medición de CYP19 en células de la granulosa cultivadas en medio de cultivo con distintos suplementos obtenidas a diferentes tiempos.	104
Figura 71	Fotografías en microscopio invertido de las células de la teca sembradas con DMEM:F12	105

y estimuladas con LH a las 12 h.

Figura 72 Medición de CYP17a1 en células de la teca cultivadas en medio de cultivo con distintos estímulos de LH obtenidas a diferentes tiempos. **106**

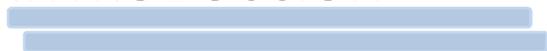
RESUMEN

La enfermedad quística ovárica (COD) es uno de los trastornos reproductivos más frecuentes en vacas lecheras de alta producción. Alteraciones en la funcionalidad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal serían responsables del desarrollo de la COD. Considerando al sistema factores de crecimiento análogos a insulina (IGF) como importantes reguladores del crecimiento y funcionalidad folicular, evaluamos la participación de componentes del sistema IGF que podrían asociarse al desarrollo de la COD. Se evidenció una disminución del ARNm IGF1 en la granulosa de quistes respecto a folículos controles. Si bien no hubo cambios en la expresión proteica de las proteínas de unión a IGF (IGFBP) 2 y 3, la expresión del ARNm disminuyó en la granulosa de quistes respecto a folículos controles. La actividad de IGFBP3 en líquido folicular (LF) fue superior a las restantes IGFBPs, mientras que para IGFBP2 se mantuvo constante. La expresión génica y proteica de IGFBP4 y 5 en células de la granulosa y la actividad en LF disminuyó en quistes respecto a folículos terciarios del grupo control. El ARNm de IGFR1 y PAPP-A fue menor en la granulosa de folículos controles respecto a quistes. A nivel proteico, IGFR1 aumentó en la granulosa de quistes respecto a folículos terciarios controles y la PAPP-A aumentó en el LF de quistes comparados con los folículos terciarios controles. No se detectó expresión y actividad de IGFBP1 y 6. Estos resultados evidenciarían que alteraciones en los componentes del sistema IGF afectarían al normal funcionamiento del ovario participando en el desarrollo de la COD en bovinos.

ABSTRACT

Cystic ovarian disease (COD) is one of the more frequent reproductive disorders in dairy cows. Alterations in the function of the hypothalamic-hypophysis-gonadal axis would be responsible for developing the COD. Considering that the insulin like growth factor (IGF) system is an important regulator of the follicular growth and functionality, the involvement of members of the IGF system that could be associated to the development of COD was evaluated. A decrease in mRNA of IGF1 in granulosa cells of cysts was detected compared to control follicles. While protein expression of IGF binding proteins (IGFBP) 2 and 3 was not changed, mRNA expression in granulosa of cysts was decreased related to control follicles. A higher level of IGFBP3 activity in follicular fluid (FF) was detected compared to other IGFBPs, and IGFBP2 activity was constant. The gene and protein expression of IGFBP4 and 5 in granulosa cells, and their activity in FF was decreased in cysts related to control tertiary follicles. Decreased levels of mRNA of IGFR1 and PAPP-A in granulosa cells of control follicles compared to cysts was detected. IGFR1 protein was higher in granulosa cells of cyst than in control tertiary follicles and PAPP-A was increased in FF of cysts respect to controls. No expression and activity of IGFBP1 and 6 was detected. These results would demonstrate that alterations in components of the IGF system could alter the normal ovarian function participating in the development of the COD in cattle.

INTRODUCCIÓN



1.1 Histofisiología ovárica

El ovario es considerado una glándula mixta debido a que produce una proporción equilibrada de hormonas esteroides (glándula endocrina) y células sexuales fecundables en forma cíclica (glándula exocrina). De su actividad depende el funcionamiento del aparato reproductor, la migración de los gametos y del embrión incipiente, asegurando su implantación y desarrollo exitosos (Hafez y Hafez, 2000).

Dentro del ovario, el folículo es el compartimiento que permite el desarrollo de la doble función: gametogénesis y esteroidogénesis. Es una unidad fisiológica equilibrada cuyo funcionamiento y estructura dependen de factores extracelulares como las gonadotropinas, que conducen una sucesión de transformaciones subcelulares y moleculares de diversos componentes del folículo: el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca (Hafez y Hafez, 2000).

1.1.1 Ovogénesis y foliculogenesis

De acuerdo a lo establecido por la Nomenclatura Histológica (1994) los folículos se clasifican en: folículos primordiales, primarios, secundarios, terciarios y preovulatorios (Figura 1).

Los folículos primordiales constituyen una reserva de folículos en reposo que serán reclutados para desarrollarse o atresarse durante la vida reproductiva de la hembra. Están compuestos por un ovocito rodeado por una capa de células planas epiteliales llamadas células foliculares y carecen de células de la teca (Dellmann y Eurell, 1998; Espinoza Villavicencio, 2007). A medida que el ovocito del folículo primordial aumenta de tamaño, la capa de células foliculares aplanadas se convierte en una capa simple de células cúbicas o cilíndricas convirtiéndose en folículos primarios (Dellmann y Eurell, 1998; Aerts y Bols, 2010a). La transformación a folículos secundarios implica una intensa división mitótica de las células foliculares que rodean al ovocito y consiguiente estratificación del epitelio que originalmente era simple. A partir de este momento las células se denominan granulosa. Alrededor de las mismas aparece la lámina basal, originada por secreción de las propias células de la granulosa. En esta etapa se completa la maduración de la zona pelúcida y se forman zonas de contacto físico de ésta con la membrana plasmática del ovocito que permiten mantener un contacto directo con el ovocito y proporcionarle los nutrientes

necesarios. Las células del estroma ovárico se organizan alrededor de la lámina basal del folículo originando las células precursoras de la teca (Aerts y Bols, 2010a). En las fases finales del desarrollo folicular, el ovocito detiene su crecimiento y se vuelve competente para recomenzar la meiosis (Dellmann y Eurell, 1998). Durante esta fase, las células de la granulosa proliferan aumentando el número de capas. Al mismo tiempo, las células precursoras de la teca aparecen completamente diferenciadas formando dos capas concéntricas. La interna, formada por células epiteloides, que serán transformadas en células cuboides secretoras de hormonas esteroides, recibe el nombre de teca interna. Rodeando la misma, aparece la teca externa formada principalmente por tejido conectivo. Ambas capas de la teca reciben una abundante vascularización, que se concentra fundamentalmente en la teca interna, además de vasos linfáticos y terminaciones nerviosas. Los vasos sanguíneos no atraviesan la lámina basal que rodea las células de la granulosa, determinando que tanto las células de la granulosa como el ovocito reciban los nutrientes de la sangre por difusión a través de la lámina basal. Progresivamente, se forman pequeñas vesículas llenas de líquido, llamado líquido folicular (LF), entre las células de la granulosa. El LF aumenta a medida que crece el folículo, las vesículas que lo contienen confluyen formando amplias lagunas, constituyendo una cavidad denominada antro y su aparición caracteriza al folículo terciario (Dellmann y Eurell, 1998). Al incrementar la producción de LF, el antro aumenta de tamaño y el ovocito en el interior del folículo se desplaza hacia una posición excéntrica rodeado por dos a tres capas de células de la granulosa formando el cúmulo ovífero (Aerts y Bols, 2010a).

Aquellos folículos terciarios que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración, y han adquirido la capacidad para ovular frente a adecuados niveles de LH se denominan folículos preovulatorios. Las células de la granulosa aumentan de tamaño y adquieren inclusiones lipídicas, mientras que en las células de la teca interna aparecen vacuolas y aumenta la vascularización. Estos folículos se caracterizan por una baja tasa mitótica de las células foliculares y una alta relación estrógenos/andrógenos y estrógenos/progesterona en el LF. Además, las células de la granulosa presentan receptores de LH, alta producción de inhibina y elevado flujo sanguíneo comparado con los folículos atrésicos (Dellmann y Eurell, 1998).

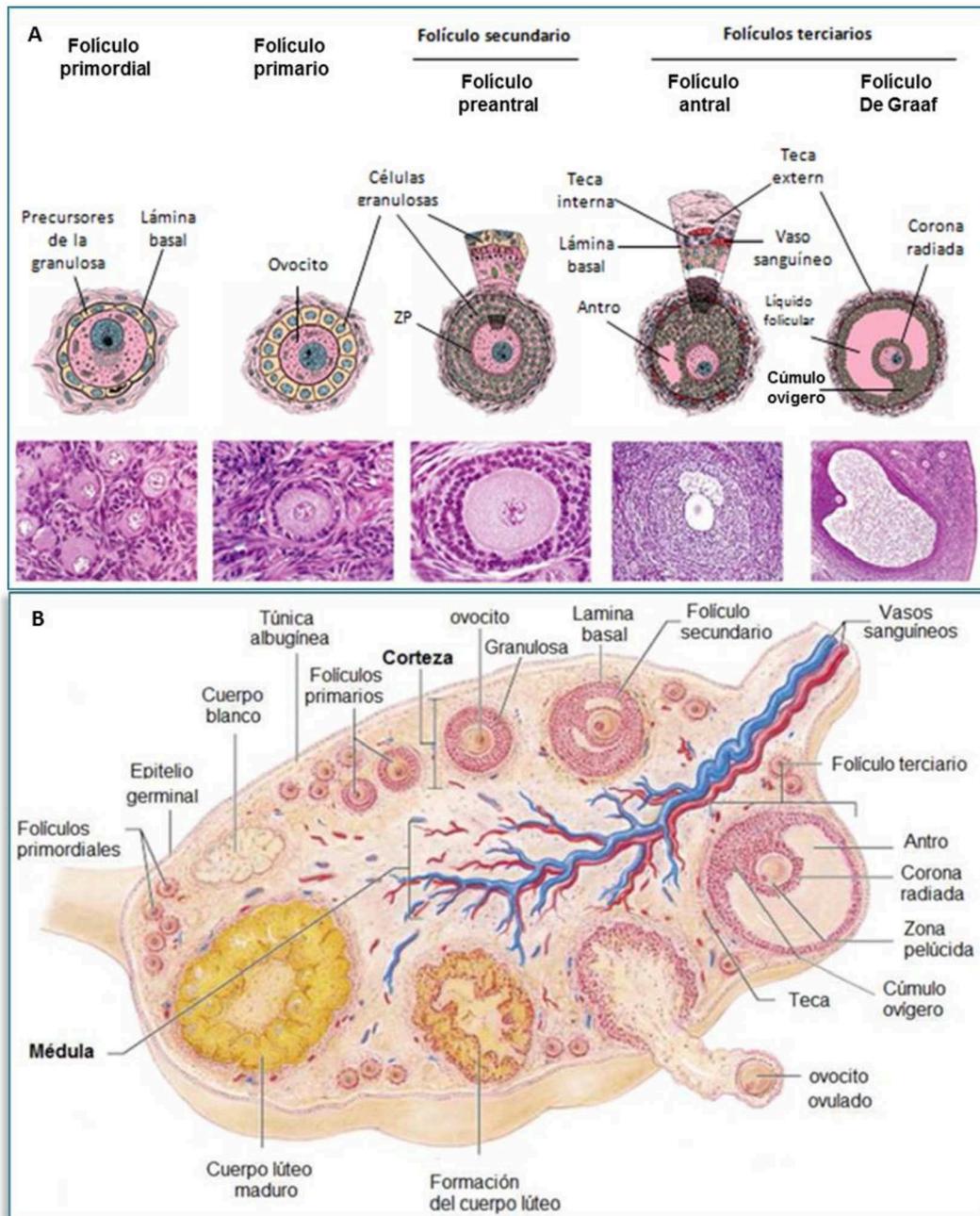


Figura 1: (A) Desarrollo folicular. Esquema de un corte longitudinal de ovario adulto en el cual se observan las distintas categorías de folículos en crecimiento, la ovulación, cuerpo lúteo y cuerpo blanco (adaptado Ross y col. 2004) **(B)** Principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento con sus componentes (Modificado de Enciclopedia Británica, 2007).

Finalmente, y debido a un ascenso de los niveles de estrógenos séricos, seguido de un pico de LH y de FSH ocurre la ruptura del folículo preovulatorio y la liberación del ovocito. Luego de la ovulación, las capas foliculares se reorganizan para convertirse en principio, en cuerpo hemorrágico y luego, en cuerpo lúteo (CL). La principal función del CL es la de secretar progesterona que permite el acondicionamiento del útero para el

período de preñez y la regulación de las contracciones del oviducto para el transporte del óvulo hacia el útero (Dellmann y Eurell, 1998).

La foliculogénesis en los mamíferos es un proceso altamente selectivo. Una pequeña proporción de folículos totales (menor al 0,1%) sobrevive a la atresia y llega a formar un folículo dominante. Sólo en presencia de la FSH el folículo crecerá y evadirá la atresia. Los folículos destinados a la atresia se caracterizan por la pérdida en la capacidad para producir estradiol y un aumento en la producción de proteínas de unión a factores de crecimiento análogos a insulina (IGFBPs). Si bien el 99,9% de los folículos primordiales llegan a la muerte por atresia, la mayor parte de los folículos que superan este estadio sufren dicho proceso en diferentes momentos de su desarrollo, siendo, en general, sólo uno el que alcance la eventual ovulación (Adams y Pierson, 1995; Matsuda y col., 2012). La atresia se caracteriza por cambios degenerativos no inflamatorios que llevan a la pérdida del ovocito, de células de la granulosa y de receptores hormonales.

1.2 Ciclo estral

Las hembras bovinas son poliéstricas continuas y muestran conducta de celo aproximadamente cada 21 días (18-24 días). El ciclo estral está regulado por la liberación de hormonas del hipotálamo (GnRH, kisspeptina), de la glándula hipófisis (FSH y LH), de los ovarios (progesterona, estradiol e inhibinas) y del útero (prostaglandina F2 α : PGF2 α). Estas hormonas actúan por retroalimentación positiva y negativa para controlar el ciclo estral en los bovinos (Roche, 1996; Forde y col., 2011; Endo y col., 2012).

El ciclo estral en los bovinos tiene en promedio 2 o 3 ondas foliculares pero sólo la última resulta en ovulación. La primera onda folicular del ciclo emerge en el día de la ovulación (día 0), el patrón de la segunda onda ocurre en el día 9-10 para los ciclos de 2 ondas (Figura 2). En los ciclos de 3 ondas, la segunda onda emerge en los días 7-9 y la tercera onda emerge entre los días 15-16. Las ondas surgen a partir de la etapa prepuberal del bovino, y continúan durante su periodo reproductivo, que incluye la gestación, el posparto, la lactación, y en anestro. El ciclo consiste en una **fase folicular** (4-6 días), y una **fase luteal** (14-18 días):

Fase folicular. Es un periodo relativamente corto del ciclo estral que involucra el proestro y el estro. Se caracteriza por un cambio en la dominancia de la progesterona a la dominancia del estrógeno como resultado de la regresión funcional y estructural del CL. Las concentraciones circulantes de estradiol presentan un pico asociado con el comienzo de la receptividad sexual y finaliza con la ovulación del folículo dominante (Adams y Pierson 1995, Forde y col., 2011).

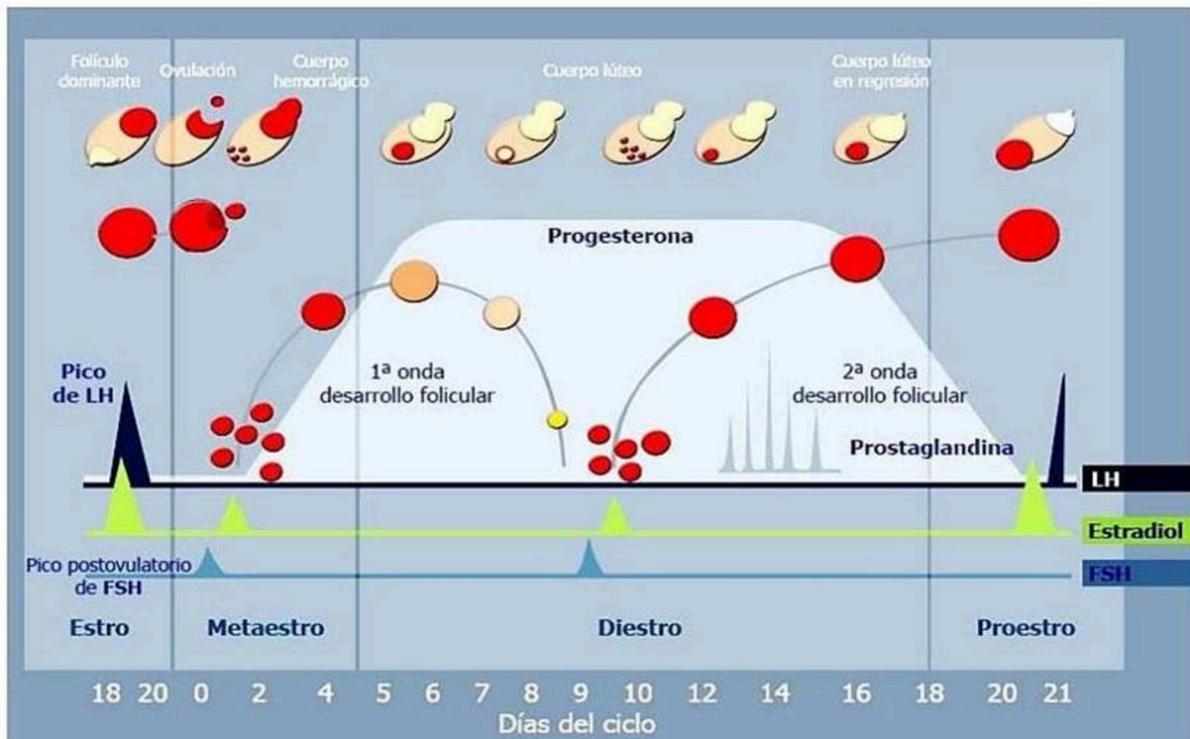


Figura 2: Diagrama del ciclo estral bovino mostrando los niveles hormonales en cada una de las etapas de las fases folicular y luteal. (Adaptado de Enciclopedia Bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM)

Fase luteal. Es el periodo del ciclo estral que involucra el metaestro y diestro. Presenta un cambio en la dominancia de los estrógenos a una dominancia de la progesterona luego de la ovulación. Las concentraciones de progesterona secretadas por el CL regulan el desarrollo folicular por un mecanismo de retroalimentación negativa de la frecuencia pulsátil de liberación de LH (Adams y Pierson 1995, Kinder y col., 1996; Endo y col., 2012).

1.2.1 Ondas foliculares

El desarrollo de folículos en el ovario es un proceso dinámico que involucra el reclutamiento de un grupo de folículos en crecimiento, la selección fisiológica de un folículo ovulatorio y la ovulación o su regresión (Figura 3).

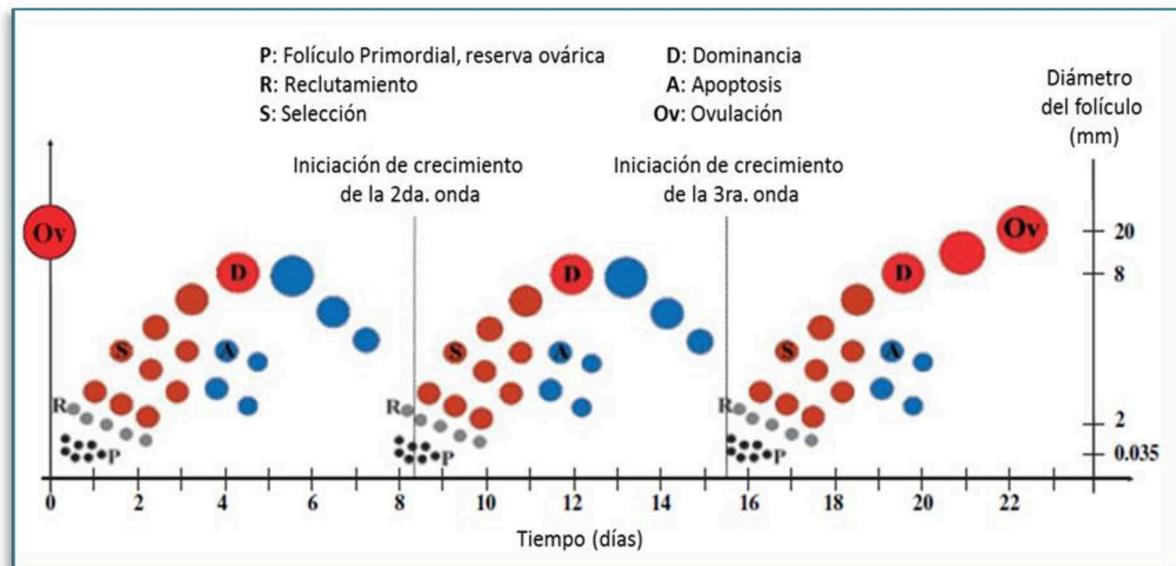


Figura 3: Reclutamiento, selección y dominancia en un patrón de tres ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino (Adaptado de Aerts y Bols 2010b).

De acuerdo a Goodman y Hodgen (1983) la foliculogénesis puede estar dividida en 3 etapas, el reclutamiento, la selección y por último, la dominancia (Armstrong y Webb, 1997; Aerts y Bols, 2010b).

El **reclutamiento** implica que una cohorte (5-10 folículos en bovinos) de folículos terciarios es capaz de evadir a la apoptosis debido al incremento de niveles de la FSH circulantes para continuar con el desarrollo.

La regresión del folículo dominante durante una onda en crecimiento o en la ovulación al final del ciclo estral causa una elevación de la FSH circulante. La pérdida del folículo dominante es acompañada por la disminución de los niveles hormonales sintetizados por el folículo tales como estrógenos e inhibina resultando, a través de la retroalimentación negativa, en un incremento en la secreción de FSH por la glándula hipofisaria. La FSH actúa como un factor importante en la fase temprana del folículo antral, siendo responsable del reclutamiento de una nueva cohorte de folículos antrales para la siguiente onda folicular.

Durante la **selección**, el aumento de la FSH es responsable de la iniciación del crecimiento folicular cuando el folículo más grande llega a 4-5mm y los demás son destinados a la atresia. Los máximos niveles de FSH en la primera onda folicular del ciclo son típicamente expresados luego de aproximadamente 28h del estro. La

producción y secreción de estradiol e inhibina por el folículo en crecimiento resulta en la disminución de la liberación de la FSH, a pesar de esto, estos folículos siguen dependientes de la FSH para su continuo crecimiento.

Otro factor que estaría involucrado en la selección folicular, sería el sistema de factores de crecimiento análogos a insulina (IGF). Los IGFs poseen actividades paracrinas y autocrinas, que incluyen el aumento en el crecimiento de las células, en la producción de estradiol y de la sensibilidad en las células de la granulosa a la FSH.

Cuando el folículo de mayor tamaño de la onda, llega a un diámetro cercano a 8,5 mm, se produce la *desviación*. Hasta alcanzada esta instancia todos los folículos en crecimiento retienen la capacidad de convertirse en folículos dominantes, luego de la desviación, el folículo de mayor tamaño alcanza la **dominancia** y los demás regresan. Al comienzo de la desviación folicular, este folículo es capaz de utilizar los bajos niveles de FSH, posiblemente potenciados por el efecto local del estradiol y del IGF1. La baja concentración de FSH impide la emergencia de una nueva cohorte de folículos en crecimiento y se produce la regresión de los folículos de menor tamaño (Santiago y col., 2005; Aerts y Bols, 2010b).

La LH posee un rol importante durante la fase de dominancia, se uniría a sus receptores en las células de la granulosa que se expresan aproximadamente 8 horas antes del comienzo de la desviación y estimularía la síntesis de estradiol (Ginther y col., 2001). El estradiol induciría cambios en el mecanismo de desviación folicular, tales como un aumento de la actividad de la enzima aromatasa, estimulación de la expresión de receptores para LH y aumento de la sensibilidad para las gonadotropinas (Aerts y Bols, 2010b).

1.2.2 Regulación del ciclo estral

El proceso reproductivo de los mamíferos está regulado por una combinación de actividades del sistema neuroendocrino, tejidos diana y la presencia de sistemas de regulación autocrina/paracrina. La actividad ovárica está regulada por un proceso integrado que abarca señales extraováricas y factores intrafoliculares (Webb y col., 2004). Los ovarios actúan como una unidad aislada, cada onda folicular incluye folículos de ambos ovarios que responden al unísono. En las especies monotocas, sólo un folículo es seleccionado para continuar la dominancia, de cualquiera de los ovarios.

Si bien los factores intrafolículos (autocrinos y paracrinos) son importantes para el crecimiento, no hay estudios que indiquen que un folículo afecte el estado de salud/regresión de los folículos vecinos directamente por un efecto de localización (Austin y col., 2002).

El ciclo estral es regulado por interacciones hormonales regidas por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Figura 4). El eje hipotálamo-hipofisario está constituido por neuronas neurosecretoras localizadas en el hipotálamo y la glándula hipófisis. Este sistema es regulado por una hormona de naturaleza peptídica, denominada GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas). La GnRH, sintetizada por el hipotálamo, es transportada a la eminencia media y difunde a los capilares del sistema porta hipofisario y luego a las células de la adenohipófisis donde estimula la síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias: folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH). Estas dos hormonas, de naturaleza peptídica, son denominadas gonadotropinas ya que su órgano blanco son las gónadas donde estimulan la gametogénesis y la liberación de esteroides gonadales (Ungerfeld 2002).

Entre las hormonas secretadas en la adenohipófisis, la FSH y la LH cumplen un papel relevante en el control neuroendocrino del ciclo estral. La FSH es la responsable del proceso de esteroidogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular. La FSH además, induce la sensibilidad de las células de la granulosa por LH al incrementar el número de receptores para esta hormona. La LH interviene, además de la esteroidogénesis, en los procesos de ovulación, desarrollo del CL y luteinización (Eppig, 2001). Tanto la FSH como la LH son secretadas a la circulación en forma de pulsos y son reguladas por dos sistemas, el tónico y el cíclico. El sistema tónico produce el nivel basal circulante de hormonas hipofisarias que promueven el desarrollo de los componentes germinales y endocrinos de las gónadas. El sistema cíclico opera más agudamente, siendo evidente por solo 12 a 24 horas en cada uno de los ciclos reproductivos de la hembra. La función primaria del modo cíclico es desencadenar el pico preovulatorio de LH y, en consecuencia, la ovulación. Si bien la liberación de LH y FSH es inducida por pulsos de GnRH, las concentraciones tónicas de las mismas son controladas por retroalimentación negativa desde las gónadas mediante secreción de estrógenos, progesterona e inhibina. Además existe una modulación local que incluye a miembros de la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), como por

ejemplo inhibina, activina, y el factor de crecimiento análogo a la insulina (IGF) (Aerts y Bols, 2010a).

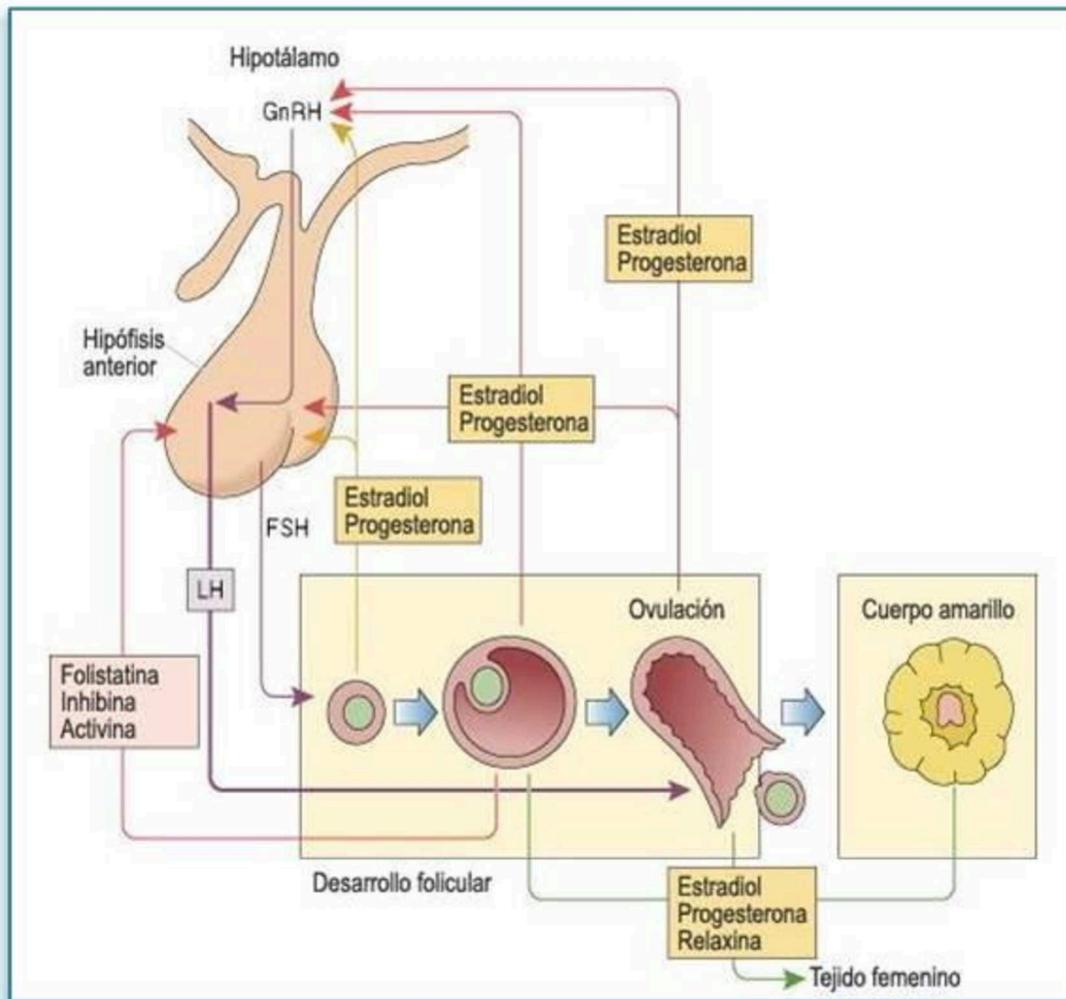


Figura 4: Esquema de las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipófisis y el ovario. (Gartner y Hiatt, 1997).

En los folículos terciarios, la LH interacciona con los receptores de LH (LHR) de las células de la teca interna y junto con la enzima citocromo P450 17A1 (CYP17A1) son los responsables de la producción de andrógenos (Hafez y Hafez, 2000; Drummond, 2006; Palma, 2008). Los andrógenos son secretados a los capilares o pueden atravesar la lámina basal para alcanzar las células de la granulosa. Los receptores de FSH (FSHR) expresados por células de la granulosa, al interactuar con FSH, estimulan a la enzima aromatasa P450 (CYP19A1) y activan el sistema para la aromatización de los andrógenos tecales (testosterona) en estrógenos, que luego son secretados al LF y los capilares. Así, los niveles basales de LH actúan conjuntamente con FSH para estimular la secreción de estrógenos por parte del folículo dominante, ya que las células de la

granulosa de folículos maduros son inducidas por la FSH para expresar progresivamente LHR. De esta manera, los folículos maduros aumentan su sensibilidad a LH en la onda preovulatoria. Además, el incremento de los LHR prepara al folículo para el proceso de luteinización, posterior a la ovulación (Hafez y Hafez, 2000; Mihm y Austin, 2002; Wiltbank y col., 2002). La liberación en pulsos de LH y FSH induce las etapas finales de la maduración del ovocito, previo a la ovulación. En este sistema de retroalimentación positiva, un aumento en la concentración de estrógenos circulantes ejerce un efecto de retroalimentación positiva en el centro cíclico del hipotálamo, induciendo una onda repentina de liberación de GnRH, la cual se acompaña por la onda preovulatoria de LH y FSH. En consecuencia, los niveles de estradiol disminuyen inmediatamente después de la liberación cíclica de estas dos gonadotropinas (Hafez y Hafez, 2000).

Los efectos de la progesterona, producida por el CL en respuesta a LH, se observan una vez que el tejido blanco ha estado expuesto a la estimulación de los estrógenos. Esta preparación por los estrógenos conduce a un efecto sinérgico. A nivel hipotalámico, la progesterona ejerce una retroalimentación negativa sobre el centro tónico.

Ciertos péptidos gonadales estimulan (activinas) o inhiben (inhibinas, foliculostatina) la secreción de FSH a nivel de la hipófisis (Delgado y col., 2011). La inhibina, hormona proteica, es producida por células de la granulosa e interviene en el mecanismo de regulación de la secreción de la FSH. Ejerce una retroalimentación negativa a nivel hipofisiario, produciendo la supresión de la liberación de FSH sin alterar la liberación de LH, evidenciando que podría ser, en parte, responsable de la liberación diferencial de FSH y LH desde la hipófisis. A nivel de la hipófisis, la activina estimula la secreción de la FSH (Hafez y Hafez, 2000; Aerts y Bols, 2010a). La FSH realizaría una acción sinérgica con los IGFs y activinas en la regulación de la proliferación y diferenciación celular así como en la esteroidogénesis en las células ováricas (Lucy, 2000; Silva y col., 2009).

1.3 Enfermedad quística ovárica

La enfermedad quística ovárica (de inglés cystic ovarian disease: COD) es una de las principales causas de falla reproductiva y de infertilidad, y constituye uno de los

trastornos reproductivos más frecuentes en vacas lecheras (Vanholder y col., 2006). Los quistes ováricos ocasionan importantes pérdidas económicas en la producción, dado que provocan una prolongación de los intervalos parto-primer celo, parto-concepción y parto-parto (Silvia y col., 2002). Debido a esto, se generan incrementos en los costos veterinarios y aumentos de la tasa de rechazo (Peter, 2004; Vanholder y col., 2006; Rizzo y col., 2011) estimándose pérdidas de US\$137 por lactancia (Johnston y col., 1997; Silvia y col., 2002). El rango de ocurrencia de la COD es entre los 33 y los 148 días posparto. La incidencia de los quistes foliculares varía entre el 5 a 10%, si bien se reporta hasta un 30%, el 24% de los quistes que aparecen antes de los 39 días posparto regresan espontáneamente (Garverick, 1997; Silvia y col., 2002; Hooijer, 2003; Peter, 2004; Nelson y col., 2010). La regresión espontánea sería del 60% si la condición se considera antes de los 30 días postparto, por lo que la incidencia es influenciada por el momento en el que se realiza la primer examinación posparto y por el protocolo de fertilidad usado (Opsomer y col., 1996; Hooijer, 2003).

La COD se caracteriza por la presencia de estructuras foliculares de un diámetro mayor al ovulatorio, que permanecen en el tiempo ocasionando trastornos en la funcionalidad ovárica. Los quistes son estructuras dinámicas, descritos como folículos anovulatorios únicos o múltiples, localizados en uno o ambos ovarios, que tienen un diámetro mayor a 18 mm (mayor al ovulatorio), con una persistencia superior a los 6 días, en ausencia de tejido luteal, sin tonicidad uterina y con interrupción de los ciclos estrales normales (Silvia y col., 2002; Bartolomé y col., 2006). Los quistes pueden regresar y ser reemplazados por otros quistes, pueden atresarse o luteinizarse e inclusive puede producirse la ovulación de otro folículo dominante en presencia de estas estructuras por lo cual se establece que la COD es una enfermedad dinámica (Hamilton y col., 1995; Silvia y col., 2002; Bartolomé y col., 2005).

Los quistes se desarrollan a partir de folículos preovulatorios que han fallado en ovular, persisten en el ovario y luego interfieren con la función normal del ovario. Los signos clínicos más relevantes de esta enfermedad son el anestro, manifestaciones de ninfomanía y ciclos estrales irregulares (Hooijer, 2003).

Diferentes estudios demostraron que el desarrollo de quistes foliculares está asociado con un desbalance endocrino en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Vanholder y col., 2006, Salvetti y col., 2007). Existe un creciente interés sobre el rol de

las hormonas metabólicas y la función de factores asociados en el ganado bovino. La insulina y el factor de crecimiento análogo a insulina 1 (IGF1) han sido postulados como mediadores entre el estado nutricional y la función ovárica en bovinos (Webb y col., 2004; Kawashima y col., 2007). Altas concentraciones de IGF1 e insulina en circulación se asocian con el corto intervalo entre el parto y la primera ovulación (Butler, 2000). En el ovario humano, los receptores de insulina han sido localizados en el ovocito, en las células de la granulosa, células de la teca y estroma, sugiriendo que la acción de la insulina en el ovario está mediada por los receptores (Samoto y col., 1993). Diferentes estudios in vivo e in vitro en bovinos indican que la insulina y el IGF1 estimulan tanto la síntesis de estradiol en células de la granulosa como síntesis de andrógenos en las células de la teca (Spicer y col., 1993; Spicer y Echterkamp 1995; Armstrong y col., 2002). Se ha postulado que el estado metabólico del folículo en la etapa final del desarrollo juega un rol esencial en la selección del folículo para la dominancia. Entonces, puede suponerse que alguna falla en los sistemas IGF/ insulina podrían llevar a la regresión folicular o a la formación del quiste (Braw-Tal y col., 2009).

1.3.2 Factores predisponentes en la formación de quistes

Existen diversos factores que contribuyen con el desarrollo de quistes ováricos bovinos. Estos pueden clasificarse en factores generales y factores específicos (Figura 5).

Dentro de los factores generales se pueden mencionar la producción de leche, la edad, el momento reproductivo, la condición corporal, la estación del año y como uno de los más relevantes, la herencia. Se ha visto que la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en algunas líneas de sangre de ganado. En razas destinadas a la producción láctea, existe una mayor predisposición genética a COD (Hooijer y col. 2001; Peter, 2004).

La COD se observa frecuentemente en vacas de alta producción láctea durante la lactancia temprana. La tasa de quistes ováricos aumenta con la edad y presenta una distribución variable según la estación del año (Garverick y col., 1997). En diferentes estudios se ha demostrado la ocurrencia de COD en las distintas zonas climáticas. En regiones frías, la mayor ocurrencia de COD es en bovinos con partos ocurridos en otoño, los cuales se corresponden con el periodo de servicio en establos durante el

invierno. En regiones tropicales o cálidas, se han reportado mayor número de casos de animales con COD durante el verano debido al estrés por calor (Nelson y col., 2010). Por otro lado, la condición corporal de los animales es otro factor predisponente importante. Las vacas con una condición corporal superior a 4 (escala de 0 a 5) presentan quistes con una frecuencia de 2,5 veces superior a las que poseen una condición corporal menor o igual a 3 (Salveti y col., 2007).

La tasa de quistes ováricos aumenta con la edad, siendo muy raro su hallazgo en vaquillonas. La mayor frecuencia de la enfermedad en el puerperio denota el efecto de los disturbios endocrinos, característicos de esa etapa de la vida de la hembra bovina.

La alimentación es uno de los factores específicos que pueden predisponer a la presentación de COD en bovinos lecheros. Las raciones ricas en proteínas utilizadas para elevar la producción de leche, asociadas a la falta de ejercicio, podrían ser factores importantes en el desarrollo de la enfermedad. Durante la lactancia temprana la mayor parte de la energía del animal es destinada hacia la producción de leche y requerimientos de mantenimiento, provocando un estado de balance energético negativo (BEN) durante el cual existe una importante movilización de las reservas corporales (Bauman y Currie, 1980; Hooijer et al, 2005).

Durante el posparto, las concentraciones periféricas de insulina, IGF-1, glucosa (Beam y Buttler, 1999) y leptina (Block y col., 2001; Liefers y col., 2003) están reducidas, mientras que las concentraciones de metabolitos tales como ácidos grasos no esterificados (AGNEs) (Rukkwamsuk y col., 2000) y β -hidroxibutirato (β -HB) están incrementadas (Leroy y col., 2004). Las bajas concentraciones sistémicas de IGF1 en el posparto temprano podrían contribuir a la anovulación y subsecuente desarrollo de quistes foliculares (Zulu y col., 2002).

Las dietas altas en proteínas estimulan la producción de leche en la lactancia temprana (Butler, 1997) pero se ha demostrado que el consumo de proteína por encima de las necesidades para la producción, genera un efecto negativo sobre la eficiencia reproductiva (Canfield y Butler., 1990). Este efecto negativo en el comportamiento reproductivo se debería al incremento del gasto energético para desintoxicar al hígado del exceso de amoníaco (Staples y col., 1998). Con respecto a otros desórdenes metabólicos, se ha sugerido que la resistencia insulínica o la

hiperinsulinemia no tienen un rol importante en la etiología de la enfermedad en bovinos. Una insuficiencia de insulina más que una resistencia a la misma ha sido observada en vacas con quistes, indicando una interacción alterada entre glucosa e insulina a nivel pancreático (Opsomer y col., 1999). Esta deficiencia de insulina se debe principalmente a que la glándula mamaria utiliza gran parte de la glucosa circulante para la síntesis de lactosa, descendiendo la glucemia y consecuentemente la secreción de insulina.

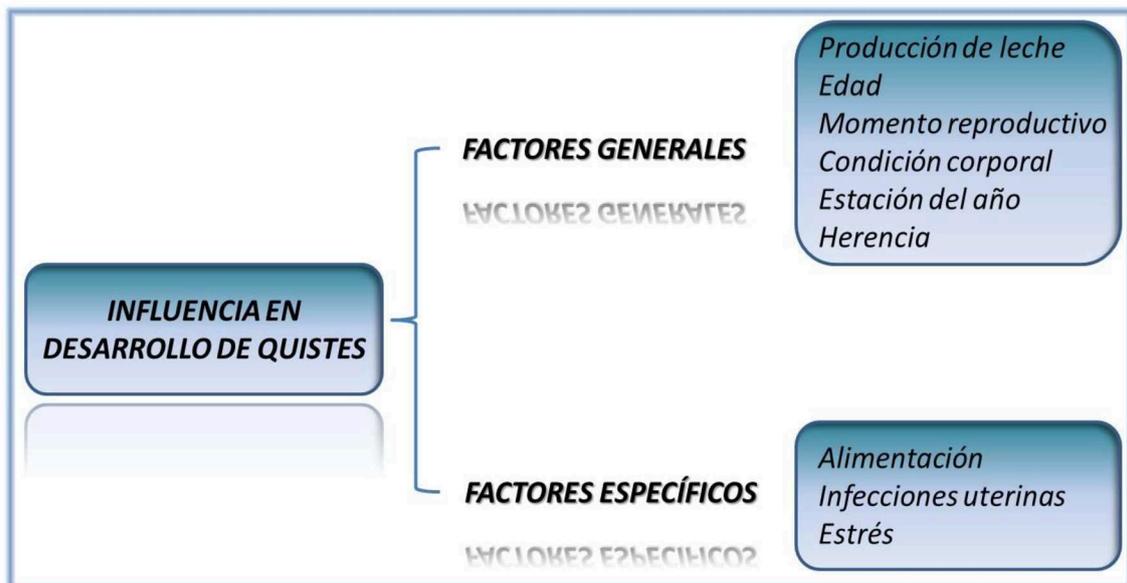


Figura 5: Esquema de los factores más relevantes que influyen en el desarrollo de la COD en bovinos.

Durante el posparto, las hembras bovinas son altamente susceptibles a diversos procesos patológicos, incluyendo retención de placenta, metritis, hipocalcemia y anestro posparto (Nelson y col., 2010). Las infecciones uterinas posparto causadas por bacterias Gram (-) son capaces de sintetizar y liberar endotoxinas que estimulan la liberación de cortisol adrenal de forma que suprimen el pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH) y en consecuencia conducen a la formación de quistes foliculares ováricos (Bosu y Peter 1987). El mecanismo a través del cual ocurre es desconocido (Peter y col., 1991; Suzuki y col., 2001), sin embargo, las endotoxinas junto con sus mediadores, las interleuquinas, son responsables de la mayoría de los efectos patógenos. Las interleuquinas son capaces de inducir la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) del hipotálamo y consecuentemente la adrenocorticotropina (ACTH) de la hipófisis, lo cual estimula a la glándula adrenal a

incrementar la producción de corticoesteroides, e inhibir la formación de receptores de LH en células de la granulosa. Todas las acciones mencionadas resultan en un aumento del cortisol, y la supresión del pico preovulatorio de LH. De esta manera, se produce un disturbio de las interacciones hormonales que controlan el funcionamiento normal del ovario (Battaglia y col., 2000; Williams y col., 2001; Peter, 2004).

Cabe destacar que cualquier factor considerado provocador de estrés interfiere en los mecanismos que modulan al eje hipotálamo-hipofisario-gonadal modificando la secreción de gonadotropinas y modificando el cronograma de eventos de la fase folicular del ciclo estral (Salveti y col., 2007, Amweg y col., 2013).

1.3.3 Etiología y Patogenia

La patogenia de la COD implica un proceso complejo, con un trastorno plurifuncional de la ovulación, que tiene como base la predisposición hereditaria sumada a causas ambientales (estrés, manejo nutricional, enfermedades infecciosas y manejo en general) (Lopez-Diaz y Bosu, 1992; Woolums y Peter, 1994b; Garverick, 1997; Peter, 1997; Zulu y Penny, 1998; Peter, 2000; Ribadu y col., 2000). La causa primaria de la enfermedad no ha sido establecida claramente aún (Silvia y col., 2005; Vanholder y col., 2006). Uno de los motivos que dificulta su determinación es que en el momento de realizar el diagnóstico clínico no se conocen los procesos que condujeron a su formación y futura regresión de los quistes.

La hipótesis más aceptada propone que un desequilibrio en el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal se encontraría involucrado en el desarrollo de quistes debido a su participación en la regulación de diversas funciones reproductivas (López-Diaz y Bosu, 1992; Garverick, 1997; Zulu y Penny, 1998; Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000; Peter, 2004).

Existe una falla en la ovulación luego de que uno o varios folículos de una onda de crecimiento folicular se desarrollan y superan el tamaño ovulatorio. Una falla en dicho proceso resulta en una inadecuada liberación de GnRH desde el hipotálamo y consecuentemente, una inapropiada liberación de LH desde la hipófisis y/o en un momento inadecuado, conduciendo a una falla en la ovulación. En general se considera que las hembras bovinas con quistes foliculares poseen una secreción basal elevada de LH y de 17β -estradiol durante el crecimiento folicular, seguida de una

supresión del pico preovulatorio de LH en el momento de la maduración (Hamilton y col., 1995).

En condiciones normales, la retroalimentación positiva de los estrógenos estimula al hipotálamo a secretar GnRH. Sin embargo, en vacas con quistes se detectaron menores niveles de GnRH en el hipotálamo (Cook y col., 1991) sugiriendo que las alteraciones en la esteroidogénesis pueden asociarse a un desequilibrio en el sistema de retroalimentación entre las gónadas y el hipotálamo (Isobe, 2007).

Por otro lado, la retroalimentación positiva de los estrógenos que controla la liberación de la LH es un factor clave asociado al desarrollo de la condición del ovario quístico. En vacas con ciclos estrales normales, los estrógenos inducen el incremento de la LH mediante la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH y el aumento de receptores de gonadotropinas hipofisarias. En vacas con quistes, en cambio, la liberación pulsátil de la LH se retrasó o no sucedió, luego de tratamientos con estrógenos. Por lo que la falta de sensibilidad a los estrógenos puede ser considerada una consecuencia más que una causa de COD. La misma podría deberse a cambios en la expresión de receptores hormonales esteroides (de estrógenos, progesterona y andrógenos) y proteicos (LHR y FSHR) a nivel hipotálamo-hipofisario (Odore y col., 1999). La remoción del ovario quístico por ovariectomía, permite restaurar el mecanismo de retroalimentación y la capacidad del 17β -estradiol de generar la nueva oleada gonadotrópica (De Silva y Reeves, 1988).

Hatler y col. (2003) observaron que al momento del diagnóstico de COD en bovinos, la mayoría de los casos estaban acompañados de concentraciones suprabasales de progesterona. Precisamente, el efecto de niveles elevados de dicha hormona, aunque subluteales, sería inhibir la ovulación bloqueando el pico de LH y aumentando su frecuencia pulsátil basal. Sin embargo, esta hipersecreción basal de LH no se asociaría a las causas de formación de los quistes sino a su persistencia a lo largo del tiempo.

A nivel celular puede ocurrir una producción aberrante de factores de crecimiento por parte de las células de la granulosa (Ortega y col., 2008; Rey y col., 2010) con alteraciones en la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular (Salveti y col., 2004; Ortega y col., 2007a). Se ha descrito que las variaciones en la expresión del receptor de LH podrían ser un factor involucrado en la anovulación del folículo

dominante (Vanholder y col., 2006). Asimismo, se ha descrito que la expresión proteica y génica de receptores de FSH y LH en células de la granulosa de quistes se redujo en comparación con los folículos normales (Kawate y col. 1990; Marelli y col 2014).

Por otro lado, los receptores de estrógenos y de progesterona podrían estar involucrados en los mecanismos que llevan a la anovulación. Cambios en la expresión de los subtipos e isoformas y su relación, en las células que componen el folículo de los animales con COD, podrían causar variaciones en la acción o efectos de las hormonas sobre ellas. Un balance inapropiado de los receptores de estrógeno α y β por ejemplo, dadas las diferencias en afinidad por el 17β -estradiol de cada uno de ellos, o la capacidad de formar heterodímeros y actuar de manera diferencial a nivel nuclear, puede causar modificaciones en el desarrollo folicular normal (Odore y col., 1999; Salvetti y col., 2007; Alfaro y col., 2011).

Además de los cambios en la expresión y contenido de los receptores implicados en la esteroidogénesis, los mecanismos que regulan el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis de las células de la granulosa y la teca, poseen gran importancia clínica. Una falla en la vía de señalización de alguno de los procesos citados puede estar implicada en la formación de los quistes ováricos (Peter y Dhanasekaran, 2003). Estudios recientes sugieren que los procesos apoptóticos pueden estar involucrados en la anovulación. La disminución en la apoptosis en células de la granulosa podrían contribuir a la formación y persistencia de folículos anovulatorios (Isobe y Yoshimura, 2007; Salvetti y col., 2010).

Los mecanismos de estrés mediante los cuales el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal pueden afectar la función ovárica es otra de las posibles causas de la formación de quistes (Amweg et al., 2011). Mediante cultivo de pared folicular in vitro se demostró recientemente que las células foliculares ováricas expresan receptores de melanocortinas, entre las que se encuentra la ACTH, hormona sintetizada en condiciones de estrés, que podría fundamentar un efecto directo del estrés sobre la funcionalidad ovárica (Amweg y col., 2011). Además, luego de la estimulación con ACTH, se evidenciaron cambios en la expresión de 11β HSD y secreción de cortisol en la pared de folículos terciarios grandes y quistes. Los quistes mostraron una alta expresión constitutiva de 11β HSD1, mientras que la ACTH indujo un incremento en la enzima en folículos terciarios y quistes foliculares. Por otro lado, la expresión 11β HSD2

en quistes foliculares se redujo. Esto demostraría que los quistes foliculares pueden estar expuestos a altas concentraciones de glucocorticoides activos locales e indicaría mecanismo regulatorio en la función ovárica siendo determinante el cortisol en la patogénesis de la COD (Amweg y col. 2013).

1.4 El sistema de factores de crecimiento análogos a insulina

1.4.1 Componentes del sistema IGF

Los IGFs son importantes reguladores intraováricos del crecimiento, desarrollo y selección folicular, atresia, diferenciación celular, esteroidogénesis, maduración del ovocito y expansión del cúmulo ovífero. Actúan solos o en sinergia con las gonadotropinas (Giudice, 1992; Spicer y Echterkamp, 1995; Monget y col., 1996; Adashi, 1998; Brogan y col., 2010).

El sistema IGF está compuesto por diferentes elementos (Figura 6):

Dos ligandos: IGF1 y 2, péptidos estructuralmente relacionados a la proinsulina. El IGF1 (PM 7,6 kDa) contiene 70 aminoácidos mientras que el IGF2 (PM 7,4 kDa) contiene 67 aminoácidos. Son codificados por cromosomas diferentes y presentan un 62% de homología en su secuencia de aminoácidos (Giudice, 1992; Cantero y col., 2007).

Además de participar en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular, el IGF1 ejerce acciones anabólicas en el metabolismo de carbohidratos y proteínas. Sin embargo, a pesar de la elevada concentración de IGF2 en circulación y en LF, el IGF1 sería el principal inductor de las respuestas. Se ha demostrado que el IGF2 predomina durante el desarrollo prenatal y después del nacimiento su función es gradualmente reemplazada por el IGF1 (Cantero y col., 2007).

El hígado es la principal fuente de IGF sistémico y la hormona de crecimiento (GH) es la principal reguladora de la expresión génica de IGF y secreción hepática (Giudice, 1992; Etherton y Bauman, 1998; Cantero y col., 2007). El IGF1 es producido además por otros tejidos, donde la producción es regulada por GH y otros moduladores (Figura 7). Asimismo, el IGF2 es sintetizado en varios tejidos, pero es mínimamente dependiente de GH (Giudice, 1992, Zhang y col., 2013).

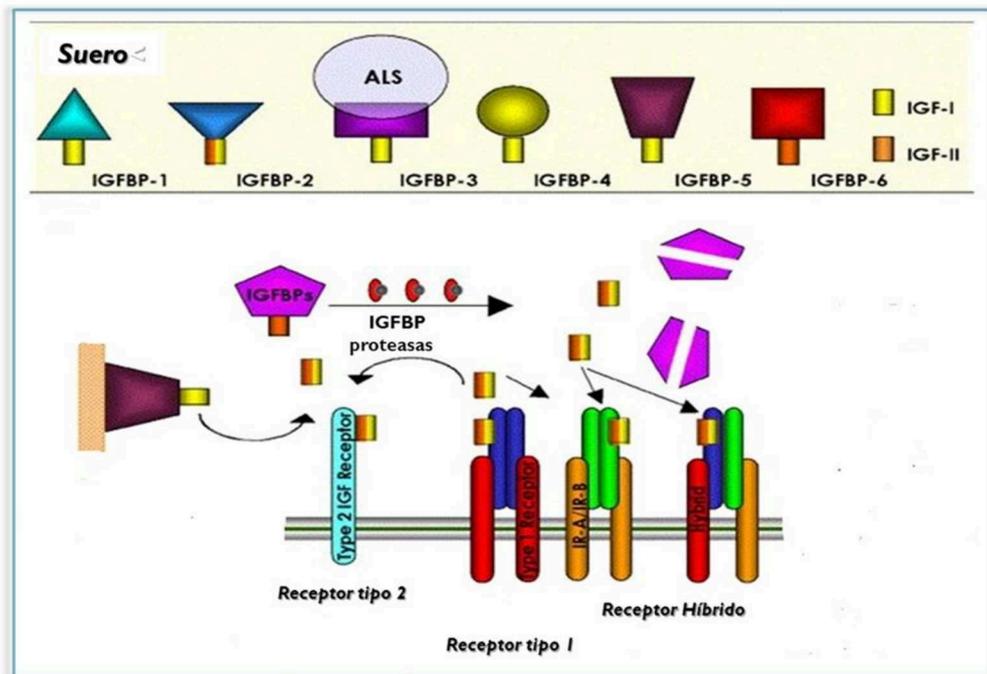


Figura 6: Componentes del sistema de factores de crecimiento análogos a insulina (IGF) (Cantero y col., 2007).

Los ligandos sintetizados son capaces de ejercer acción endocrina y paracrina (Giudice, 1992; Cantero y col., 2007). En bovinos, las concentraciones de IGF1 circulantes disminuyen y están asociadas con la disminución de la expresión del receptor de GH en el hígado durante el parto. El rol más importante de IGF es amplificar la esteroidogénesis actuando en sinergia con las gonadotropinas. El crecimiento folicular es dependiente de la secreción de gonadotropinas y la producción de 17β -estradiol e inhibina A aumentan, por lo que las concentraciones de FSH circulantes disminuyen. En bovinos, la principal fuente de IGF1 en LF es la circulación y existen evidencias que indican que la maduración folicular está comprometida cuando las vacas están en balance energético negativo y las concentraciones de IGF1 y/o insulina están reducidas, como ocurre en el posparto temprano (Wathes y col., 2003; Webb y col., 2004).

Dos receptores: El receptor tipo 1 (IGFR1) interviene en la mayoría de las acciones de ambos ligandos. Se une con alta afinidad a IGF1, en menor grado a IGF2 y significativamente menos a la insulina (Guidice, 1992; Jones y Clemmons, 1995; Monget y col., 2002). El receptor tipo 2 (IGFR2), liga con alta afinidad a IGF2 y moléculas con residuos de manosa-6-fosfato, y con baja afinidad a IGF1 (Guidice, 1992; Jones y Clemmons, 1995; Monget y col., 2002). El receptor se activa mediante la unión

al ligando. El IGF1 produce un cambio conformacional del receptor y lo activa (Kavran y col., 2014). Si bien la insulina y el IGF1 poseen receptores diferentes, altas concentraciones de insulina pueden reaccionar cruzados con el IGFR1, y cuando ambos receptores están presentes en la misma célula se pueden formar híbridos IGFR-IR, los cuales unen tanto IGF1 como insulina (Webb y col., 2004).

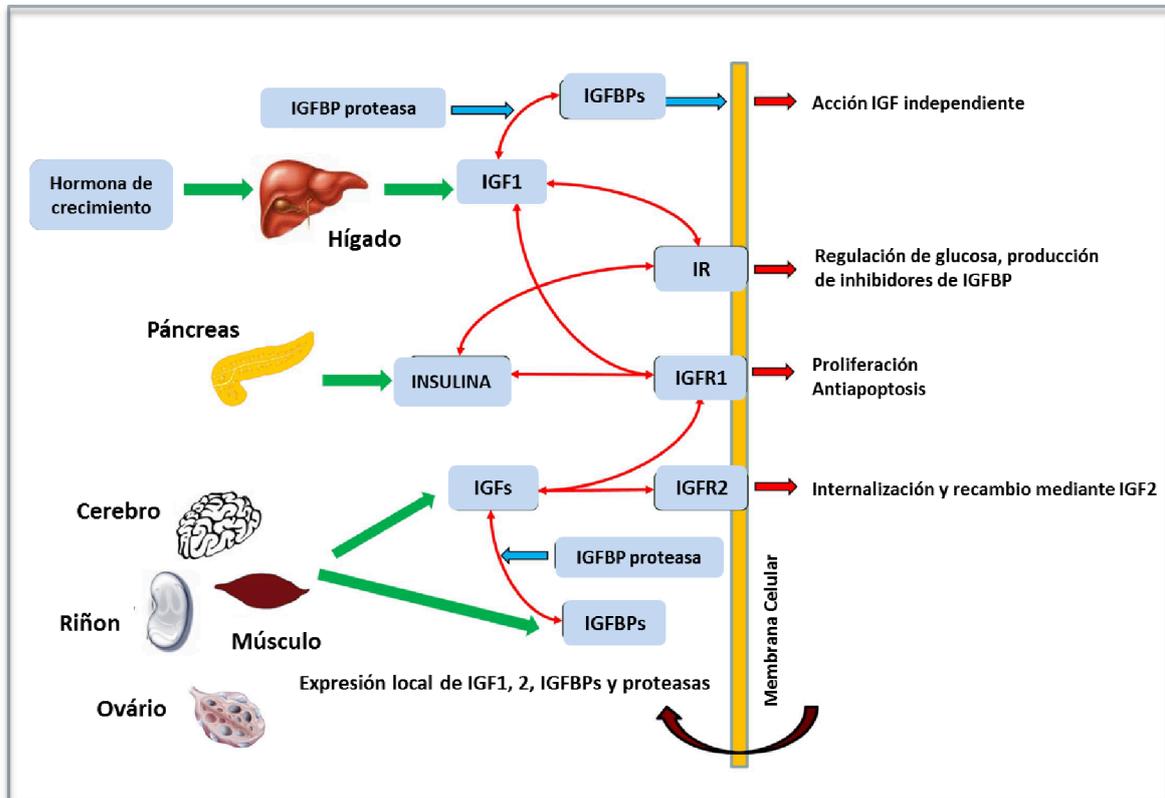


Figura 7: Diagrama esquemático del sistema IGF (adaptado de Zhang y col., 2013).

El IGFR1 es una glicoproteína tetrámerica comprendida por dos subunidades α y dos subunidades β unidas por enlaces disulfuro, y está estructural y funcionalmente relacionado al receptor de insulina. La subunidad α es extracelular, contiene el dominio de unión al ligando y posee un peso molecular (PM) de 130 KDa. La subunidad β tiene un dominio hidrofóbico que atraviesa la membrana, contiene un sitio de unión a ATP y actividad tirosina quinasa activada por el ligando. Presenta sitios para autofosforilación y un PM de 90 KDa. El dominio transmembrana tiene un rol crucial en el reclutamiento de mediadores intracelulares a través de dos residuos conservados de tirosina (Monget y col., 2002; Belfiore y col., 2009).

El IGFR2 es un receptor tipo manosa 6 fosfato. Es una glicoproteína de cadena simple, con el 90% de la estructura a nivel extracelular. El dominio extracelular

presenta una secuencia conservada repetida, un pequeño dominio citoplasmático hidrofílico e incluye sitios de potencial fosforilación de tirosina, treonina y residuos de serina. La principal función de este receptor sería mediar el recambio de enzimas lisosomales, además, ejercería un rol importante en la degradación de IGF2 luego de su internalización (Giudice, 1992; Monget y col., 2002).

Proteínas de unión: seis proteínas (IGFBP1 a 6) estructuralmente relacionadas, con elevadas y diferentes afinidades por los dos ligandos (Jones y Clemmons, 1995; Monget y col., 1996, Hwa y col., 1999). Participan en el transporte de los IGFs en la circulación, regulando la biodisponibilidad a sus receptores y modulando el crecimiento celular (Cantero y col., 2007). Prolongan la vida media de los ligandos, regulan los efectos endocrinos de los factores de crecimiento y pueden inhibir o favorecer la acción de los IGFs en las células blanco (Giudice, 1992; Rajaram y col., 1997; Monget y col., 2002).

Según Monget y col. (1996) se clasificaron en dos grandes grupos:

- *IGFBPs de bajo peso molecular*: IGFBP1, 2, 4, 5 y 6 se encuentran en suero y otros fluidos y tienen pesos moleculares entre 24 y 35 KDa aproximadamente. La IGFBP1 fue originalmente identificada como una proteína de la placenta, llamada proteína placentaria 12 (PP-12) y como α -globulina asociada a la preñez. Es la principal IGFBP del líquido amniótico, se presenta no glicosilada con un PM de 25 KDa y une con baja afinidad a IGF1. La IGFBP2 fue identificada como una IGFBP no glicosilada de 34KDa. Tanto IGFBP1 y 2 tienen un sitio de reconocimiento a la matriz extracelular. Otras proteínas de unión al ligando, la IGFBP4, 5 y 6, fueron aisladas del líquido folicular. La IGFBP4 participa activamente con una proteasa específica en la regulación de la foliculogénesis y presenta un PM de 24 KDa para la forma no glicosilada y de 29 KDa para la glicosilada. La IGFBP5 posee un PM de 31 KDa y se une con alta afinidad a componentes de la matriz extracelular. Por último, la IGFBP6 cuenta con un PM de 22,8 KDa (Rechler y Clemmons, 1998; Monget y col., 2002; Nicholas y col., 2002; Spicer, 2004).

- *IGFBPs de alto peso molecular*: La IGFBP3 es la más abundante en suero (Belfiore y col., 2009) y se encuentra presente en un gran complejo de 150KDa, compuesto por IGF1 o 2, y una subunidad ácido lábil de 85KDa (ALS). La IGFBP3 nativa se visualiza como una doble banda de 42-44KDa. Es la IGFBP más abundante en

circulación y líquido folicular, por el contrario, en tejido ovárico se presenta en forma escasa o nula. Dentro de las funciones que posee, en ovario facilita la presentación de IGF1 a su receptor manteniendo la concentración de IGF intrafolicular (Rechler y Clemmons 1998; Thomas y col., 2007).

La regulación hormonal en la síntesis de las IGFBPs es específica según la especie y el tipo de célula. En este sentido, la FSH regula la producción de IGFBP4 y 5 en células de la granulosa de ratones y cerdos pero no en bovinos. Por otro lado, la LH y el estradiol disminuyen la producción de IGFBP4 en células de la granulosa bovina mientras que no tienen efecto en células de la teca (Spicer y col., 2004). En folículos atrésicos se encuentran altos niveles de IGFBPs con bajos niveles de IGFs y baja actividad proteasa (Monget y col., 1993). Por el contrario, en los folículos dominantes, los IGFs se presentan en altos niveles al igual que los niveles de proteasas. Las concentraciones de IGFBP3 se mantienen intactas, mientras que las concentraciones de las IGFBP2, 4 y 5 son significativamente menores en folículos dominantes que en subordinados (Nicholas y col., 2002).

IGFBP proteasas: enzimas que degradan a las IGFBPs disminuyendo la afinidad de unión por los ligandos. En bovinos, la proteasa más relevante es la proteína plasmática A asociada a la preñez (PAPP-A). Además de ser sintetizada por la placenta, el ARNm para esta proteína ha sido detectado en células de la granulosa de folículos ováricos humanos (Conover y col., 2001) y de animales domésticos (Mazerbourg y col., 2001; Monget y col., 2003).

Esta proteasa cliva especialmente a IGFBP4 y se discute que degrade a IGFBP2 y 5 (Spicer, 2004). En bovinos y equinos, la PAPP-A, se caracteriza por ser una serina-metaloproteasa y miembro de la superfamilia de las metzincinas. Además, se conocen otras metaloproteasas, las calicreínas, que están presente en el LF y pueden degradar otras IGFBPs, incluyendo a IGFBP2, 3 y 5 (Mazerbourg y col., 2001; Conover, 2012).

La PAPP-A es una larga glicoproteína dimérica que puede encontrarse en dos formas, unidas covalentemente a la proteína básica mayor de eosinófilos (proMBP) formando complejos inactivos, o como un dímero proteolíticamente activo dissociado de la proMBP (Mazerbourg y col., 2001; Conover, 2012).

Los niveles de las enzimas proteolíticas aumentan en los folículos preovulatorios de mayor tamaño junto con la reducción de IGFBP2, 4 y 5, y el

incremento en los niveles de estradiol y androstenediona. Así, la disponibilidad de IGF aumenta por la acción de las proteasas específicas de IGFBPs, y en consecuencia aumenta la respuesta a FSH y síntesis de estrógenos del futuro folículo dominante (Rivera y Fortune, 2003a).

1.4.2 Control de la biodisponibilidad de IGFs libres en el ovario

La biodisponibilidad de los IGFs está regulada por las IGFBPs. Los ligandos presentan mayor afinidad de unión a las IGFBPs (1 a 6) que a sus receptores, lo que resulta en un secuestro de los IGFs por parte de las proteínas ligadoras disminuyendo así la posibilidad unirse al receptor y ejercer su acción. Proteasas específicas clivan a las IGFBPs generando fragmentos N-terminal que reducen la afinidad por los ligandos y en consecuencia se incrementa la biodisponibilidad del IGF libre para unirse al receptor específico (Rechler y Clemmons 1998; Brogan y col., 2010; Christians y col., 2013).

La afinidad de las IGFBPs por los ligandos está regulada por un número de modificaciones postraduccionales, incluyendo fosforilación, glicosilación y clivaje proteolítico (Nicholas y col., 2002).

Las respuestas biológicas de IGF1 y 2 en el ovario, bajo una estimulación normal de FSH pueden estar reguladas por las IGFBPs. Los cambios en las concentraciones de las IGFBPs dependen de cambios en la síntesis local, la regulación hormonal o modificaciones postraduccionales debidas a degradación proteolítica (Spicer y col., 2004). Los esteroides podrían regular los niveles de IGFBP4 y 5 a través de la inhibición de su producción, inducción de la actividad proteolítica o disminución de la producción de inhibidores de estas proteasas tales como las TIMP (Spicer y col., 2004).

La PAPP-A cliva a la IGFBP4 produciendo fragmentos proteolíticos con menor capacidad de unión al ligando, por lo que se incrementa el IGF libre que consecuentemente actúa con el IGFR. Posiblemente ambas interacciones proteasa específicas son moduladas por glucosaminoglicanos en la superficie celular. Esta actividad proteolítica de PAPP-A depende de la presencia de IGF y es una característica de los folículos dominantes. La disminución de IGFBP4 y 5 inducidos por esas proteasas causan niveles incrementados de IGFs libres para cumplir acciones a nivel de la foliculogénesis, preparando al folículo y el ovocito para una ovulación y fertilización

satisfactoria (Figura 8). Además, se postula que existen otras proteasas o inhibidores de proteasas que estarían involucrados en la degradación de las IGFBPs (Spicer, 2004).

Los mecanismos por los cuales la PAPP-A cliva a IGFBP4 y 5 difieren. Por un lado, el IGF (1 ó 2) es requerido para el clivaje de la IGFBP4 (Figura 9), de ese modo, la IGFBP4 se une a IGF con alta afinidad y previene su interacción con los receptores de la superficie celular. Sólo cuando la IGFBP4 está unida al IGF, se convierte en sustrato para PAPP-A (Conover, 2012). En contraste, para la proteólisis de IGFBP5 por la PAPP-A, no se requiere de IGF. Además, los residuos básicos en la región del sitio de clivaje son importantes para escindir a IGFBP4 pero no a IGFBP5 (Aad y col., 2006; Gaidamauskas y col., 2013).

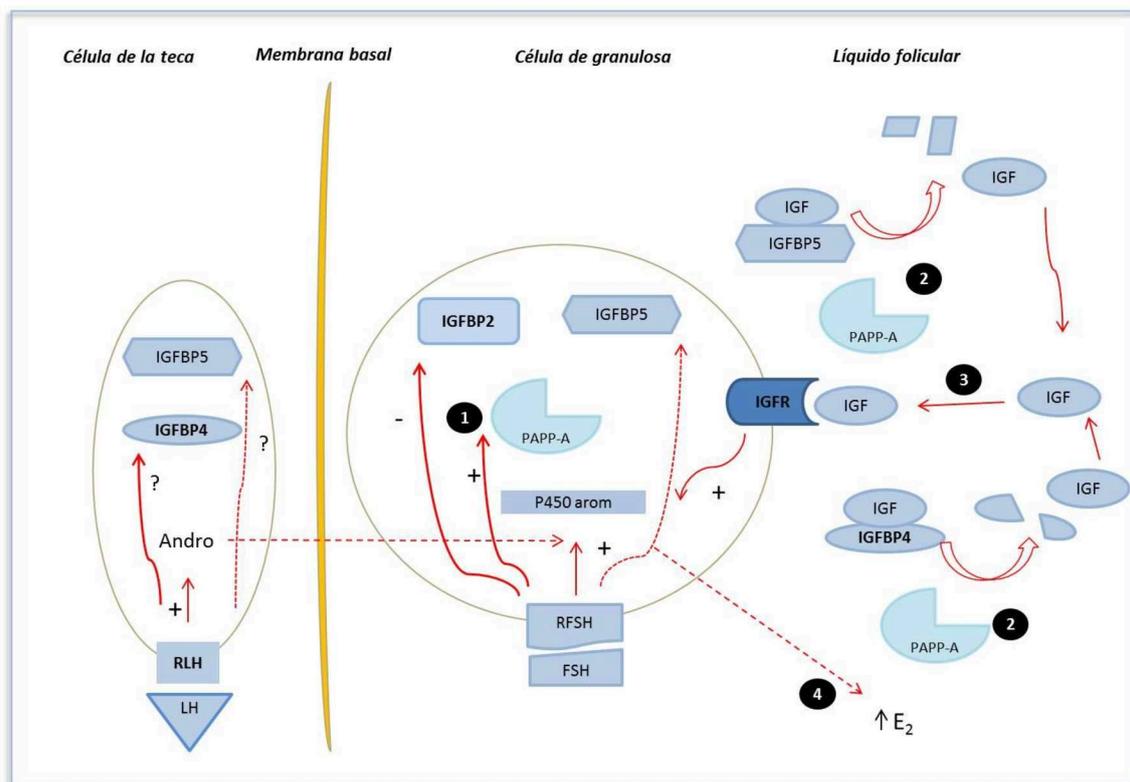


Figura 8: Mecanismos de acción del sistema IGF en folículos ováricos. En células de la granulosa del futuro folículo dominante, FSH estimula la expresión de PAPP-A (1). Una disminución inicial en los niveles de las IGFBPs de bajo PM debido principalmente a la proteólisis de IGFBP4 y 5 por PAPP-A (2), resulta en un incremento de la biodisponibilidad de IGF libre en LF (3). El IGF libre incrementado en sinergia con FSH promueve la gran producción de Estradiol por el folículo seleccionado (4). El aumento de 17 β -estradiol circulante disminuye las concentraciones de FSH a niveles demasiado bajos como para apoyar un crecimiento de otros folículos subordinados y, por lo tanto se complete el proceso de selección folicular (Adaptado de Rivera y Fortune 2003b).

En LF de ovarios bovinos se han detectado las IGFBP 2 a 5 (Spicer y Echternkamp, 1995; Funston y col., 1996) y bajas cantidades de IGFBP1 y 6 (Nicholas y

col., 2002). Se ha determinado que los niveles de expresión dependen del estado funcional del folículo. Así, durante el desarrollo de la dominancia folicular, las IGFBP2 a 5 disminuyen, mientras que durante la atresia aumentan (Austin y col., 2001). La IGFBP3 predomina en el líquido folicular, permaneciendo constante o tendiendo a aumentar durante el crecimiento del folículo. Algunos de los cambios en las concentraciones de IGFBPs en el LF se deberían a cambios en la síntesis local de las mismas (Monget y col., 2002). La unión de las IGFBPs a la matriz extracelular o a la superficie celular depende de modificaciones en los aminoácidos en las estructuras primarias de las IGFBPs. Por ejemplo, IGFBP2 contiene una secuencia de reconocimiento de integrinas y permite la asociación de IGFBP2 con células de la granulosa y de la teca vía integrinas de membrana plasmática. La asociación de IGFBP4 con la membrana extracelular es probablemente con sitios de unión a heparina en la superficie (Armstrong y Webb 1997).

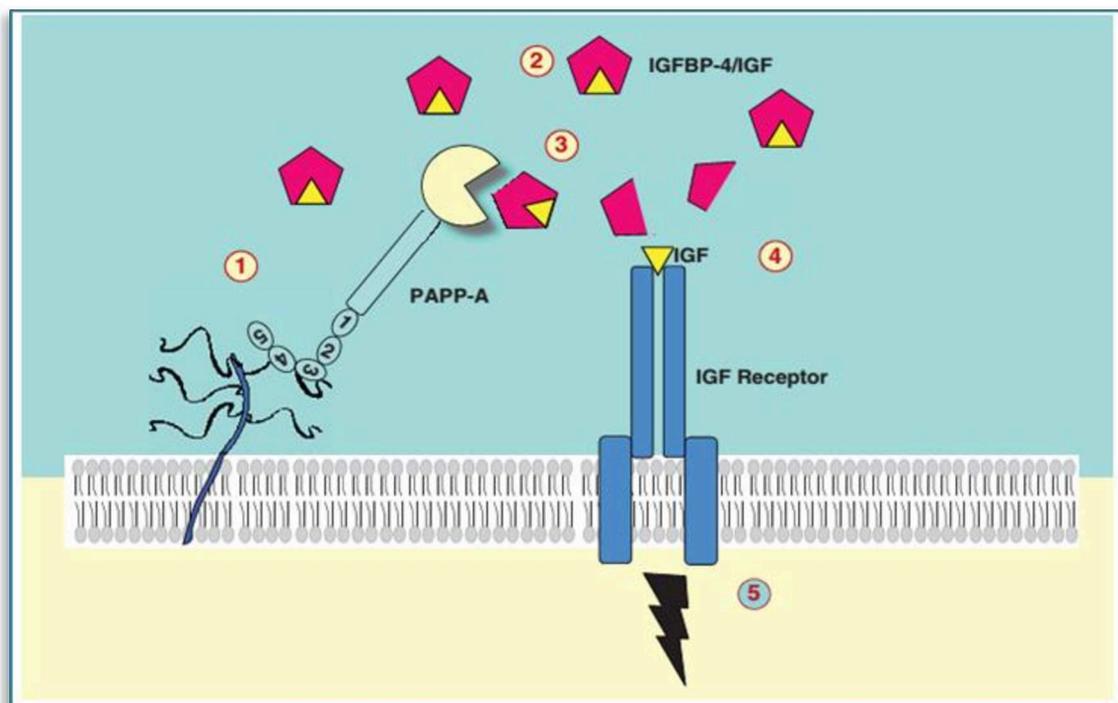


Figura 9: Control de la señalización de IGF por medio de PAPP-A. (1) la PAPP-A es una enzima secretada que está asociada con los proteoglicanos de la superficie celular. (2) La IGFBP4 unida a IGF con alta afinidad secuestrando al ligando para no interactuar con el receptor de la superficie celular. (3) La PAPP-A cliva a IGFBP4 (solo cuando está unida a IGF), reduciendo su afinidad por IGF. (4) El IGF es liberado en el espacio pericelular facilitando la unión con su receptor. (5) El IGF unido inicia la transducción de señal específica mediante la mitogénesis, efectos metabólicos, etc. (Conover, 2012).

In vivo, la actividad de PAPP-A en líquido folicular bovino está inducido por tratamientos con FSH y, durante la selección folicular, la mayor actividad de la PAPP-A ocurre de manera concomitante con el aumento de los estrógenos y el IGF1 libre en el mismo (Aad y col., 2006). La degradación intrafolicular de IGFBP4 por la PAPP-A es conservada en folículos preovulatorios de muchas especies estudiadas, por lo que se postula que esta enzima podría tener importantes consecuencias en la maduración folicular (Mazerbourg y col., 2001). A los dos días de la primera onda folicular, la actividad proteolítica es más alta en folículos dominantes en comparación con los subordinados de mayor tamaño, sugiriendo un rol de la proteasa específica de IGFBP4 en el establecimiento de la dominancia folicular. El clivaje proteolítico de IGFBP4 podría participar en el incremento de la biodisponibilidad de IGFs que luego estimulan la proliferación celular y la esteroidogénesis. Además, es posible que los fragmentos proteolíticos de IGFBP4 tengan un efecto independiente a IGF en las células foliculares. Finalmente, el incremento de la expresión de PAPP-A coincide con eventos proteolíticos asociados con la ovulación, por lo que participaría clivando sustratos críticos de este proceso (Mazerbourg y col., 2001).

Otro nivel de control de la biodisponibilidad y actividad de IGF es a través de la proMBP, la cual se une covalentemente a PAPP-A inhibiendo su actividad. La proMBP es un inhibidor fisiológico de la actividad proteolítica de PAPP-A, su presencia reduce el clivaje de IGFBP4 y disminuye la biodisponibilidad del ligando, una característica de folículos atrésicos y andrógenos dominantes (Kwiontkiewicz y Giudice, 2009).

1.3.3 Señalización de IGF en el ovario

La señalización por IGF1 iniciada por la activación del receptor, es un resultado de las interacciones entre moléculas del sistema IGF que median el crecimiento folicular y la inhibición de la apoptosis (Kwiontkiewicz y Giudice, 2009; Sánchez y col., 2014). Dependiendo del tipo de célula, el IGF1 activa al fosfatidil-inositol-3 quinasa (PI3K) y/o a la cascada de las MAPK (LeRoith y col., 1995; Poretsky y col., 1999).

El IGF1 se une a la subunidad extracelular de su receptor e induce un cambio conformacional que provoca la activación del receptor tirosina quinasa y la autofosforilación del residuo tirosina de la subunidad β . La fosforilación de la tirosina causa el reclutamiento de sustratos intracelulares que funcionan como proteínas de

acoplamiento (IRS-1, IRS-2) o adaptadoras (SHC, Grb2) para otras proteínas intracelulares que tienen dominios de reconocimiento específicos. A su vez, estos sustratos unen e incorporan otras proteínas intracelulares como la PI3K y las proteínas activadoras de GTPasas (GAP) de Ras que originan las dos vías de señalización más comunes (Belfiore y col., 2009) (Figura 10).

La señalización por la vía de PI3K activa a una proteína quinasa B (PKB ó AKT), un importante mediador de la proliferación y supervivencia celular (Kwintkiewicz y Giudice, 2009). La PI3K une a IRS a través de las subunidades regulatorias (p85), las que reclutan la subunidad catalítica de PI3K (p110) en la membrana plasmática, donde fosforila la fosfatidilinositol 4,5 difosfato (PIP2) a fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3). La PIP3 a su vez, recluta la proteína quinasa AKT y sigue la activación por la quinasa 1 dependiente del fosfoinositol (PKD). La activación de Akt es crucial para la regulación del metabolismo de la glucosa y para la regulación del tamaño celular, proliferación y supervivencia mediante la regulación de enzimas metabólicas. Además, Akt regula la traducción del ARNm a través de la vía mTOR, que posee un rol central en el crecimiento celular y metabolismo. Akt también regula directamente la transcripción génica mediante la inactivación de factores de transcripción de la familia FoxO. En el estado basal, las proteínas FoxO están localizadas en el núcleo donde activan la transcripción de moléculas relevantes del metabolismo, la promoción de la apoptosis y la inhibición del ciclo celular (Belfiore y col., 2009).

Por medio de la vía de las MAPK, una quinasa reguladora extracelular (ERK) puede regular la proliferación, diferenciación y la supervivencia celular. Esta segunda vía de señalización involucra a Ras, una proteína de unión a GTP que es activa cuando está unida a GTP y es inactiva por GDP. Ras es activada mediante mSOS, que se une a un adaptador, Grb2, el que acopla el complejo Ras/mSOS al receptor mediante la unión de las proteínas Shc y el IRS. Estas proteínas compiten por el mismo sitio de fosforilación del dominio transmembrana del receptor. Luego de la activación, Ras se recluta a la membrana y activa la quinasa serina/ treonina, Raf, la que fosforila la quinasa MEK con especificidad dual que a su vez fosforila y activa ERK1/2. Las ERK1/2 inactivas están localizadas principalmente en el citoplasma donde forman un heterodimero MEK/ERK. Luego de la activación, ERK1/2 se traslocan al núcleo donde fosforilan sustratos involucrados en la activación de la transcripción de importantes

genes. Además, ERK1/2 activadas fosforilan numerosos sustratos en el compartimento citoplasmático implicados en el crecimiento celular y supervivencia, tales como RSKs (Belfiore y col., 2009).

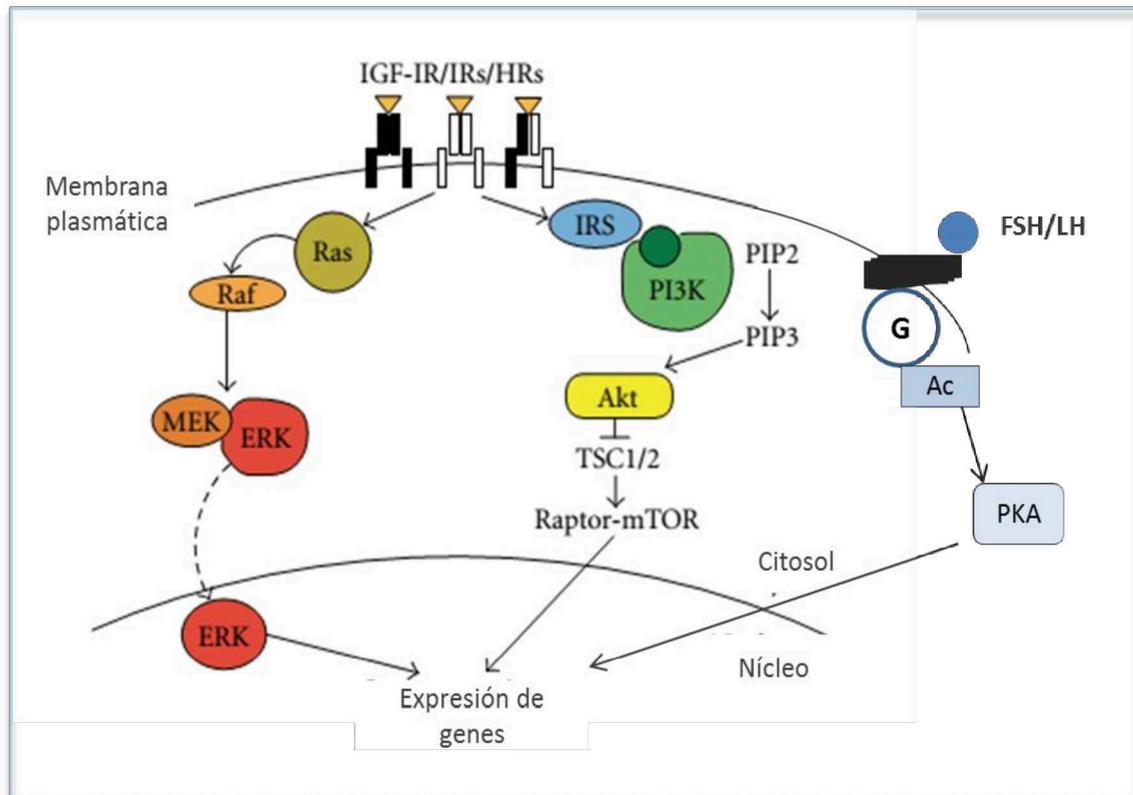


Figura 10: Representación gráfica de las vías de transducción de señales reguladas por las gonadotropinas y los IGFs. Se estimulan receptores nucleares involucrados en el desarrollo, función e integridad del folículo (adaptación de Belfiore y col., 2009 y Kwintkiewicz y Giudice, 2009).

Estudios recientes en ovinos y bovinos han sugerido que tanto AKT como ERK están reguladas durante la selección del folículo dominante (Brogan y col., 2010; Mani y col., 2010). La administración de inhibidores específicos para ERK o AKT en folículos ovinos durante la primer onda folicular del ciclo inhibió el crecimiento y la producción de estradiol (Ryan y col., 2008).

La FSH y el IGF1 actúan en forma sinérgica durante el crecimiento folicular. El IGF estimula a los receptores de FSH y LH. Las gonadotropinas estimulan la expresión de receptores de IGF1 y estimula la síntesis de este factor (Figura 10). Se postula entonces que el receptor de las gonadotropinas activa a la adenilato ciclasa que es directamente responsable de la generación de los segundos mensajeros cAMP y de la inducción de actividad de PKA. La FSH estimula la fosforilación del cAMP, éste estimula

la expresión de PKA que regula componentes involucrados en la esteroidogénesis (Kwiontkiewicz y Giudice, 2009).

1.3.4 Sistema IGF y foliculogénesis

La regulación de la foliculogénesis es un proceso complejo en el cual el IGF1 y 2 son relevantes por la interrelación entre estos y la FSH, esteroides, otros factores de crecimiento y hormonas que controlan el desarrollo folicular (Souza y col., 2007). Los folículos ováricos producen gran cantidad de factores de crecimiento que actúan localmente. Estos pueden actuar de manera autocrina o paracrina para estimular o atenuar la respuesta a las gonadotropinas. Los IGFs actúan en el ovario como un mecanismo de amplificación local para la acción de las gonadotropinas, lo que facilita el desarrollo folicular, mientras que las IGFBPs parecen inhibir este proceso y llevar a la atresia (Souza y col., 2007). El crecimiento folicular y la dominancia están controlados por una serie de eventos hormonales que llevan a cambios en la expresión de varias proteínas reguladoras en las células de la teca y de la granulosa incluyendo a las IGFBPs (Ginther y col., 2002, Monget y col., 2002).

En bovinos, el IGF1 aumenta la liberación de la LH estimulado por la GnRH, sin modificar el número de receptores para dicha hormona e interactúa con el estradiol para incrementar la respuesta a este factor liberador hipotalámico (Souza y col., 2007). La insulina y el IGF1 son factores de gran importancia que, en el bovino, relacionan el crecimiento folicular y la esteroidogénesis con el estado metabólico del animal. El aumento en la síntesis de IGF1 estimula la actividad aromatasa e incrementa el número de receptores de LH, además de mediar las acciones de la hormona de crecimiento sobre la función folicular. La amplificación de la respuesta a la FSH culmina, mediante los factores de regulación autocrina (IGF1 entre otros) al final de la selección folicular, con la expresión y síntesis de receptores de LH en las células de la granulosa. Además, la LH estimula la actividad de la aromatasa, y mantiene la dominancia hasta el momento de la ovulación (Souza y col., 2007).

Los IGF1 y 2 no varían durante el desarrollo folicular y atresia a diferencia de los niveles de IGFBP2, 4 y 5 que disminuyen drásticamente durante el crecimiento folicular hasta desarrollarse el folículo dominante y aumentan en la atresia de bovinos, cerdos, ovinos, humanos y caballos (Ginther y col., 2002; Monget y col., 2002; Spicer, 2004).

Estas modificaciones son responsables del incremento y descenso en la bioutilización de IGF durante estos 2 momentos, respectivamente (Figura 11). Las IGFBP2 y 4 son factores reguladores claves en la utilización del IGF en folículos bovinos (Nicholas y col., 2002, Davidson y col., 2002, Spicer, 2004).

Los IGFBP2 y 4 disminuyen a medida que los folículos llegan a ser preovulatorios. Dichos cambios se pueden deber a cambios en la expresión del ARNm ya que la expresión génica de estas IGFBPs disminuye durante el crecimiento folicular y aumentan en la atresia. La FSH inhibe la expresión del ARNm de IGFBP2 en células de la granulosa bovina, sugiriendo que la disminución de estos niveles de expresión génica en folículos preovulatorios son dependientes de FSH (Spicer, 2004). La disminución en la producción de IGFBPs podría deberse además, a una alta actividad biológica de IGF producida localmente o a un aumento de la respuesta a las gonadotropinas del folículo (Armstrong y Webb, 1997).

Spicer y Chamberlain (2002) observaron que el 17 β -estradiol inhibe directamente la producción de IGFBP4 en células de la granulosa bovina cultivadas in vitro, pero no determinan si esta disminución fue debida a cambios en la proteólisis. El IGF1, la FSH y/o el 17 β -estradiol inducen la proteólisis en células de la granulosa humana in vitro. Otras hormonas, incluyendo citoquinas y glucocorticoides, modifican la actividad proteolítica (Spicer, 2004). In vivo, la actividad de la PAPP-A en LF está inducida por la FSH y durante la selección folicular esta actividad proteolítica aumenta con el incremento de 17 β -estradiol y el IGF1 libre en el mismo (Aad y col., 2006).

En algunas especies la evidencia indica que la disminución de los niveles de IGFBP4 y 5 en folículos preovulatorios están dados por el incremento de la actividad proteasa, donde niveles más bajos de IGFBP2 no incrementan la proteólisis. En folículos terciarios bovinos existe una alta actividad proteasa en IGFBP4 y 5 con reducida actividad de unión de la IGFBP4 y un aumento de IGF libres.

Se postula que los IGFBPs junto a sus proteasas específicas y sus receptores, cumplen un rol fundamental como moduladores de la biodisponibilidad de los IGFs en el crecimiento folicular y en situaciones patológicas. Los cambios en la expresión de los IGFBPs y sus ligandos junto a cambios en la actividad de proteasas específicas y sus receptores, proveen un mecanismo para regular la biodisponibilidad de los IGF durante

la foliculogénesis. Una falla en esta regulación podría contribuir al desarrollo de la enfermedad quística ovárica en bovinos.

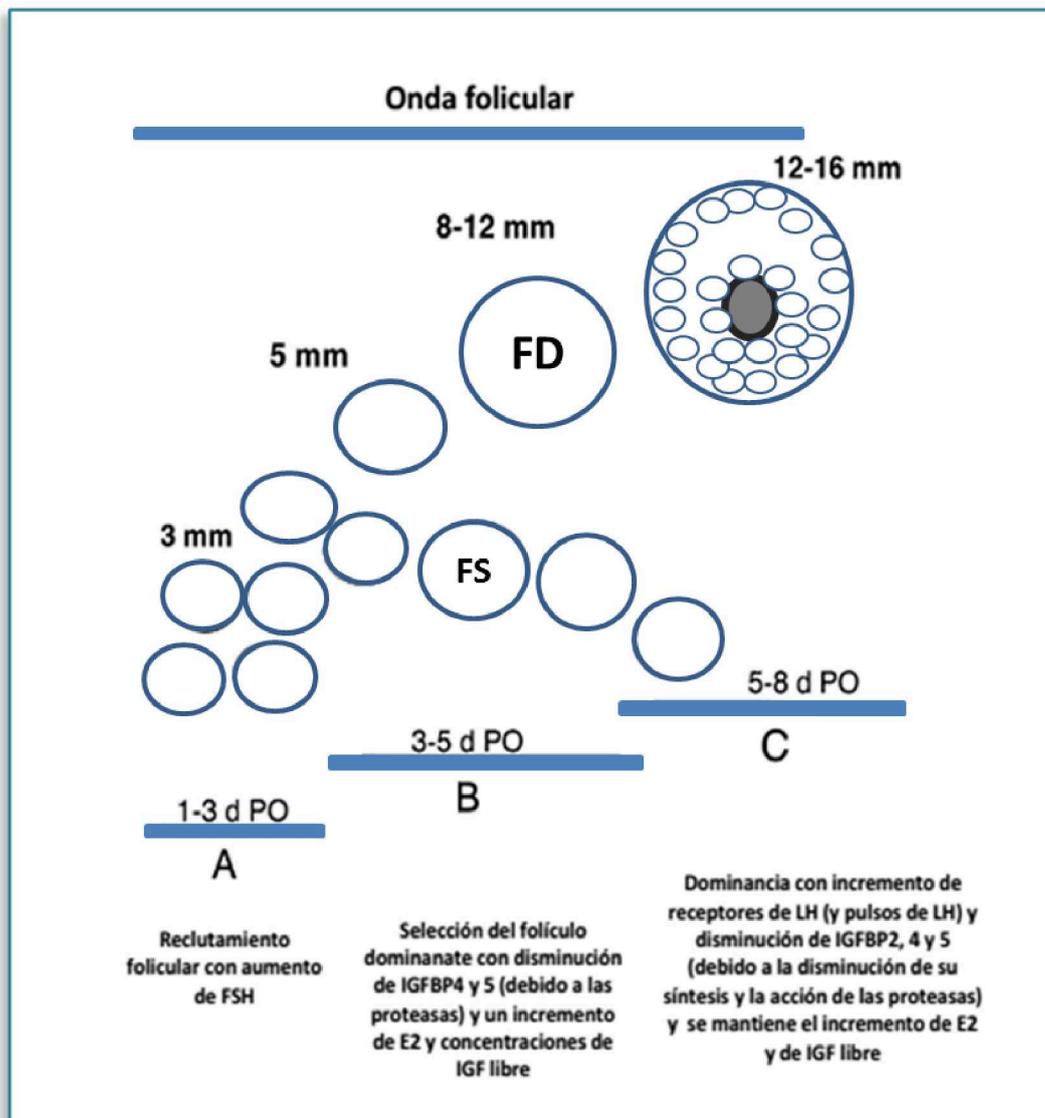


Figura 11: participación de diferentes componentes del sistema IGF durante el crecimiento folicular (Modificado de Spicer, 2004).

OBJETIVOS



2.1 Hipótesis de trabajo

Diversos trabajos postulan al sistema IGF como un regulador importante en la folículo-genesis, diferenciación celular, esteroidogénesis y otros procesos relevantes para el correcto funcionamiento del ovario. Una alteración en el sistema podría alterar alguno de los procesos mencionados y en consecuencia alterar e inhibir la ovulación con el posterior desarrollo de quistes.

2.2 Objetivo general de trabajo

En esta tesis nos propusimos como objetivo general estudiar la expresión y regulación de los componentes del sistema IGF en ovarios de bovinos con COD, evaluando su participación en los mecanismos involucrados en la formación de los quistes.

2.3 Objetivos específicos

1. Realizar una valoración cuantitativa de los patrones de expresión de ARNm y proteína de las diferentes componentes del sistema IGF en estructuras foliculares provenientes de animales con COD inducida con ACTH, COD espontánea y controles.
2. Analizar los niveles intrafoliculares de IGFBP y proteasa PAPP-A.
3. Comparar los datos obtenidos en el modelo experimental utilizado para el estudio de los miembros de familia IGF, con los resultados provenientes de animales con COD espontánea.
4. Desarrollar un sistema in vitro que permita estudiar efectos de estímulos hormonales sobre las diferentes poblaciones celulares foliculares.

MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 Procedimientos llevados a cabo con animales

Todos los procedimientos efectuados con animales se realizaron de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (*Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching*. Tercera Edición. *Federation of Animal Science Societies*, 2010) y fueron aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral bajo el número 32/2008.

3.1.1 Modelo experimental

Se han descrito diferentes protocolos y tratamientos aplicados en el diestro temprano o en el proestro para lograr la inducción de quistes (Carrie're y col., 1995; Hamilton y col., 1995; Nadaraja y Hansel, 1976; Dobson y col., 2000; Ortega y col., 2007b). Para nuestro trabajo se seleccionó la administración de ACTH debido al alto porcentaje de generación de quistes en animales tratados. La ACTH causa la supresión de los niveles basales de LH (Ribadu y col., 2000) así como la frecuencia de los pulsos de la misma (Dobson y Smith, 1995). Su administración modifica la dinámica folicular de bovinos llevando al desarrollo de lo quistes.

3.1.1.2 Animales

Se utilizaron 10 vaquillonas de la raza Holando Argentino puros por cruce, de entre 18 y 24 meses de edad. Se examinaron por tacto rectal y ultrasonografía antes del comienzo de la experiencia para comprobar la normalidad en su tracto reproductor y la regularidad de sus ciclos estrales. Se alojaron en corrales descubiertos, la alimentación se basó en alimento balanceado comercial, heno de alfalfa y agua ad libitum.

Se realizó la sincronización de sus ciclos estrales mediante el protocolo Ovsynch (Pursley y col., 1995): los animales fueron inyectados con GnRH (Receptal®, Intervet, Argentina, 4 µg/mL, 5 mL/animal) el día 0, al día 7 se les administró una inyección de prostaglandina (Iliren®, Intervet, Argentina, 0.2 mg/mL, 5 mL/animal) y finalmente se administró otra inyección de GnRH el día 9. Se realizó la observación del comportamiento 24 h después del segundo tratamiento con GnRH para detectar el inicio del celo y luego cada 12 h. La ovulación fue confirmada mediante ultrasonografía (Sirois y Fortune, 1988) luego de la última inyección de GnRH y fue designada como día

1 del ciclo estral. Durante este período, los animales no recibieron ningún otro tratamiento. Para evitar los períodos críticos de estrés ambiental, las experiencias fueron realizadas en primavera.

Los animales fueron distribuidos en 2 grupos alojados en corrales separados.

Grupo inducido: luego de la sincronización de celo, 5 vaquillonas se trataron con 100 UI de corticotrofina (ACTH) (1mg/mL de Tetracosactido [corticotropina], Synacthen depot, laboratorio Novartis) cada 12 h por un periodo de 7 días seguidos, contabilizados a partir del día 15 del ciclo estral (Figura 12).

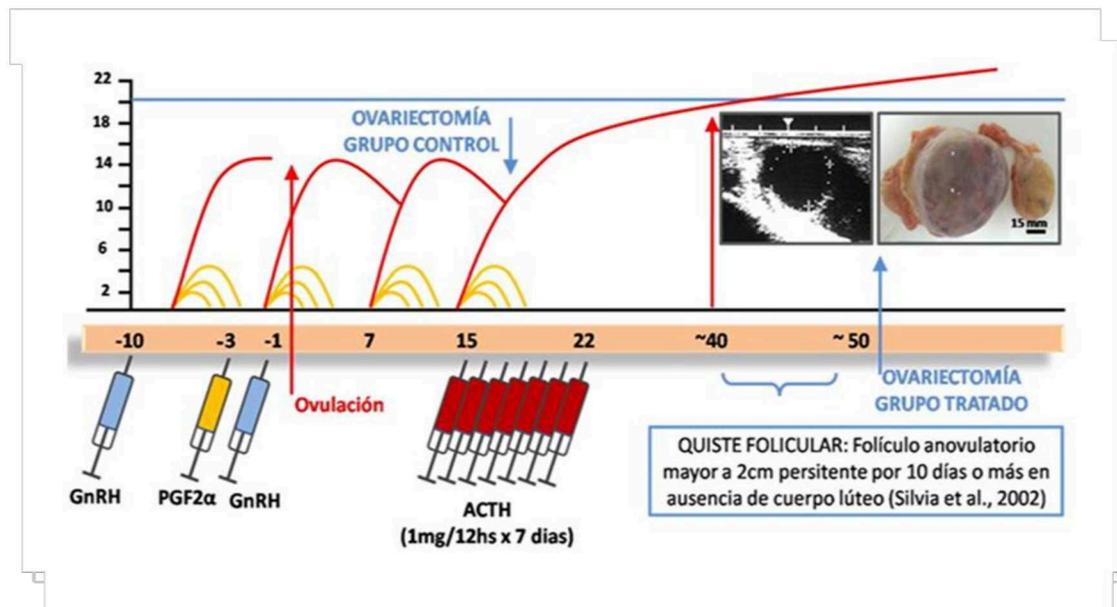


Figura 12: Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes ováricos foliculares mediante ACTH.

El comienzo del tratamiento (día 15 del ciclo estral normal) se realizó en el momento del ciclo en el que la onda de LH preovulatoria comienza a ser sensible a la inhibición por la hormona adrenocorticotropa exógena (Liptrap y McNally, 1976; Dobson y col, 2000; Ortega y col., 2007b, Amweg y col., 2013).

Grupo control: un grupo de 5 hembras se mantuvieron en condiciones ambientales normales, como grupo control, y recibieron 1 mL de agua destilada, cada 12 h durante 7 días. Estos animales, una vez sincronizados, fueron sometidos a ovariectomía durante el proestro.

3.1.2 Grupos de estudio

Grupo COD inducida con ACTH: se utilizaron muestras de 5 animales con la enfermedad inducida experimentalmente con ACTH como se describió previamente.

Grupo control experimental: se utilizaron muestras de 5 animales en condiciones ambientales normales como grupo control experimental descrito previamente.

Grupo COD espontánea: se utilizó un grupo de aproximadamente 18 animales con diagnóstico de COD de desarrollo espontáneo de establecimientos pecuarios de la zona. Se realizó una anamnesis completa, recabando datos sobre la alimentación, condiciones de rodeo, medidas de manejo, enfermedades y/o tratamientos previos. Se realizó la castración de 8 animales y a los que no pudieron castrarse se les realizó aspiración guiada por sonda.

Grupo proveniente de playa de faena: Se procedió a la toma de muestras de folículos terciarios de ovarios sin alteraciones macroscópicas visibles (control) y folículos con características macroscópicas compatibles con la descripción de quistes foliculares (Silvia y col., 2002). Los ovarios se obtuvieron de hembras Holando Argentino no preñadas y sin alteraciones visibles a nivel de útero, trompas uterinas y ovarios. Las muestras fueron trasladadas refrigerados al laboratorio para su procesamiento.

3.1.3 Ultrasonografía

A fin de lograr un seguimiento de los cambios ocurridos durante el ciclo estral y diagnosticar la enfermedad, los médicos veterinarios del grupo de trabajo efectuaron los monitoreos diarios mediante palpación rectal y ultrasonografía hasta el momento de la ovariectomía. Para ello se utilizó un equipo de ultrasonografía equipado con un transductor lineal transrectal de 5 MHz (Honda HS101V). Los parámetros normales para proestro consideraron un diámetro medio de los folículos ovulatorios de 15-18 mm, ausencia de cuerpo lúteo y presencia de tono uterino, con una duración media del ciclo estral de 19-21 días. Para los casos de COD se consideró un diámetro promedio de los folículos quísticos mayor a 20 mm, con una persistencia igual o superior a los 10 días con interrupción de los ciclos estrales normales y ausencia de tonicidad uterina, sin que se produzca la ovulación o la formación de un cuerpo lúteo

(Silvia y col., 2002; Bartolomé y col., 2005). En el caso del modelo experimental de COD, se consideró como primer día de formación del quiste, el día en que el folículo alcanzó 20 mm o más.

3.2 Obtención de las muestras

Una vez detectada la condición de COD en animales inducidos con ACTH o durante el proestro en los animales controles se procedió a la ovariectomía bilateral por el flanco. En los casos de animales con COD espontánea se realizó una ovariectomía bilateral transvaginal. En aquellos casos en los cuales no pudo realizarse la ovariectomía debido a que no se autorizó dicha intervención, se procedió a la obtención del LF de los quistes por aspiración guiada por ecografía.

3.2.1 Obtención de muestras del modelo experimental por ovariectomía bilateral mediante abordaje por el flanco.

La extracción de los ovarios se realizó mediante abordaje por el flanco izquierdo con el animal en pie (Figura 13). En primer lugar se realizó la sedación mediante la aplicación por vía subcutánea (SC) de 5 mL de una formulación que combina 5 mg/mL de Clorpromazina y 2 mg/mL de Difenhidramina (Stresin LA[®], Laboratorio Rio de Janeiro) y luego se realizó anestesia local infiltrativa mediante la técnica de Magda modificada, utilizando 160 mL de clorhidrato de lidocaína al 2% (Lidocaína 2%, Vetue[®]). Se procedió a realizar una incisión desde dorso-caudal hacia ventro-craneal de la piel del flanco y los planos musculares que se encuentran debajo de la misma, de una longitud suficiente para permitir el acceso a cavidad abdominal. Una vez localizados, ambos ovarios fueron extraídos ligando previamente por transfixión los vasos sanguíneos que lo irrigan, y procediendo luego a la sutura de los planos musculares y de la piel (Garnero y Perusia, 2002). Finalmente los animales fueron tratados con antibióticos (Penicilina-Estreptomicina 20.000 UI/kg/día, durante 5 días; Penicilina-estrepto[®], Laboratorio Río de Janeiro), coagulantes (Ciclonamina 6mg/kg + Vitamina K 0,02 mg/kg; Coagulante Chinfield[®], Laboratorio Chinfield), antiinflamatorios (Flunixin meglumina 2,2mg/kg/día, durante 3 días; Algimine 5%[®], Zoovet) y antiparasitarios externos aplicado en forma de aerosol para cubrir la herida y 4 cm alrededor de la misma (Fenitrotión 6,63 %, Curavet[®] plata aerosol, Zoovet).



Figura 13: Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje por flanco izquierdo (Adaptada de Stangaferro, 2013).

3.2.2 Obtención de muestras de animales con COD espontánea diagnosticada a campo por ovariectomía bilateral mediante abordaje transvaginal

Una vez detectada la COD, en vacas con indicación de rechazo, se obtuvieron los ovarios por ovariectomía bilateral a través de abordaje transvaginal con el animal en pie de acuerdo a lo descrito por Garnero y Perusia (2002) (Figura 14). En primer lugar se sedó al animal con 150 mg totales de clorhidrato de ketamina (Ketamina 10%, Alfazan[®]) y se efectuó anestesia epidural baja con 100 mg totales de clorhidrato de lidocaína (Lidocaína 2%, Vetue[®]). Luego se realizó la limpieza y desinfección del área perineal y de la cavidad vaginal con una solución de cloroxilenol 5%. Se realizó una incisión en el fondo de la vagina (parte dorsal o techo de la misma) utilizando un bisturí de hoja oculta, perforando ésta y el peritoneo con la ayuda de un tensor de vagina. Se procedió a acceder a la cavidad pélvica, localizar el útero y retraerlo junto con los ovarios, dentro de la vagina (Garnero y Perusia, 2002). Se procedió a la sección y extracción de ambos ovarios, ligando previamente por transfixión los vasos sanguíneos que lo irrigan. Para evitar rupturas de las estructuras foliculares, previo a la ovariectomía se realizó la extracción de LF mediante el sistema de aspiración folicular guiado por ecografía. Finalmente los animales fueron tratados con antibióticos, coagulantes, antiinflamatorios y antiparasitarios externos tal y como fuera descrito previamente en ovariectomía bilateral mediante abordaje por el flanco.



Figura 14: Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje transvaginal (Adaptada de Stangaferro, 2013).

3.2.3 Obtención de muestras de animales con COD espontánea diagnosticada a campo por aspiración folicular guiada por ecografía

Para la realización de la aspiración de LF se adaptó la técnica descrita por Seneda y col. (2003) que ha sido ampliamente utilizada para la obtención de muestras para estudios moleculares (Figura 15). Se utilizó un sistema de ultrasonido digital Chison 8300 vet equipado con un transductor microconvexo de 5,0 MHz montado en una sonda transvaginal para aspiración folicular (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil). La misma posee una guía para la colocación de una aguja calibre 20 G con bisel ecogénico que se conecta por medio de una tubuladura de teflón a tubos contenedores cónicos estériles de 50 mL. Una vez montado el dispositivo, fue introducido vía vaginal hasta contactar con el fondo de la misma y, paralelamente, el quiste folicular fue localizado por tacto rectal. Para la aspiración se empleó una bomba de vacío (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil). Una vez recolectada la muestra de LF, se colocó a temperatura de refrigeración (4-6°C) y fue trasladada al laboratorio para su procesamiento.



Figura 15: Técnica de aspiración folicular guiada por ecografía (Adaptada de Stangaferro, 2013).

3.3 Procesamiento de muestras

En el laboratorio, se tomaron muestras para los diferentes ensayos:

a) Muestras de **pared folicular** completa de quistes y de folículos terciarios de ovarios normales, obtenidos en frigorífico (Figura 16). Se incluyeron, folículos pequeños menores a 5 mm de diámetro; folículos medianos entre 6 y 10 mm; y folículos grandes mayores a 10 mm (Parrott y Skinner, 1998). Estas muestras fueron conservadas a -80°C hasta su procesamiento para extracción de proteínas destinadas a evaluaciones por western blot y extracción de ARN total para su posterior análisis por PCR en tiempo real.

b) Muestras de **células de la granulosa** de quistes y de folículos terciarios de ovarios normales, obtenidos en frigorífico. Se incluyeron, folículos pequeños menores a 5 mm de diámetro; folículos medianos entre 6 y 10 mm; y folículos grandes mayores a 10 mm (Parrott y Skinner, 1998). Para ello se obtuvo el LF rico en células de la granulosa con jeringa de 1 mL y aguja 25 G y se conservó a -80°C hasta su posterior extracción de ARN total para PCR de punto final y PCR en tiempo real.

c) Muestras de la **teca** de folículos terciarios provenientes de ovarios normales (mismas categorías detalladas previamente) y de quistes a los que previamente se les extrajo el LF rico en células de la granulosa. Estas muestras se lavaron con agua DEPC para eliminar posibles restos de células de la granulosa y se conservaron a -80°C hasta la realización de la extracción de ARN total destinadas a PCR de punto final y PCR en tiempo real.

d) Muestras de células de la **granulosa** de folículos preovulatorios de ovarios sanos provenientes de frigorífico, destinadas a cultivos celulares descriptos más adelante.

e) Muestras de **ovarios** provenientes de animales con COD diagnosticada a campo, obtenidas por ovariectomía, destinadas a la técnica de inmunohistoquímica y de hibridación in situ. Para ello se fijaron en formaldehído tamponado al 4% y se procesaron siguiendo protocolos de rutina para su inclusión en parafina (Ortega et al., 2009).

f) Muestras de **ovarios** provenientes de animales con COD inducida mediante ACTH y controles en proestro obtenidas por ovariectomía fijadas e incluidas en parafina como se describió previamente.

g) Muestras de **líquido folicular** obtenidas por aspiración folicular de folículos controles y quistes espontáneos provenientes de animales de establecimientos pecuarios. Las muestras se centrifugan a 2000g y el LF sobrenadante es recuperado luego de la separación de las células de la granulosa contenidas en el pellets y que fueron utilizadas para la extracción de ARN total. Se conservó a -20°C y fue destinado a mediciones hormonales, western blot y ligand blot.

h) **Sangre**. Previamente a la ovariectomía o aspiración folicular, se obtuvieron muestras de sangre de los animales del grupo control y con COD inducida y COD espontánea. La sangre fue procesada para obtener suero, el cual fue conservado a -20°C y posteriormente enviado para determinaciones hormonales.

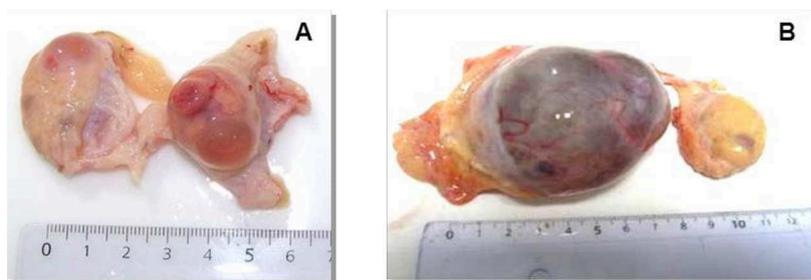


Figura 16: Ovarios controles (A) y ovarios con COD (B).

3.3.1 Procesamiento de las muestras destinadas a técnicas histológicas

Se efectuaron cortes seriados de $4\ \mu\text{m}$ de espesor con un micrótopo rotativo, se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropiltriethoxisilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y fueron secados en estufa a 37°C por 24 hs. Para una caracterización inicial y evidenciar la morfología general se utilizó la coloración de hematoxilina-eosina. Las diferentes categorías foliculares se clasificaron de acuerdo con la Nomenclatura Histológica (1994) en primarios, secundarios, terciarios y quistes. Para los cortes destinados para hibridación in situ se procedió del mismo modo pero en condiciones libres de RNAsas.

3.3.2 Procesamiento de las muestras destinadas a western blot

Se utilizaron fracciones de aproximadamente 60 mg de pared folicular de los distintos tipos de folículos (terciarios pequeños, medianos, grandes (controles) y quísticos). Se colocaron en una solución buffer de *RadioImmunoPrecipitation Assay*

(RIPA) con inhibidores de proteasas y fueron homogeneizadas con un homogeneizador de mano UltraTurrax® T25 Basic (IKA WERKE GMBH & CO. KG, Staufen, Alemania). Luego de centrifugar las muestras a 14.000 g durante 20 min a 4°C, se obtuvo el sobrenadante con el extracto de proteínas y se determinó la concentración de los mismos mediante método fluorimétrico (Qubit™, Invitrogen, CA, USA) según las indicaciones del fabricante. Además, se realizó western blot sobre muestras de LF proveniente de folículos terciarios pequeños, medianos y grandes de animales controles sanos y en el caso de animales con la enfermedad, se analizó el LF proveniente de quistes.

3.3.2.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La especificidad de los anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica y la cuantificación de la PAPP-A presente en LF fueron evaluados por western blot. Para ello, las muestras fueron resueltas por SDS-PAGE utilizando geles discontinuos de poli(acrilamida) (Laemmli, 1970). El tamaño del poro para el gel de resolución se correspondió con una concentración de acrilamida-bisacrilamida del 12% para IGFR1 y las IGFBPs, en cambio para PAPP-A la concentración correspondió a 8%. Se utilizaron homogeneizados de pared de folículos controles para el análisis de especificidad de anticuerpos contra las IGFBPs y el IGFR1, en condiciones no reductoras. Para el análisis de la PAPP-A, se prepararon muestras de LF obtenido de folículos controles y quistes diluyendo 1:2 con buffer de muestra en condiciones reductoras para SDS-PAGE y posteriormente se incubaron en baño termostático a 95°C por 5 min.

Según los valores obtenidos de la cuantificación por fluorimetría, se calcularon los volúmenes a sembrar adecuados para 40 µg de proteínas para IGFR1 y las IGFBPs. En el caso del LF se realizaron diluciones 1:20 para el análisis de PAPP-A sembrando un volumen constante de muestra. Se realizó la electroforesis en una cuba vertical con buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1 % de SDS, pH 8,3 durante 45 min a 25 mA para el gel de apilamiento, y se continuó a 50 mA hasta la visualización del frente de corrida en el borde inferior del gel de resolución. Se utilizó un marcador de PM de amplio espectro (Rainbow™, RPN800E, GE Healthcare)

Para la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de las proteínas separadas en el gel, se empleó la solución de transferencia tamponada Towbin

modificada, compuesta por Tris-Glicina y 20 % de metanol. Dicha transferencia se realizó en frío, a 100V durante 2 h 30 min para los geles al 12% y 2 h para los geles al 8%. Al término de este periodo se coloreó la membrana con el colorante Rojo Ponceau para ver la efectividad de la transferencia, se lavaron las membranas con agua destilada y luego con buffer Tris salino- Tween (TBS-T) hasta la desaparición del colorante.

3.3.3 Procesamiento de las muestras para RT-PCR

3.3.3.1 Extracción de ARN total

El ARN de las muestras de pared folicular como las de las células de teca y granulosa fue extraído usando el reactivo comercial Trizol LS (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

- Se homogeneizaron muestras de aproximadamente 50 mg en 1 mL de reactivo Trizol LS (Invitrogen) con un homogeneizador de mano UltraTurrax. Para el caso de células se utilizaron 750 µl del reactivo y se homogeneizaron por vórtex.
- Se incubó durante 5 min a 25°C.
- Se adicionó cloroformo para separar la fase acuosa de la orgánica y se centrifugó a 12000g durante 20 min a 4 °C.
- El sobrenadante fue transferido a un eppendorf estéril
- Posteriormente se precipitó el ARN con un volumen equivalente de isopropanol incubando durante toda la noche a -20°C y se separó por centrifugación a 12000g.
- El ARN obtenido se lavó con etanol 75% por 10 min a 4°C
- Se resuspendió con agua DEPC precalentada a 60°C
- Se cuantificó por espectrofotometría a 230, 260 y 280nm

3.3.3.2 Transcripción reversa

Con el fin de eliminar posibles contaminaciones del ARN con ADN genómico, se realizó un tratamiento con ADNasa (Invitrogen). La transcripción reversa se realizó mediante la adición de una mezcla de cebadores con secuencias al azar, dNTPs, buffer

para la enzima MMLV 5X, DTT (100mM), inhibidor de ribonucleasas ARNasaOut (40U/ μ l) y la enzima MMLV RT (200U) (Invitrogen). Se utilizó para ello una cantidad constante de ARN y fueron utilizadas las siguientes condiciones:

- ❖ 10 min a 25°C para el anillado
- ❖ 50 min a 37°C para la síntesis del ADNc
- ❖ 15 min a 70°C para la inactivación de la enzima

Todas las reacciones se llevaron a cabo para un volumen final de 20 μ l utilizando un termociclador estándar (TC-3000, Techne Inc., NJ, USA).

3.3.4 Determinaciones hormonales

En trabajos previos se evaluaron los perfiles hormonales en líquido folicular de las muestras obtenidas, identificando los quistes estrógeno-activos que permitieran su utilización para el estudio de la COD (Amweg et al., 2013).

Mediante kits comerciales de ELISA (Estradiol EIA, DSL-10-4300; Progesterona EIA, DSL-10-3900; Testosterona EIA, DSL-10-4000; Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA), de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se midieron las concentraciones de 17 β -estradiol, progesterona y testosterona, presentes en el LF y en el suero, obtenidos de los animales controles y con COD espontánea e inducida con ACTH. La sensibilidad del ensayo fue 7 pg/mL para 17 β -estradiol, 0.13 ng/mL para progesterona y 0.04 ng/mL para testosterona. El LF de los folículos destinado a cultivos celulares fue enviado a un laboratorio externo (LABIMED Análises clínicas, Santa María, Brasil) para medición de 17 β -estradiol y progesterona mediante quimioluminiscencia.

3.4 Análisis de los miembros del sistema IGF

3.4.1 Inmunohistoquímica

Para el análisis proteico de las IGFbps en muestras de ovarios de animales controles y de animales con la enfermedad, se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta utilizando anticuerpos específicos comerciales (tabla 1). Para analizar IGFBP2 y 3 se utilizaron secciones de ovarios de animales del grupo control, de animales con COD inducida y con COD espontánea obtenidas en playa de faena. Para el resto de los componentes del sistema IGF se analizaron secciones de ovarios de animales del grupo control y con COD espontánea detectada a campo.

Las inmunodetecciones se realizaron sobre cortes de 4 μm de espesor, siguiendo el protocolo descrito previamente por Ortega y col. (2009), según se detalla a continuación:

- Desparafinización en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 min cada uno.
- Hidratación en una serie de alcoholes de graduación decreciente, a partir de etanol absoluto (dos pasajes de 3 min), etanol 96° (dos pasajes de 3 min) y finalmente etanol 70° (un pasaje de 3 min).
 - Hidratación en PBS pH 7,2 durante 5 min
 - Tratamiento de recuperación antigénica. Se realizó en un horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 800 W). Como solución de recuperación se usó buffer citrato de sodio 0,01 M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en un coplin dentro de un recipiente con agua, y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación: 3 min a 100% de potencia, 12 min a 40% y 20 min dentro del microondas apagado.
 - Bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa. Se sumergieron las muestras durante 10 min en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno 30 volúmenes en metanol absoluto, agregando nuevamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno a los 10 min
 - Dos lavados en PBS durante 5 min.
 - Bloqueo de los sitios de unión no-específicos. Se incubaron las muestras 20 min a temperatura ambiente en cámara húmeda con una solución de suero normal de cabra al 5%.
 - Incubación con anticuerpo primario. Según la proteína a detectar (tabla 1), se incubaron las muestras con el anticuerpo de interés en la dilución adecuada durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Para los controles de especificidad se sustituyó el anticuerpo primario por suero normal de cabra.
 - Luego de la incubación con el anticuerpo primario, la cámara con las muestras se retiró de la heladera y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min.
 - Dos lavados consecutivos con PBS, 5 min cada uno
 - Incubación con el anticuerpo secundario policlonal biotinilado preabsorbido en la dilución apropiada, durante 30 min a temperatura ambiente.

- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 min cada uno.
- Incubación con conjugado extravidina-peroxidasa (Sigma- Aldrich) en una dilución 1:200, durante 30 min a temperatura ambiente.
- Tres lavados consecutivos con PBS, 5 min cada uno.
- Revelado de la reacción con 3,3'diaminobencidina (DAB, Dako).
- Lavados con agua destilada, 2 de 5 min cada uno. Luego se realizó la coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur®), deshidratación y montaje con bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur) y cubreobjetos apropiados.

Tabla 1: Condiciones de anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica.

Anticuerpo	clon	Proveedor comercial	Dilución
Primarios			
IGFBP1	Policlonal conejo	PAAH1. Novozymes GroPep Ltd., Australia	1:250
IGFBP2	Policlonal conejo	PAAI1. Novozymes GroPep Ltd., Australia	1:250
IGFBP3	Policlonal conejo	PAAJ1. Novozymes GroPep Ltd., Australia	1:250
IGFBP4	Policlonal conejo	PAAG1. Novozymes GroPep Ltd., Australia	1:100
IGFBP5	Policlonal conejo	PAAF1. Novozymes GroPep Ltd., Australia	1:75
IGFBP6	Policlonal conejo	PAAE1. Novozymes GroPep Ltd., Australia	1:200
IGFR1	Policlonal conejo	SC-712. Santa Cruz Biotechnology, Inc. Europa	1:100
Secundario			
IgG anti- rabbit biotinilado	Policlonal	AM-B1. LETH, Argentina	1:200

Para el anticuerpo anti- IGFBP6, se realizó una modificación en la técnica de rutina. La recuperación antigénica se realizó con solución EDTA 1mM pH 8 en iguales condiciones de microondas.

La inmunomarcación fue visualizada en el citoplasma para todas las proteínas analizadas y se cuantificó en las capas de células de la granulosa y de la teca interna sobre imágenes digitalizadas y utilizando el programa Image Pro-Plus 3.0, como se describe más adelante.

Se digitalizaron imágenes de folículos primarios, secundarios y terciarios para el grupo control. En el caso de ovarios obtenidos de animales con la enfermedad

espontánea e inducida, se analizaron folículos primarios, secundarios, terciarios y quistes para su posterior comparación.

3.4.2 Hibridación in situ

Para el análisis del ARNm se utilizaron sondas biotiniladas específicas para cada secuencia de nucleótidos que codifican a las IGFs (tabla 2). Se analizaron las diferentes estructuras foliculares en secciones de ovarios de animales controles y de animales con la enfermedad inducida y espontánea. Para analizar el ARNm de IGF2 y 3 se utilizaron secciones de ovarios de animales del grupo control, con COD inducida y con COD espontánea obtenidas en playa de faena. Para el resto de los componentes del sistema IGF se analizaron secciones de ovarios de animales del grupo control, con COD inducida y con COD espontánea detectada a campo.

Las detecciones se realizaron sobre cortes de 4 μm de espesor obtenidos en condiciones libre de RNAsas y siguiendo el protocolo descrito según se detalla a continuación:

- Los cortes previamente almacenados a -80°C , fueron colocados a temperatura ambiente por 10 min y luego 10 min a 60°C
- Desparafinización en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 min cada uno.
- Hidratación en una serie de alcoholes de graduación decreciente, a partir de etanol absoluto (dos pasajes de 3 min), etanol 96^o (dos pasajes de 3 min) y finalmente sucesivos lavados con agua destilada estéril.
- Hidratación en TBS estéril durante 10 min
- Bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa, sumergiendo las muestras durante 10 min en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno 30 volúmenes en metanol absoluto, agregando nuevamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno a los 10 min
- Dos lavados con TBS durante 10 min.
- Tratamiento de recuperación antigénica. Se realizó en un horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 800 W). Como solución de recuperación se usó buffer citrato de sodio 0,01 M pH 6,0. Los cortes fueron colocados

en un coplin dentro de un recipiente con agua, y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación: 3 min a 100% de potencia, 12 min al 40% y 20 min dentro del microondas apagado.

- Tres lavados en TBS durante 5 min.
- Bloqueo de los sitios de unión no-específicos incubando 15 min a temperatura ambiente en cámara húmeda con una solución de suero normal de cabra al 5% estéril.
- Hibridación específica con la sonda. Se aplicaron 25 µl de la solución de hibridación a cada muestra con la concentración de sonda determinada (tabla 2). Se colocó un parafilm sobre cada corte con la solución de hibridación para evitar posibles evaporaciones y se colocaron las muestras en cámara húmeda precalentada a la temperatura de hibridación detallada para cada sonda (tabla 2), durante toda la noche. El control de marcación inespecífica se incubó con la solución de hibridación sin sonda.
- Lavados consecutivos con TBS, uno de 10 min y tres de 2 min cada uno.
- Se realizaron lavados rigurosos en condiciones estériles. Un lavado de 5 min con solución salina de citrato (SSC) 2X 50% formamida y 0,05% Tween 20. Dos lavados de 10 min con SSC 2X. Un lavado de 10 min con SSC 1X previamente calentados a la temperatura recomendada. Luego, a temperatura ambiente, un lavado de 5 min con SSC 0,1X y un lavado de 5 min con agua destilada estéril.
- Dos lavados consecutivos con TBS estéril, 5 min cada uno.
- Incubación con conjugado extravidina-peroxidasa (Sigma-Aldrich) en una dilución 1:200, durante 40 min a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Tres lavados consecutivos con TBS estéril, 5 min cada uno.
- Revelado de la reacción con DAB (Dako).
- Lavados con agua destilada, 2 de 5 min cada uno. Luego se realizó la coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur®), deshidratación y montaje con bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur) y cubreobjetos apropiados.

La marcación se cuantificó en las capas de células de la granulosa y de la teca interna sobre imágenes digitalizadas y utilizando el programa Image Pro-Plus 3.0, como se describe más adelante.

Se digitalizaron imágenes de folículos primarios, secundarios y terciarios para el grupo control. En el caso de ovarios obtenidos de animales con la enfermedad espontánea e inducida, se analizaron folículos primarios, secundarios, terciarios y quistes para su posterior comparación.

Tabla 2: Secuencia de sondas utilizadas en hibridación in situ

Sonda	Secuencia 5'-3'	Temp .°C	Conc. (ng/ml)	Referencia
IGF1	TCACATCCTCCTCGCATCTCTTCTATCT GGCCCTGTGCTTGCTCG	42	200	Llewellyn y col., 2008
IGFBP2	GCGCCAGCCCCGAGCAGGTTGCAGA CAATGGCGAGGAGCACTCTG	45	200	Llewellyn y col., 2007
IGFBP3	GAGTCGGAAGAAGACCACAGCATGG GGAGCACAGAGAACCAGGCT	45	300	Llewellyn y col., 2007
IGFBP4	AAGACGGGAGTGAAGCTTCCGGGG GGCCTGGAGCCGAAGGGGGAG	45	200	Moser y col., 1992
IGFBP5	CTACTCGCCAAGATCTTCCGGCCCA AGCACACCCGCATCTCCGA	42	200	Moser y col., 1992

3.4.3 Western blot

Para la inmunodetección de las IGFBPs, el IGF1 y la PAPP-A se realizó el siguiente protocolo:

- Bloquear los sitios de unión inespecíficos con TBS-Tween 20 (TBST) BSA 5 % 2hs 30 min para IGFBPs y TBST-leche 10% 5 h para PAPP-A, a temperatura ambiente, en inmersión y agitación.
- Cinco lavados de 5 min a temperatura ambiente con TBST
- Incubar con el anticuerpo primario durante toda la noche en heladera. Para la dilución del anticuerpo primario de las IGFBPs se utilizó buffer de bloqueo. Para la dilución del anticuerpo PAPP-A se utilizó TBST-BSA 2,5%
- Cinco lavados de 5 min a temperatura ambiente con TBST
- Incubar con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa 1:2000 (HRP-anti rabbit- IgG; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) durante 1 hora 30 min a temperatura ambiente. Para la dilución se utilizó buffer de bloqueo.
- Cinco lavados de 5 min a temperatura ambiente con TBST

- Detección por quimioluminiscencia usando el sistema ECL-Plus (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Preparar la membrana entre dos hojas de papel celofán.
- Exponer la membrana a placas radiográficas (GE Healthcare) y revelar en cuarto oscuro con soluciones de revelado y fijación (Kodak).
- Lavar con agua destilada y secar la placa a temperatura ambiente.

3.4.4 Western ligand blot

Para el estudio de las proteínas ligadoras activas se utilizó volumen constante de muestras de LF (Nicholas y col., 2002) y se procedió a realizar electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% siguiendo la metodología detallada previamente. Una vez obtenida la membrana de nitrocelulosa se siguió el siguiente protocolo:

- Bloqueo de los sitios inespecíficos con albúmina sérica bovina (Sigma- Aldrich) al 5% en TBST
- Cinco lavados sucesivos de 5 min con TBST a temperatura ambiente
- Incubación durante toda la noche con el ligando biotinilado IGF1 (Novozymes GroPep) con una concentración de 750 ng/mL
- Cinco lavados de 5 min con TBST a temperatura ambiente
- Incubación con Extravidina-peroxidasa (Sigma- Aldrich) diluida 1:5000 en solución de bloqueo
- Lavados de 5 min con TBS- Tween 20, 5 veces
- Detección por quimioluminiscencia usando ECL-Plus system (GE Healthcare) en hyperfilm- ECL film(GE Healthcare) colocar la membrana en un recipiente con el reactivo e incubar 5 min
- Escurrir la membrana y colocarla entre dos hojas de papel celofán
- Revelar la membrana en cuarto oscuro con los reactivos de revelado y fijado Kodak; y placas radiográficas (GE Healthcare)
- Lavado con agua destilada
- Secado de la placa a temperatura ambiente.

Las diferentes IGFBPs fueron identificadas en base a sus diferentes PM (tabla 3)

Tabla 3: Peso molecular de las IGFBPs en muestras de LF (Nicholas y col., 2002)

PROTEÍNA DE UNIÓN	PM (KDa)
IGFBP2	34
IGFBP3	40-44
IGFBP4	24-29
IGFBP5	31

3.4.5 Diseño de cebadores específicos

Basados en secuencias ya publicadas y utilizadas para la amplificación de fragmentos de ARN correspondientes a IGF1, su receptor, sus proteínas ligadoras y su proteasa específica PAPP-A, se diseñaron cebadores específicos (tabla 4). Para el diseño y posterior verificación de su especificidad, se utilizó la aplicación PrimerSelect del programa LASERGENE (DNASar, WI, USA). Todos los oligonucleótidos utilizados fueron provistos por Invitrogen. A su vez, la especificidad de los mismos se cotejó por comparación directa de su secuencia contra el genoma completo de *Bos taurus* mediante el uso del programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Por otro lado, se diseñaron cebadores para amplificar las secuencias codificantes de las enzimas CYP19a1 (específica de células de la granulosa) y CYP17a1 (específica de células de la teca) siguiendo el procedimiento anteriormente detallado. Las reacciones de amplificación con estos cebadores permitieron seleccionar las muestras sin contaminación cruzada entre las células provenientes de las distintas poblaciones foliculares. Las amplificaciones de CYP19a1 a partir de ADNc obtenidos de células de la teca y de CYP17a1 a partir de muestras de la granulosa, indicaron contaminación cruzada entre estas poblaciones foliculares por lo que dichas muestras debieron ser descartadas.

A su vez, se emplearon cebadores específicos para amplificar el gen de expresión constitutiva correspondiente a la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con el objeto de normalizar los niveles de expresión en relación al mismo.

En la tabla 4 se describen las secuencias de los cebadores utilizados.

Tabla 4: Secuencia y condiciones de cebadores utilizados en PCR.

Cebador	Secuencia (5´-3´)	Longitud del producto (pb)	Referencia
IGF1	For TCG CAT CTC TTC TAT CTG GCC CTG T Rev GCA GTA CAT CTC CAG CCT CCT CAG A	240	Pfaffl y col. (2002)
IGFBP1	For TCA AGA AGT GGA AGG AGC CCT Rev AAT CCA TTC TTG TTG CAG TTT	123	Pfaffl y coll. (2002)
IGFBP2	For CAC CGG CAG ATG GGC AA Rev GAA GGC GCA TGG TGG AGA T	136	Pfaffl y col. (2002)
IGFBP3	For ACA GAC ACC CAG AAC TTC TCC T C Rev GCT TCC TGC CCT TGG A	194	Pfaffl y col. (2002)
IGFBP4	For GCC CTG TGG GGT GTA CAC Rev TGC AGC TCA CTC TGG CAG	342	Plath-Gabler y col. (2001)
IGFBP5	For TGC GAG CTG GTC AAG GAG Rev TCC TCT GCC ATC TCG GAG	257	Plath-Gabler y col. (2001)
IGFBP6	For AGA AAG AGG ATT TGC CTT TGC Rev TCC GGT AGA AGC CCC TAT G	324	Plath-Gabler y col. (2001)
PAPP-A	For TGGAGAACGCTTCGCTCAACTG Rev ACGCTGGGTCTGTCTGGCTTT	137	Diseñado en el laboratorio GenBank:XM_613511.6
IGFR1	For CACGCCTTGGTCTCCTTGTCTCT Rev CGTCACTTCTCCATGCGGTAAT	219	Diseñado en el laboratorio GenBank: NM_001244612.1
GAPDH	For CAC CCT CAA GAT TGT CAG CA Rev GGT CAT AAG TCC CTC CAC GA	103	Shibaya y col. (2007)
CYP17	For GGAGGCGACCATCAGAGAAGTGC Rev CAGCCGGGACATGAAGAGGAAGAG	319	Lagaly y col. (2008)
CYP19	For TAAAACAAAGCGCCAATCTCTACG Rev GGAACCTGCAGTGGGAAATGA	341	Lagaly y col. (2008)

3.4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final

Para analizar la expresión génica de IGFBP2 y 3 e identificar y caracterizar las poblaciones celulares se realizó PCR de punto final para CYP17A1 (teca) y CYP19A1 (granulosa). Las muestras con más de una población, las muestras de teca en que se detectó expresión de CYP19A1 y las de granulosa que expresaron CYP17A1 fueron descartadas.

Las PCR se realizaron de acuerdo a las condiciones estandarizadas para cada par de cebadores. El número de ciclos y cantidades de ADNc empleados como molde fueron determinados en experiencias previas. Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo ADNc constante (tabla 5), cebador sentido (20 µM), cebador antisentido (20 µM), 2,5 µl de buffer Taq 10X (50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8,4), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP; y 2 U Taq polimerasa (5 U/µl) (todos los reactivos fueron provistos por Invitrogen) usando un termociclador (TC-3000G, Techne Inc., NJ, USA). El programa utilizado incluyó un tiempo inicial de

desnaturalización de 3 min a 94°C seguido de 35 (CYP17A1 y CYP19A1), 32 (IGFBP2) y 30 (IGFBP3) ciclos de 45 seg a 94°C para la desnaturalización del ADNc, 30 seg a 60,8°C (CYP17A1), 55,4°C (CYP19A1), 52°C (GAPDH), 58°C (IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3), 60°C (IGFBP4, IGFBP6), 63°C (IGFBP5) y 1 minuto 30 seg a 72°C para la extensión a partir de los cebadores. Un último paso a 72°C durante 10 min fue necesario para la extensión final de todos los productos amplificados. Se realizaron conjuntamente en cada ensayo, controles negativos reemplazando el ADNc por agua bidestilada estéril.

Los productos de todas las PCR fueron sembrados en geles de agarosa al 2% conteniendo solución tamponada TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 0,5 mM EDTA, pH 8,0) y colorante de ácidos nucleicos GelRed 1X (Biotium, CA, USA). Paralelamente a las muestras, se sembró 1 µl del marcador de pares de bases (Ladder 100 pb, PBL Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina) con el objetivo de determinar la correspondencia del producto amplificado con el tamaño esperado. La electroforesis se efectuó a voltaje constante de 80 V.

Las bandas obtenidas se visualizaron en el gel bajo luz UV de un transiluminador (Labnet, Edison, Estados Unidos) y se tomaron fotos usando una cámara digital (Olympus C-5060, Olympus America INC., USA).

3.4.7 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Para el estudio de la expresión génica de los diferentes miembros del sistema IGF se optimizó un protocolo de PCR en tiempo real usando SYBR Green I (Invitrogen). Para algunas de las IGFBPs que se habían analizado por PCR de punto final (IGFBP1, 4, 5 y 6) se realizó una validación de dichos resultados por PCR en tiempo real. Para ello se tomaron muestras al azar de cada grupo analizado y se realizó la técnica de PCR en tiempo real como se detalla a continuación. Los resultados fueron analizados y comparados obteniendo niveles similares de expresión en ambas técnicas. Se utilizó como gen de referencia interno el GAPDH.

Los niveles relativos de transcritos se midieron en un StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technology, CA, USA) y se analizaron mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen 2001).

Todas las mediciones fueron realizadas por duplicado y las eficiencias de las reacciones se evaluaron por medio de una curva estándar de 6 puntos y calculadas

usando el software StepOne v2.2. Estas curvas estándares se construyeron a partir de diluciones seriadas de un pool de ADNc. Las cantidades de ADNc usadas se muestran en la tabla 5.

La concentración de ADNc se cuantificó previamente por el método fluorimétrico (Qubit, Invitrogen) y se utilizaron 4 μ l de ADNc para cada reacción. Para GAPDH y las IGFBPs se utilizó una mezcla conteniendo buffer taq 10X (1X), $MgCl_2$ 50 mM (3 mM), dNTPs 25 mM (0,2 mM), SYBR Green (0,5 μ M) y enzima Taq polimerasa 5 U/ μ l (2 U/25 μ l). El protocolo utilizado constó de una desnaturalización inicial 95°C por 10 min, 38 ciclos de una desnaturalización 95°C por 15 seg, anillado de 62°C (IGF1), 58°C (IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3), 60°C (IGFBP4, IGFBP6), 63°C (IGFBP5), y 52°C (GAPDH) por 20 seg, extensión de 72°C por 30 seg y lectura a 74°C por 10 seg. Para PAPP-A se utilizó una mezcla conteniendo buffer high 10X (1X), $MgCl_2$ 50 mM (3 mM), dNTPs 25 mM(0,2 mM), SYBR Green (0,5 μ M) y enzima Taq pegasus 5 U/ μ l (2 U/25 μ l). El protocolo utilizado constó de una desnaturalización inicial 94°C por 2 min, 40 ciclos de una desnaturalización 92°C por 15 seg, anillado de 60°C por 25 seg, extensión de 72°C por 30 seg y lectura a 84°C por 10 seg. En todos los ensayos se incluyó un control negativo.

Los niveles de expresión de los genes se analizaron según los valores de sus Cts (del inglés: *cycle threshold*) los que fueron calculados por el software StepOne v2.2 (Applied Biosystems). Dicho valor corresponde al ciclo en el que la señal de fluorescencia puede ser detectada como valor de corte o umbral. Para confirmar la pureza de los productos se realizaron curvas de disociación y por electroforesis en geles de agarosa al 2% fueron analizadas muestras al azar.

Tabla 5: Cantidad de ADNc a sembrar

Cebador	IGF1	IGFBP1	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP4	IGFBP5	IGFBP6	PAPP-A	GAPDH	CYP17a1	CYP19a1
Ng sembrados	15	90	10	20	15	15	15	8	15	10	10

3.4.8 Secuenciación nucleotídica

Para verificar la especificidad de los productos amplificados por PCR se realizó secuenciación. Los mismos fueron enviados a un servicio para tal fin (Macrogen

Sequencing Service, Korea). Las secuencias obtenidas fueron verificadas empleando la herramienta MegAlign del programa LASERGENE (DNASStar, WI, USA).

3.5 Análisis de imágenes

Las imágenes fueron analizadas usando el analizador digital de imágenes Image Pro-Plus 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA).

Las imágenes de los preparados histológicos fueron digitalizadas mediante una cámara color de video CCD (Motic 2000, Motic China Group, China) montada a un microscopio de luz convencional (Olympus BH2, Olympus Co., Japan) usando un objetivo de 40X (Ortega y col., 2009; 2010). La resolución de las imágenes fue establecida en 1200 x 1600 pixeles. El área marcada se calculó a través de la segmentación de colores seleccionando los objetos con reacción marrón moderado/intenso (dada por la reactividad del cromógeno utilizado) como rango positivo. Dicha coloración fue elegida con una sensibilidad de 4 (máximo 5). Posteriormente fue aplicada una máscara para la separación permanente de los colores y se realizó un histograma para determinar el porcentaje del área marcada sobre el área total evaluada, tal como fue descrito en trabajos previos (Rey y col., 2010). El porcentaje de área marcada en forma positiva para los anticuerpos o las sondas de oligonucleótidos, fueron calculados por no menos de 20 imágenes de cada sección (teca y granulosa).

Las placas obtenidas del revelado por quimioluminiscencia fueron escaneadas con un escáner de oficina (HP Officejet J5 780) con alta resolución (1200 dpi) y formato tiff. Los niveles de cada proteína fue analizada por densidad óptica integrada (DOI), los cuales fueron comparados entre las muestras de LF de folículos provenientes de animales controles y con quistes ováricos (Rey y col., 2010).

3.6 Cultivos celulares

3.6.1 Muestras

Se utilizaron muestras de ovarios que fueron obtenidas en playa de faena y transportadas al laboratorio en solución fisiológica (9 g NaCl/L) a 30°C.

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron lavadas con solución fisiológica, etanol 70° y por último, un lavado con solución fisiológica para eliminar los restos de

etanol. Todas las soluciones utilizadas para dichos lavados fueron previamente acondicionadas en baño termostático a 35°C (Figura 17 A).

Se seleccionaron folículos con características coincidentes a las de folículos preovulatorios (folículo de diámetro superior a 8 mm provenientes de ovarios sin cuerpo lúteo, con LF cristalino y teca vascularizada; Figura 17 B).

3.6.2 Obtención de células de la granulosa

Para obtener las células de la granulosa destinadas a cultivo primario, se realizó la punción folicular de 6 folículos preovulatorios. Con una aguja de 18 G y jeringa de 1 mL se punzaron dichos folículos y extrajo el líquido folicular que se almacenó a -80°C para su posterior análisis hormonal. Sin retirar la aguja del folículo, se inyectó PBS estéril al folículo y se realizaron cuidadosos lavados sin que la aguja se retire del folículo (Figura 17 C). Las células resuspendidas en PBS fueron centrifugadas a 500 g por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet de células se lavó en PBS estéril. Se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y finalmente se resuspendieron las células en 2 mL de medio *Dubelco's Modified Eagle's Medium: F-12 Ham* (DMEM: F12) con 0,1 % BSA, 0,1 % anfotericina, 1 ng/mL FSH, Androtenediona 10^{-7} M, 0,1 % penicilina/streptomomicina, 0,01 ng/mL insulina (Figura 17 D).

Se filtró la suspensión celular en un filtro de malla de acero 150 μ m y se prosiguió con el recuento celular mediante la técnica de exclusión del azul de tripán en cámara de Neubauer. Se destinaron las células a diferentes ensayos de medios de cultivos. Una vez finalizados los ensayos se obtuvieron las células, se resuspendieron en el reactivo comercial Trizol (Invitrogen) para la extracción de ARN total y el medio de cultivo se almacenó a -80°C para su medición hormonal.



Figura 17: Procesamiento para obtención de células de la granulosa

3.6.2.1 Ensayo de medios de cultivo para células de la granulosa

Los medios a ensayar fueron:

- ❖ DMEM: F12 con 1 ng/mL de FSH y 0,01 ng/mL de insulina
- ❖ DMEM: F12 con 1 ng/mL de FSH sin insulina
- ❖ DMEM: F12 con 0,01 ng/mL insulina sin FSH
- ❖ DMEM: F12 sin suplementos hormonales
- ❖ DMEM:F12 con 1 ng/mL FSH y 0,01 ng/mL insulina
- ❖ DMEM:F12 sin suplementos
- ❖ DMEM:F12 con 4 ng/mL de selenio y 2,5 µg/mL de transferrina
- ❖ DMEM:F12 con 4 ng/mL Selenio, 2,5 µg/mL transferrina y 0,01 ng/mL insulina.

Se cultivaron 50.000 células vivas por pocillo y se incubaron 24, 48 y 72 h. Se realizó un recuento celular con azul de Tripán en diferentes tiempos y se obtuvieron las células para el análisis del ARNm de CYP17A1 y CYP19A1. El sobrenadante del cultivo se almacenó a -80°C para su posterior medición hormonal.

3.6.3 Obtención de células de la teca

Para la obtención de las células de la teca, primero se separó el folículo de interés con la ayuda de un bisturí (Figura 18 A y B). Una vez apartado el folículo del resto del ovario, se aspiró el LF mediante punción folicular como se indicó anteriormente y se lo almacenó a -80°C para su posterior análisis. Se lavó enérgicamente el folículo con PBS estéril para eliminar las células de la granulosa y con ayuda de pinzas de disección, se extrajo suavemente la capa de células de teca (Figura 18 C). Estas muestras se lavaron en medio DMEM:F12 sin suplementos y las células fueron disgregadas con colagenasa (dilución 1:10) 1 h a 37°C (Figura 18 D). Posteriormente, se filtró la suspensión celular a través de una malla de acero de 150 µm y se centrifugó el filtrado por 5 min a 500 g. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de medio DMEM: F12 con 0,1 % penicilina/streptomina, 0,01 % gentamicina, 1 µg/mL de selenio, 2 ng/mL de

transferrina y 10 % de suero fetal bovino (Figura 17 E). Se incubó a 39°C, 5% CO₂ por 24 h.



Figura 18: Procesamiento para obtención de células de la teca

3.6.3.1 Estímulo hormonal en células de la teca

Luego de 24 h de cultivo a 39°C, las células de la teca se trataron con tripsina y se sembraron en placas de 24 pocillos con una densidad de 30.000 células vivas por pocillo. Se destinaron pocillos para 9, 24 y 48 h con diferentes dosis de LH como tratamiento hormonal. Las dosis ensayadas fueron: LH 10 ng/mL, LH 100 ng/mL y LH 1000 ng/mL. Finalizados los tiempos indicados se prosiguió a la obtención de las células para su posterior obtención de ARN y análisis por PCR en tiempo real de diferentes marcadores, y el medio se almacenó a -80°C para su posterior estudio hormonal.

3.7 Evaluación estadística

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 15.0.1 para Windows (Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La prueba de homogeneidad de la varianza entre grupos se realizó mediante un test de Levene y la normalidad se verificó por el test de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias estadísticas entre los grupos homogéneos se analizaron por un test ANOVA de una vía y como análisis post hoc se aplicó test de Duncan. Para el análisis de 2 grupos independientes se utilizó t student. El nivel de significancia utilizado fue $p < 0,05$ en todos los casos. Los valores se expresaron como el promedio \pm el desvío estándar (DE).

RESULTADOS



4.1 Inducción de la enfermedad quística ovárica

El modelo de inducción de quistes utilizado para el desarrollo de esta tesis fue probado en un estudio previo, donde se comprobó la inducción de los quistes foliculares en los animales tratados con ACTH con una persistencia de los quistes superior a 10 días (Amweg et al., 2013). El éxito de la inducción de COD fue confirmado mediante la morfología ovárica y cuantificación de las concentraciones hormonales (Amweg et al., 2013). El monitoreo ecográfico diario durante un ciclo estral completo en animales controles reveló una dinámica folicular normal. Los quistes fueron observados por ultrasonografía, como estructuras anecogénicas con un espesor de pared menor a 3 mm. La detección de los quistes se inició a partir del día 32 ± 4 y el diámetro medio de los quistes fue de 23 ± 2 mm, mayores al diámetro máximo de los folículos ovulatorios ($p < 0,05$). Por otro lado, los quistes foliculares espontáneos fueron similares a los quistes inducidos con ACTH ($p > 0,1$). Los folículos preovulatorios del grupo control tuvieron un diámetro promedio de 12 ± 2 mm en el día 18 cuando se realizó la ovariectomía. Microscópicamente, en ovarios de animales con COD, se observaron folículos sanos en desarrollo, folículos con diferentes grados de atresia y quistes en uno de los ovarios, con una capa completa de células de la granulosa, sin observarse presencia de CL en todos los casos (Figura 19).

4.1.1 Diagnóstico y obtención de muestras provenientes de casos con COD espontánea identificados a campo

De los 18 casos identificados con COD espontánea se utilizaron se obtuvieron muestras de LF mediante aspiración guiada por ecografía en 10 casos y muestras de ovarios mediante ovariectomía bilateral en 8 casos (Figura 20).

En cuanto al diagnóstico ecográfico y la morfología folicular, los quistes espontáneos presentaron un diámetro promedio de 26 ± 4 mm (Figura 20). Los animales diagnosticados con COD espontánea presentaban folículos únicos o múltiples, ausencia de CL, pared folicular con menos de 3 mm de espesor, y falta de tono uterino, características compatibles a la descritas en la bibliografía (Silvia y col., 2002; Wiltbank y col., 2002; Bartolomé y col., 2005; Vanholder y col., 2006). Microscópicamente se observaron folículos en diferentes estadios de desarrollo incluyendo folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos, y en todos los casos,

se observó ausencia de tejido luteal activo. Las capas de granulosa y teca presentaron células de morfología conservada, sin procesos degenerativos. Las evaluaciones histológicas e inmunohistoquímicas se realizaron únicamente en los folículos quísticos que presentaban células de la granulosa.

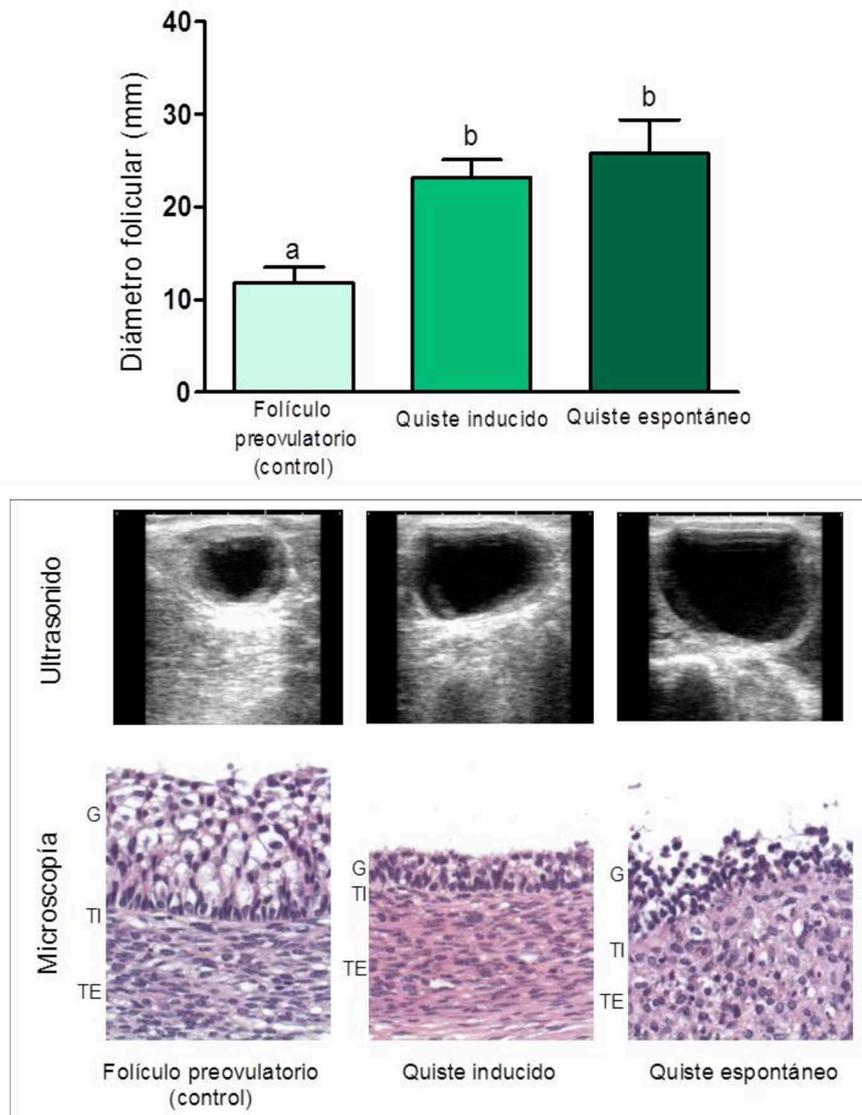


Figura 19: Características morfológicas de los folículos preovulatorios y los quistes en el momento de la ovariectomía. Se muestran las imágenes de ultrasonografía seleccionadas y las características histológicas. Los valores están representados como la media \pm DE. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$). G: granulosa; TI: teca interna, TE: teca externa (Adaptado de Stangaferro, 2013).



Figura 20: (A) Imagen ecográfica de un quiste espontáneo en el momento de la aspiración folicular guiada por ecografía. (B) Ovarios de una vaca con COD espontánea obtenidos mediante ovariectomía bilateral (Adaptado de Amweg, 2013).

4.2 Concentración de las hormonas esteroideas en suero y LF al momento de la ovariectomía

Se determinaron las concentraciones de 17 β -estradiol, progesterona y testosterona en el suero y en el LF de animales controles y animales con COD al momento de la ovariectomía (Figura 21).

Los niveles séricos de progesterona evidenciaron un aumento significativo en los animales controles ($p < 0,05$), aunque con valores subluteales (< 1 ng/ml). Las concentraciones de testosterona mostraron una tendencia a aumentar en los animales con quistes espontáneos ($p = 0,06$), mientras que las concentraciones de 17 β -estradiol no evidenciaron diferencias entre las estructuras analizadas.

Por otro lado, en el LF, la concentración de 17 β -estradiol fue similar en todos los grupos con una tendencia a disminuir en los quistes inducidos en relación a los folículos preovulatorios controles ($p = 0,055$). La concentración de progesterona fue inferior en los folículos quísticos inducidos y espontáneos en relación a los folículos controles ($p < 0,05$). Por otra parte, la concentración de testosterona mostró un aumento en los quistes espontáneos en relación a los folículos preovulatorios controles ($p < 0,05$).

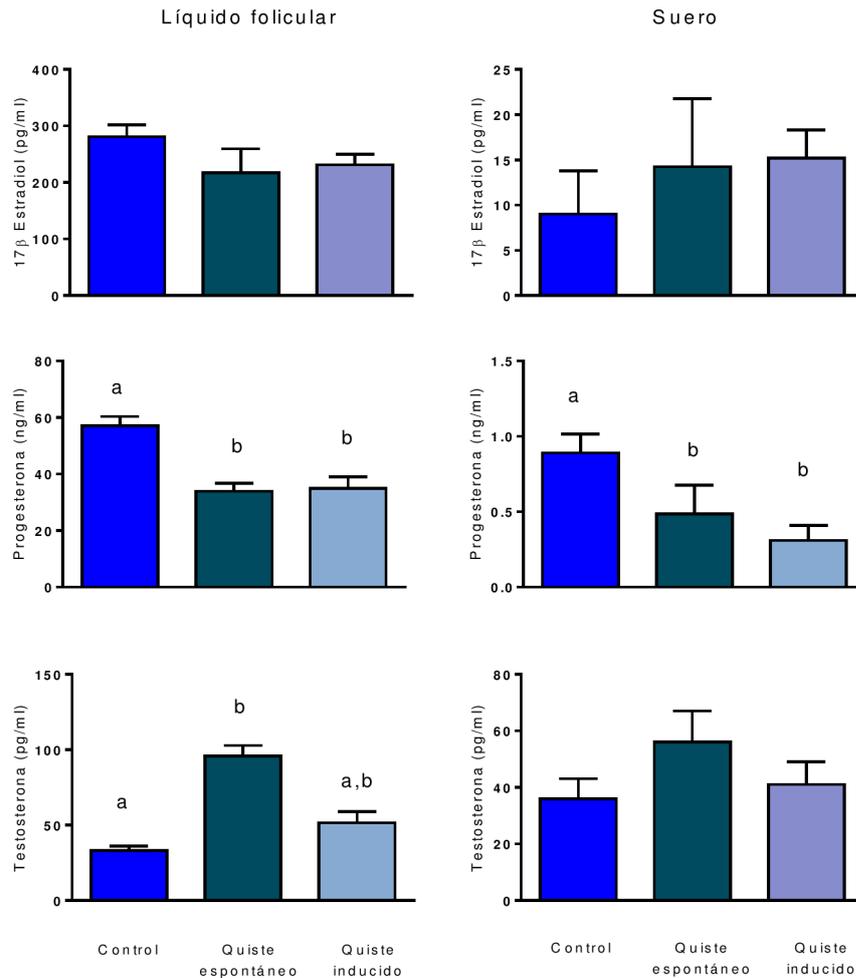


Figura 21: Concentraciones de 17 β -estradiol, progesterona y testosterona en suero y LF de folículos grandes y quísticos al momento de la ovariectomía. Las barras representan la media \pm DE para cada hormona en el suero y en el líquido folicular. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.3 Análisis de los miembros del sistema IGF

Se realizó el análisis de la expresión génica de las IGFbps mediante PCR de punto final, en cambio para IGF1, IGFR1 y PAPP-A se realizó PCR en tiempo real. Para poder validar los resultados obtenidos mediante PCR de punto final y homogeneizarlos para su publicación, se tomaron muestras representativas al azar y se realizó PCR en tiempo real de las diferentes IGFbps. Los niveles detectados fueron similares para ambas técnicas ($p > 0,05$). Como gen de referencia se utilizó el GAPDH, el cuál mostró niveles de expresión similares para los diferentes grupos evaluados ($p > 0,05$).

El nivel de expresión de ARNm in situ para los diferentes componentes del sistema se observaron en forma de gránulos marrones en el citoplasma de las células evaluadas. En los controles negativos de la técnica, se observó ausencia de marcación

en todos los casos. De la misma manera, en el análisis de la expresión proteica mediante inmunohistoquímica, se observó marcación positiva como depósitos marrones en el citoplasma celular y no se observó marcación específica en los cortes destinados como controles negativos de la técnica.

4.3.1 Evaluación de la expresión de IGF1

4.3.1.1 Evaluación de IGF1 mediante PCR en tiempo real

La expresión del ARNm de IGF1 analizada en la pared de folículos terciarios provenientes de ovarios de animales controles y con COD; evidenció niveles similares entre los diferentes grupos analizados por PCR en tiempo real ($p > 0,05$; Figura 22).

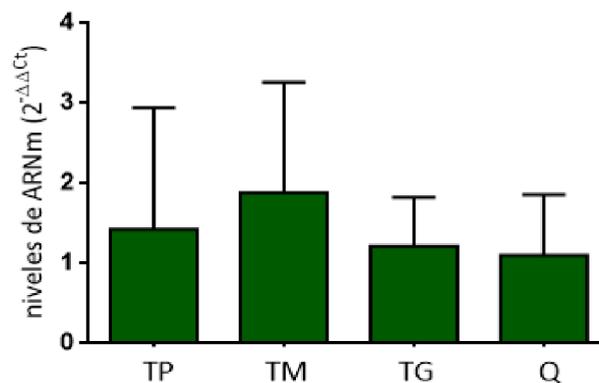


Figura 22: Expresión relativa de ARNm de IGF1 por PCR en tiempo real en pared completa de folículos terciarios pequeños (TP), medianos (TM) y grandes (TG) del grupo control y en folículos quísticos (TQ). Los valores $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se representan como la media \pm DE.

4.3.1.2 Caracterización y evaluación de IGF1 mediante hibridación in situ

La expresión in situ del ARNm de IGF1 se analizó en secciones de ovarios provenientes del grupo control, de animales con COD inducida con ACTH y con COD espontánea. En animales del grupo control se observaron niveles de expresión génica de IGF1 similares en células de la granulosa de todas las estructuras analizadas (Figura 23 A).

Por otro lado, en animales con COD inducida y espontánea el comportamiento fue similar, sin cambios en células de la granulosa de los grupos analizados (Figura 23 B y C).

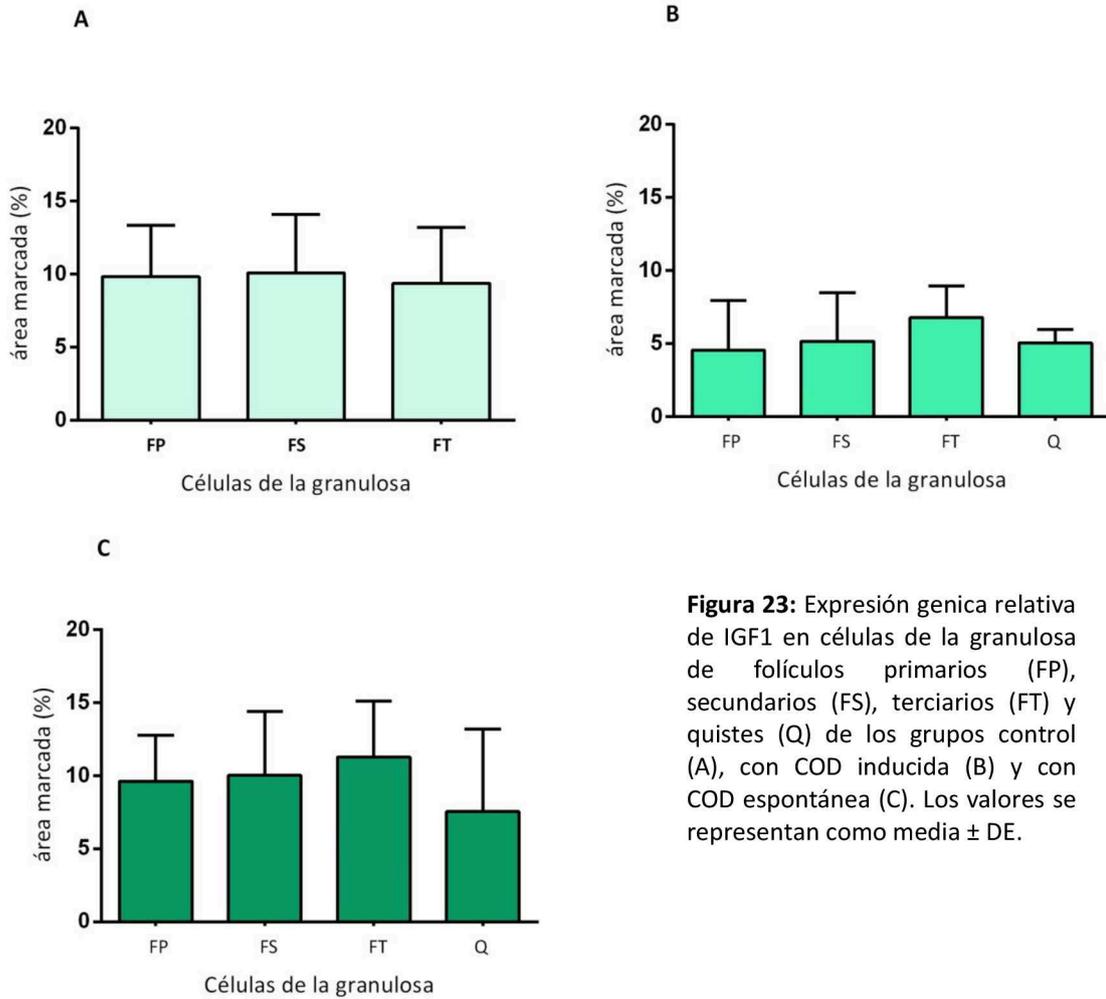


Figura 23: Expresión genica relativa de IGF1 en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C). Los valores se representan como media \pm DE.

Cuando se realizó la comparación entre estructuras análogas de diferentes grupos se observó una menor expresión del ARNm de IGF1 en las células de la granulosa de todas estructuras foliculares de animales con COD inducida comparados con los folículos de animales del grupo control y aquellos de los animales con COD espontánea ($p < 0,05$).

Las células de la granulosa de folículos terciarios de ovarios provenientes de animales del grupo control evidenciaron una mayor marcación respecto a los quistes con COD inducida con ACTH ($p < 0,05$; Figura 24 y 25). Por su parte, las células de la teca no mostraron marcación positiva para la sonda de IGF1 (Figura 25).

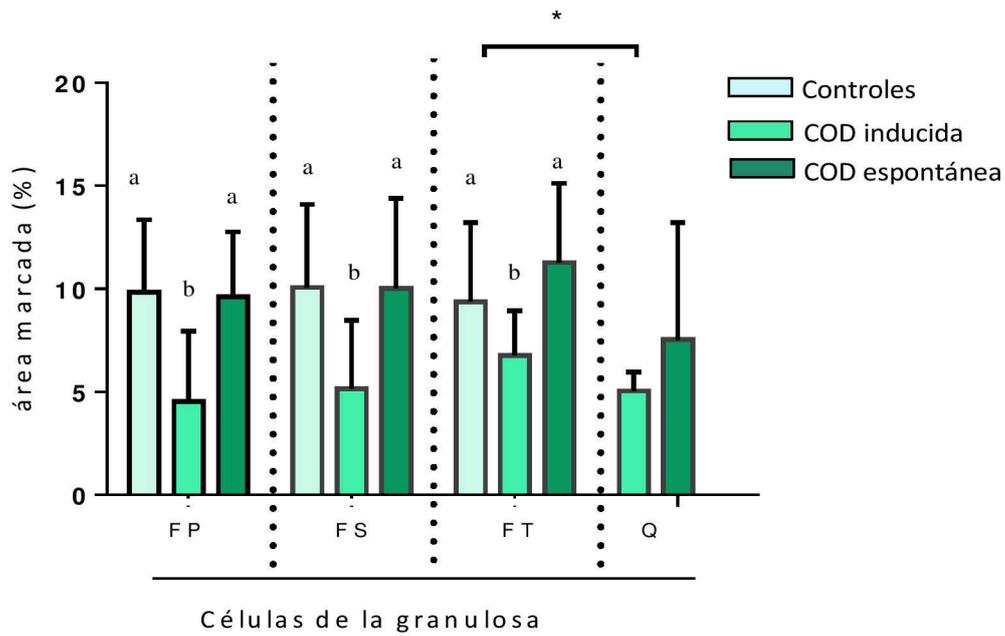


Figura 24: Expresión genica relativa de IGF1 por hibridación in situ en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS) terciarios (FT) y quistes (Q). Las barras representan la media \pm DE. Las diferente letras y el asterisco denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

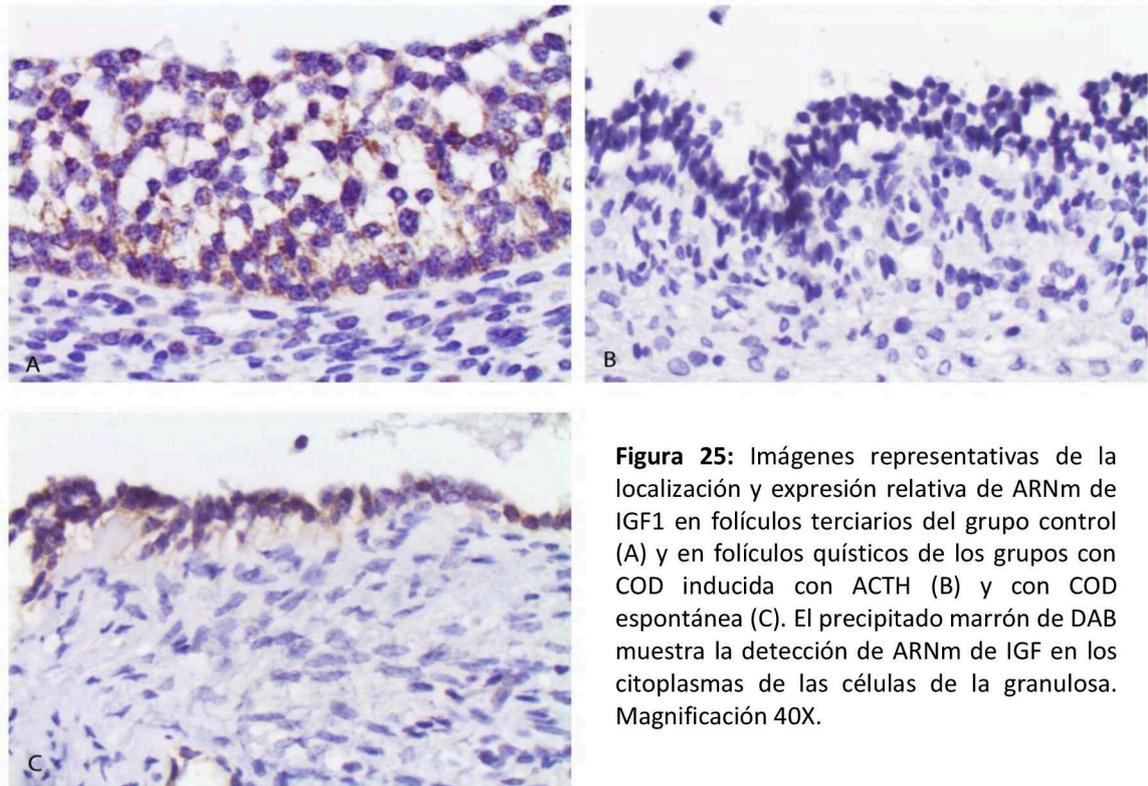


Figura 25: Imágenes representativas de la localización y expresión relativa de ARNm de IGF1 en folículos terciarios del grupo control (A) y en folículos quísticos de los grupos con COD inducida con ACTH (B) y con COD espontánea (C). El precipitado marrón de DAB muestra la detección de ARNm de IGF en los citoplasmas de las células de la granulosa. Magnificación 40X.

4.3.2 Evaluación de la expresión de IGFBP1

4.3.2.1 Evaluación de IGFBP1 mediante PCR en tiempo real

La expresión del ARNm para IGFBP1 se analizó en la pared de folículos provenientes de ovarios de animales controles y de animales con COD espontánea. Se evidenciaron niveles similares en todos los grupos analizados ($p > 0,05$; Figura 26).

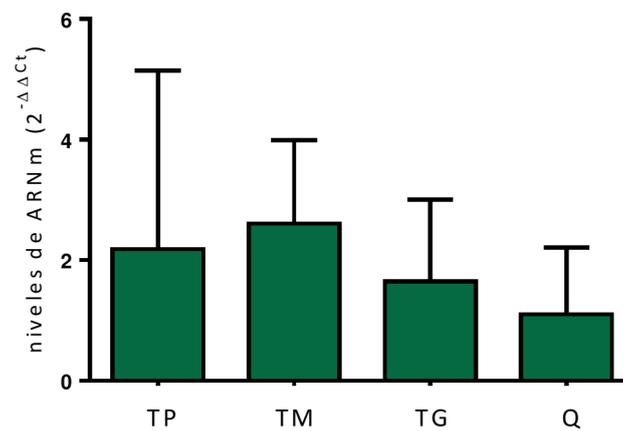


Figura 26: Cuantificación relativa del ARNm de IGFBP1 por PCR en tiempo real en pared completa de folículos terciarios pequeños (TP), medianos (TM) y grandes (TG) del grupo control y en folículos quísticos (Q). Los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se representan como la media \pm DE.

4.3.2.2 Caracterización y evaluación de IGFBP1 mediante hibridación in situ e inmunohistoquímica.

La expresión del ARNm de IGFBP1 no se observó en ninguna categoría folicular de los diferentes grupos estudiados. Por otro lado, la síntesis proteica de esta proteína no evidenció marcación en las estructuras de interés.

4.3.3 Evaluación de la expresión de IGFBP2

4.3.3.1 Evaluación de IGFBP2 mediante PCR en tiempo real

La expresión del ARNm para IGFBP2 analizada en muestras de pared de folículos provenientes de animales controles y con la enfermedad no evidenciaron diferencias significativas entre los grupos analizados ($p > 0,05$; Figura 27).

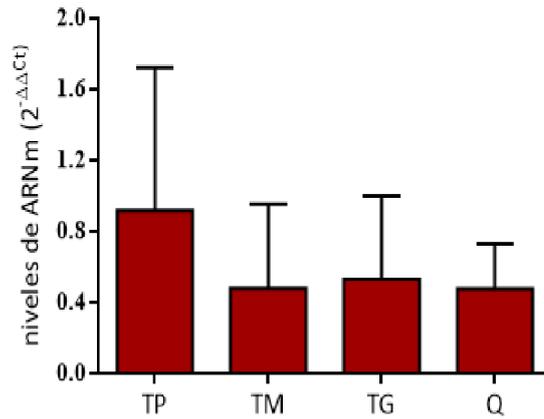


Figura 27: Cuantificación relativa del ARNm de IGFBP2 por PCR en tiempo real en pared completa de folículos terciarios pequeños (TP), medianos (TM) y grandes (TG) del grupo control y en folículos quísticos (Q). Los valores $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se representan como la media \pm DE.

4.3.3.2 Caracterización y evaluación de IGFBP2 mediante hibridación in situ

La expresión del ARNm de IGFBP2 se analizó en pared de folículos provenientes de ovarios del grupo control y de animales con COD inducida con ACTH y con COD espontánea.

Para los animales del grupo control se observaron niveles similares de ARNm en todas las estructuras estudiadas (Figura 28 A). Por su parte, los animales con quistes inducidos experimentalmente con ACTH, evidenciaron una disminución de la expresión génica de esta proteína ligadora en quistes respecto a los folículos en crecimiento ($p < 0,05$; Figura 28 B). Además, en el grupo de animales con COD espontánea se observaron niveles similares de ARNm para IGFBP2 en todas las estructuras analizadas (Figura 28 C).

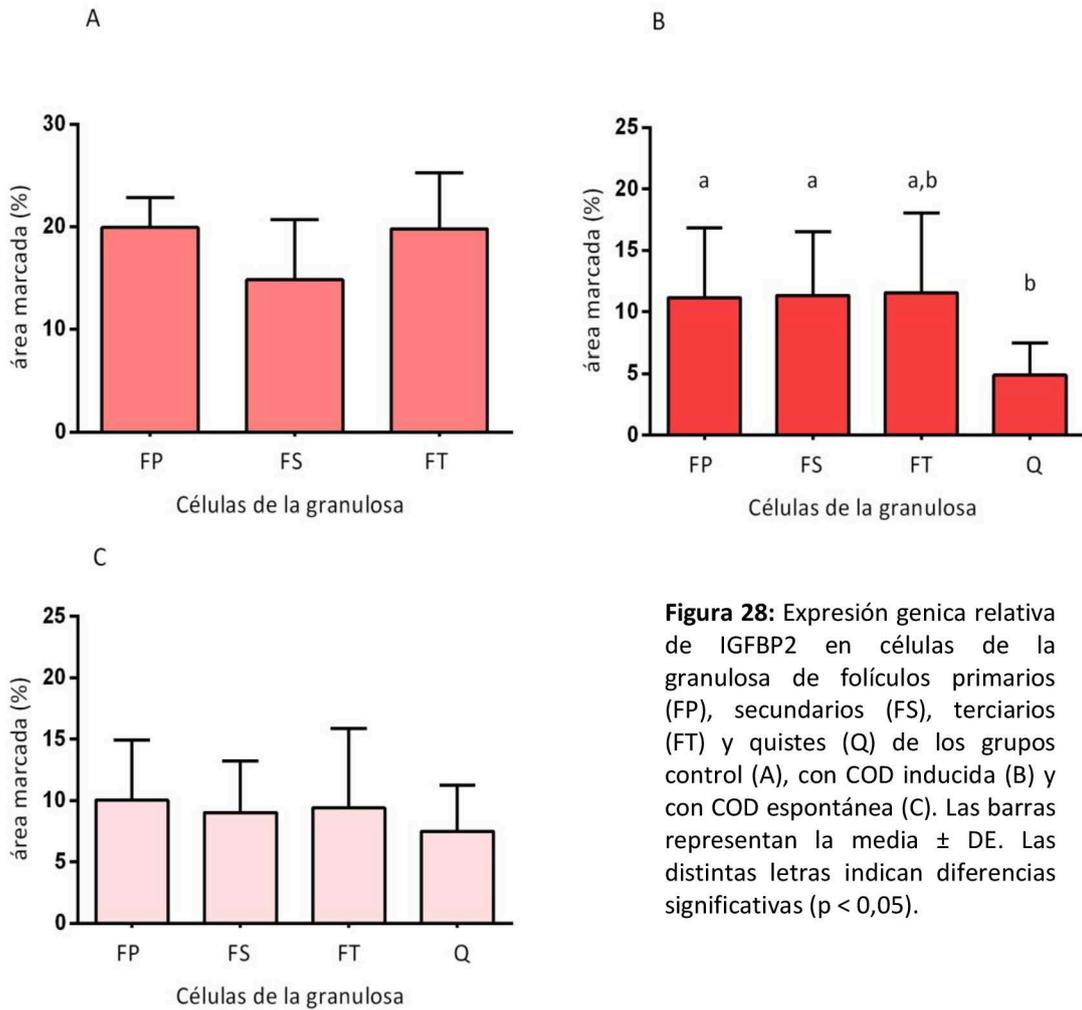


Figura 28: Expresión genica relativa de IGFBP2 en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C). Las barras representan la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al realizar la comparación entre estructuras análogas de diferentes grupos se observó una mayor expresión génica de IGFBP2 en células de la granulosa de folículos del grupo control respecto a los folículos de animales con COD en todas las categorías foliculares estudiadas ($p < 0,05$; Figura 29). Además, los quistes inducidos con ACTH y espontáneos evidenciaron la menor marcación respecto a los terciarios controles ($p < 0,05$; Figura 29 y 30). En ningún caso se observó expresión de ARNm para IGFBP2 en células de la teca (Figura 30).

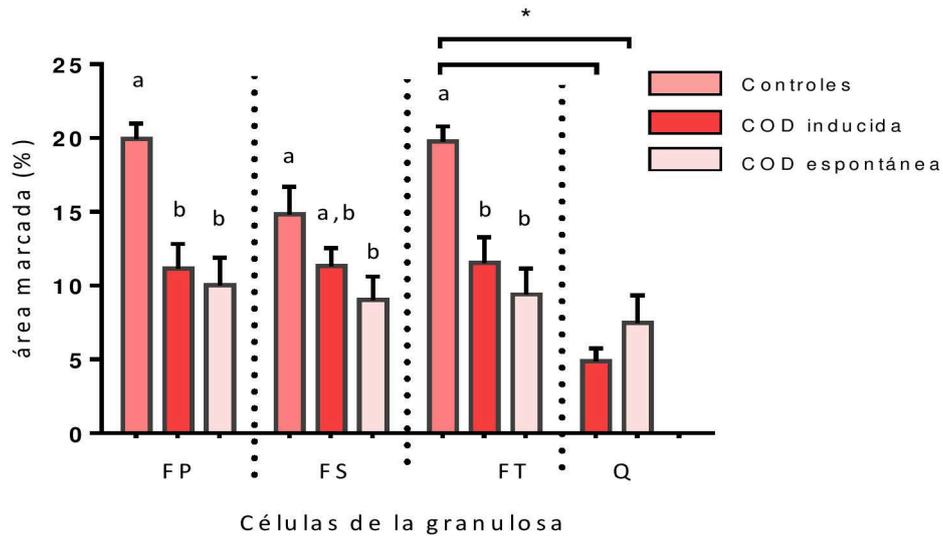


Figura 29: Expresión genica relativa de IGFBP2 por hibridación in situ en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS) terciarios (FT) y quistes (Q). Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras y el asterisco denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

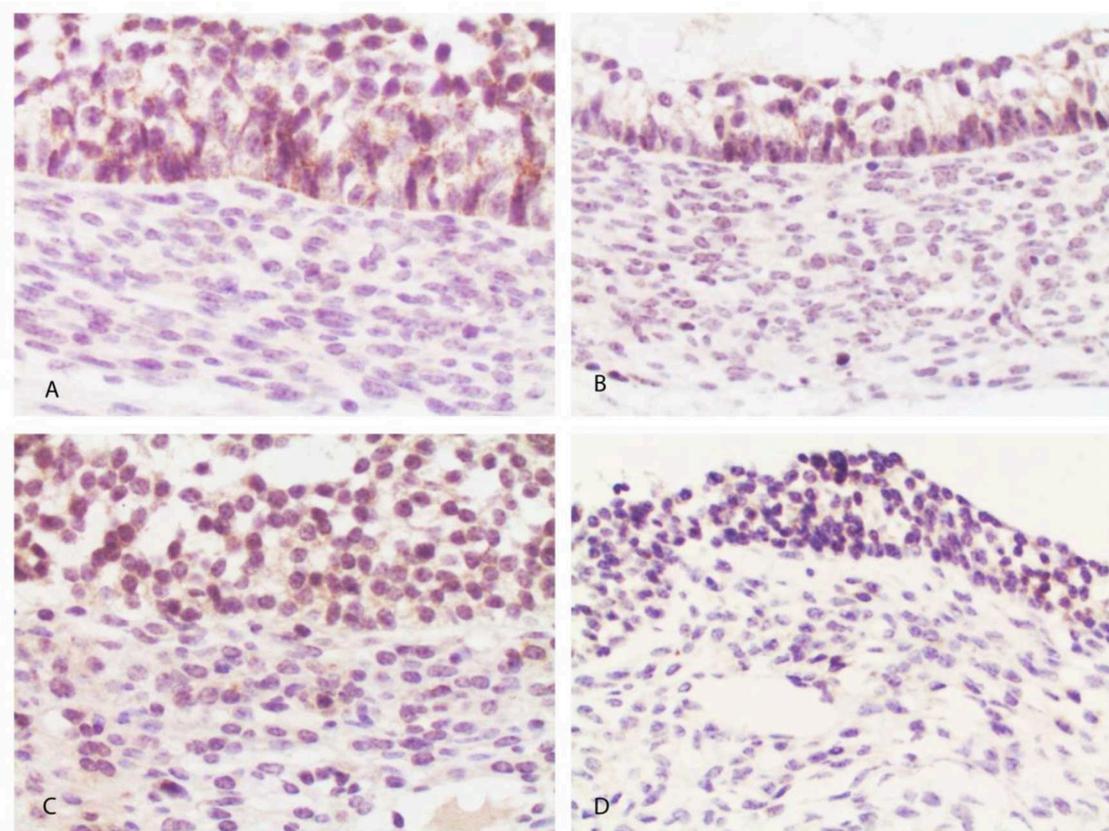


Figura 30: Imágenes representativas de ARNm de IGFBP2 en folículos terciarios del grupo control (A), terciarios del grupo de animales con COD inducida (B) y en folículos quísticos de los grupos con COD espontánea (C) e inducida con ACTH (D). El precipitado marrón de DAB indica los citoplasmas de las células de la granulosa de los distintos folículos con inmunomarcación positiva. Magnificación 40X.

4.3.3.3 Caracterización y evaluación de IGFBP2 mediante inmunohistoquímica

La expresión de IGFBP2 se analizó en pared de folículos provenientes de ovarios del grupo control y de animales con COD inducida con ACTH y con COD espontánea.

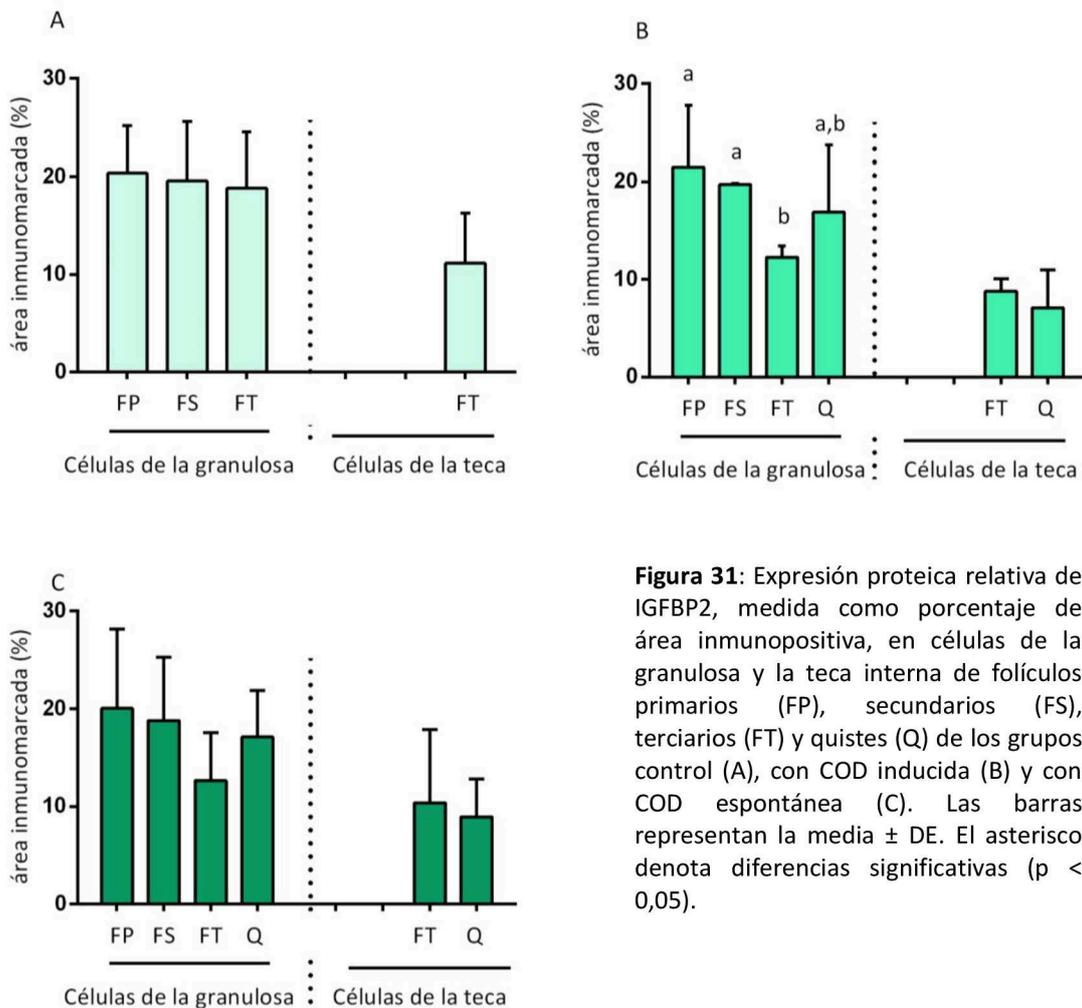


Figura 31: Expresión proteica relativa de IGFBP2, medida como porcentaje de área inmunopositiva, en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C). Las barras representan la media \pm DE. El asterisco denota diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los folículos provenientes de ovarios del grupo control no mostraron diferencias significativas para la expresión de IGFBP2 en células de la granulosa durante la foliculogénesis ($p > 0,05$; Figura 31 A). En las secciones de los ovarios de animales con COD inducida experimentalmente se evidenció una disminución en la expresión de IGFBP2 en las células de la granulosa de folículos terciarios respecto a las estructuras en crecimiento estudiadas ($p < 0,05$; Figura 31 B). Por último, en folículos de ovarios provenientes de animales con COD espontánea, la expresión de IGFBP2 en células de la granulosa fue similar en todos los folículos analizados ($p > 0,05$; Figura 31 C). En ningún grupo analizado se observaron diferencias significativas en la expresión de IGFBP2 en las células de la teca.

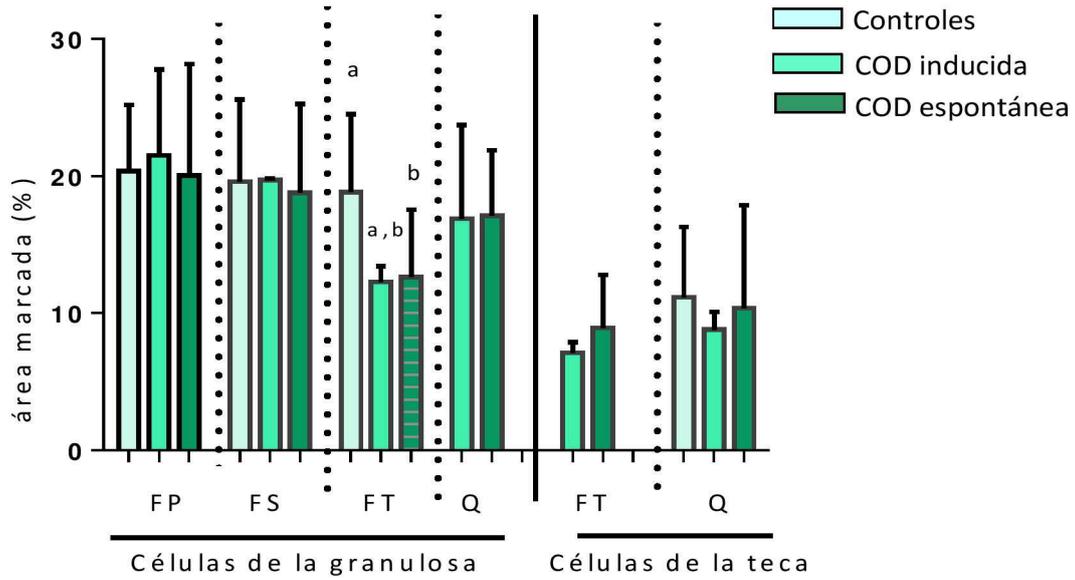


Figura 32: Expresión proteica relativa de IGFBP2, medida como porcentaje de área inmunopositiva, en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los diferentes grupos analizados. Las barras representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

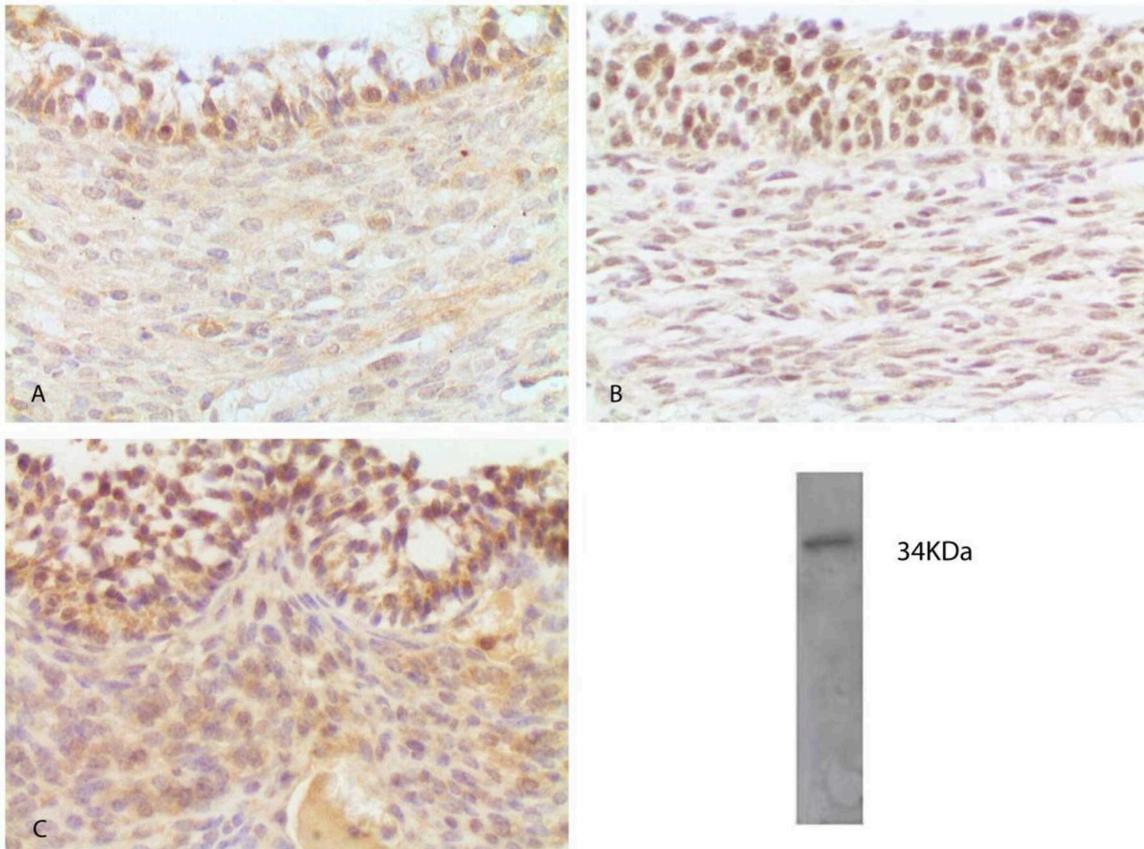


Figura 33: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IGFBP2 en folículos terciarios del grupo control (A), en folículos terciarios (B) y quistes del grupo con COD inducida con ACTH (C). Magnificación 40X. La evaluación de la especificidad del anticuerpo se realizó mediante western blot y evidenció una única banda a 34 KDa.

Cuando se realizó la comparación entre estructuras análogas de diferentes grupos, la inmunomarcación en células de la granulosa evidenció una disminución en los folículos terciarios con COD en comparación con los folículos terciarios controles ($p < 0,05$; Figura 32 y 33). Por el contrario, en células de la teca no se evidenciaron diferencias para la expresión de IGFBP2 ($p > 0,05$; Figura 32).

4.3.4 Evaluación de la expresión de IGFBP3

4.3.4.1 Evaluación de IGFBP3 mediante PCR en tiempo real

La expresión génica de IGFBP3 analizada en pared de folículos de animales controles y con COD evidenció niveles similares en todas las estructuras estudiadas ($p > 0,05$; Figura 34).

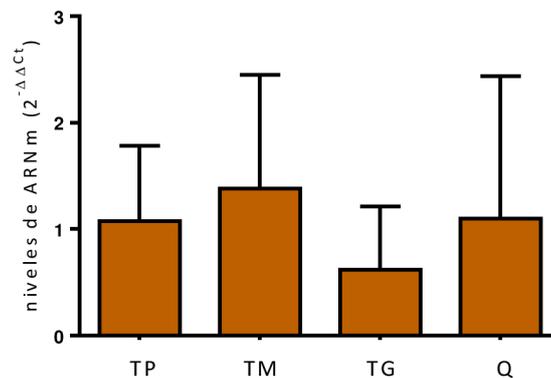


Figura 34: Cuantificación relativa del ARNm de IGFBP3 por PCR en tiempo real en pared completa de folículos controles terciarios pequeños (TP), medianos (TM) y grandes (TG) y en folículos quísticos (Q). Los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ se representan como la media \pm DE.

4.3.4.2 Caracterización y evaluación de IGFBP3 mediante hibridación in situ

En células de la granulosa de folículos provenientes de animales del grupo control se observó un aumento de la expresión génica de IGFBP3 en los folículos más desarrollados respecto a los primarios ($p < 0,05$, Figura 35 A).

En ovarios provenientes de animales con COD inducida experimentalmente se determinaron niveles de expresión génica de IGFBP3 en células de la granulosa similares en todas las categorías foliculares evaluadas ($p > 0,05$; Figura 35 B).

Por otro lado, los animales con COD espontánea presentaron una expresión de ARNm correspondiente a IGFBP3 disminuida en células de granulosa de quistes

respecto a las de folículos secundarios y terciarios del mismo grupo ($p < 0,05$, Figura 35 C).

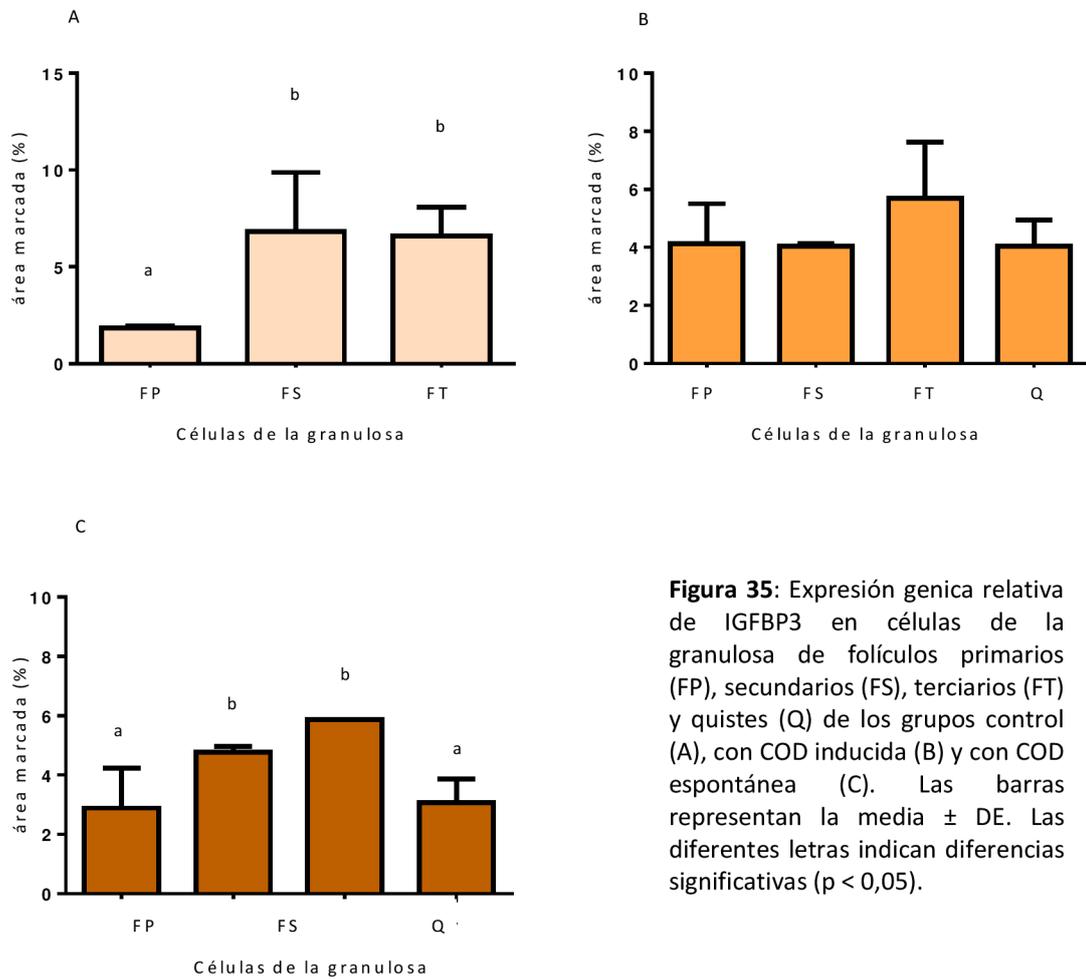


Figura 35: Expresión genica relativa de IGFBP3 en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C). Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La comparación entre estructuras análogas de diferentes grupos evidenció una expresión similar de ARNm para IGFBP3 entre estructuras de la misma categoría folicular en animales controles y con la enfermedad. Sin embargo, en células de la granulosa de quistes espontáneos se determinó una disminución en la expresión genética respecto a los folículos terciarios controles ($p < 0,05$, Figura 36 y 37).

En las células de la teca no se evidenció marcación específica (Figura 37).

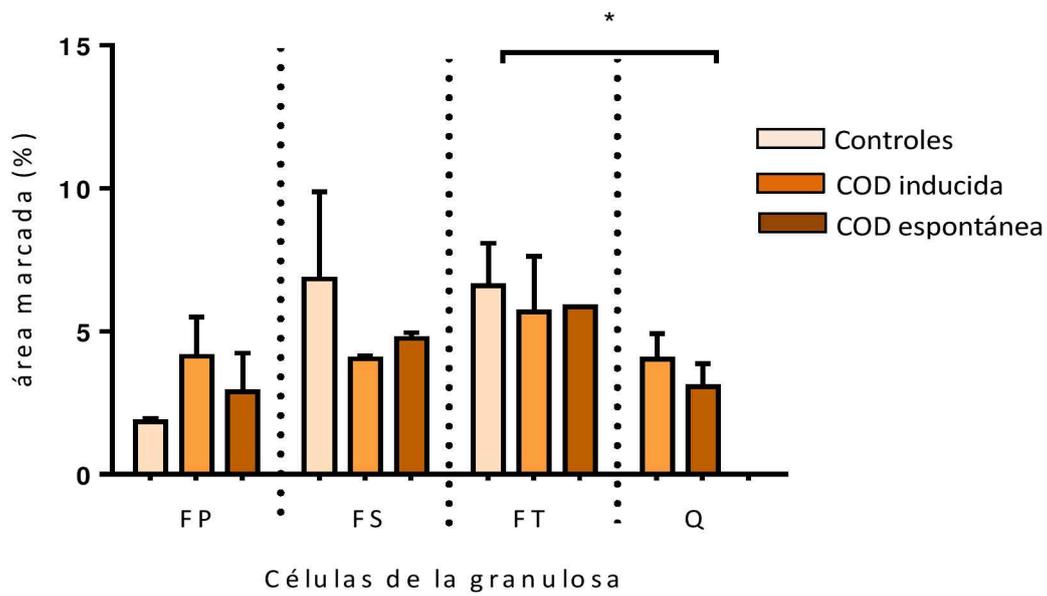


Figura 36: Expresión génica relativa de IGFBP3 por hibridación in situ en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS) terciarios (FT) y quistes (Q). Las barras representan la media \pm DE. El asterisco denota diferencias significativas ($p < 0,05$).

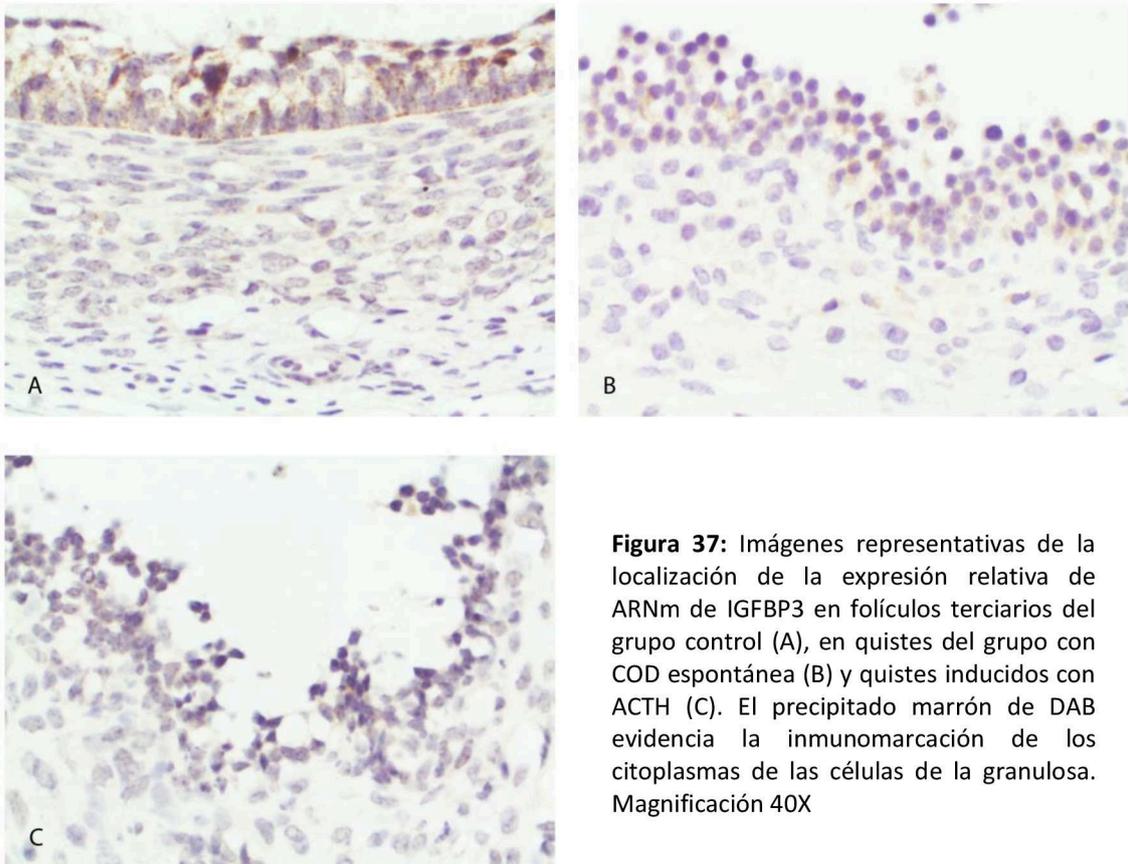


Figura 37: Imágenes representativas de la localización de la expresión relativa de ARNm de IGFBP3 en folículos terciarios del grupo control (A), en quistes del grupo con COD espontánea (B) y quistes inducidos con ACTH (C). El precipitado marrón de DAB evidencia la inmunomarcación de los citoplasmas de las células de la granulosa. Magnificación 40X

4.3.4.3 Caracterización y evaluación de IGFBP3 mediante inmunohistoquímica

La expresión de IGFBP3 en el grupo control fue similar en las células de la granulosa de las diferentes estructuras analizadas ($p > 0,05$; Figura 38 A). Asimismo, la expresión de IGFBP3 en células de la granulosa no evidenció diferencias entre las estructuras evaluadas en folículos de animales con COD inducida experimentalmente (Figura 38 B) y con COD espontánea (Figura 38 C) ($p > 0,05$).

Por otro lado, los niveles de expresión en células de la teca fueron menores que en células de la granulosa para todos los grupos estudiados ($p < 0,05$; Figura 38). Los niveles en las células de la teca de las diferentes categorías fueron similares.

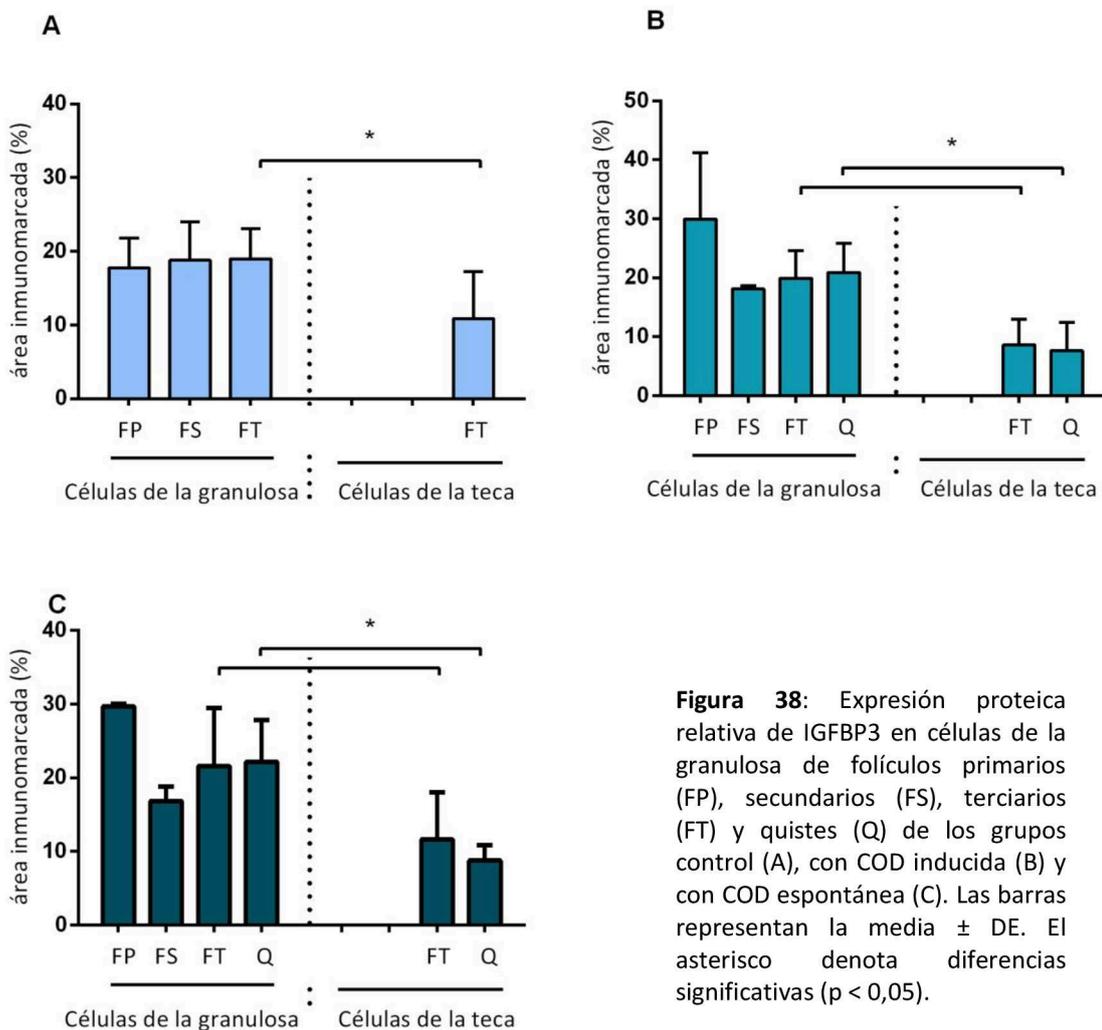


Figura 38: Expresión proteica relativa de IGFBP3 en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C). Las barras representan la media \pm DE. El asterisco denota diferencias significativas ($p < 0,05$).

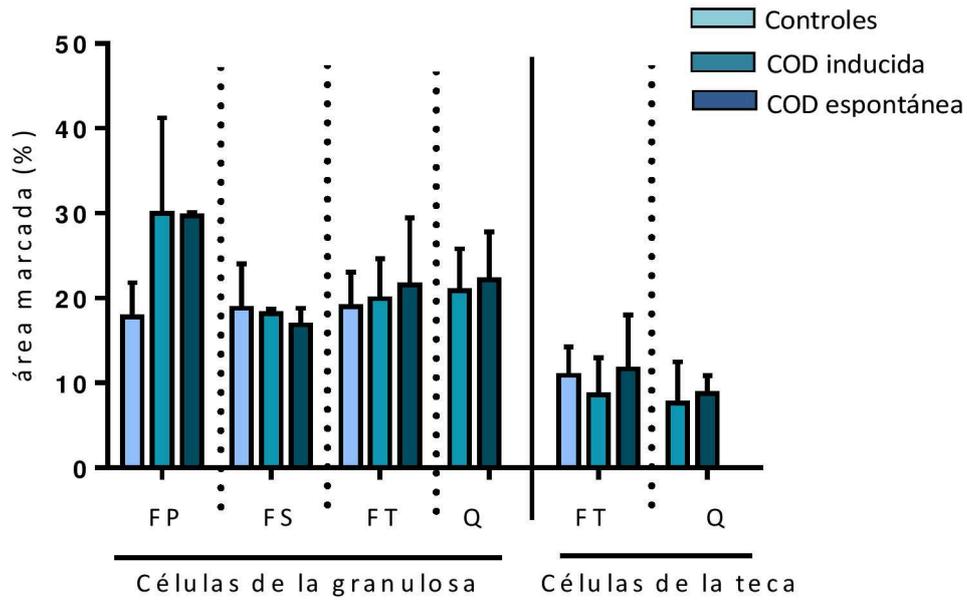


Figura 39: Expresión proteica relativa de IGFBP3 en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quísticos (Q) de animales controles, con COD inducida y espontánea. Las barras representan la media \pm DS.

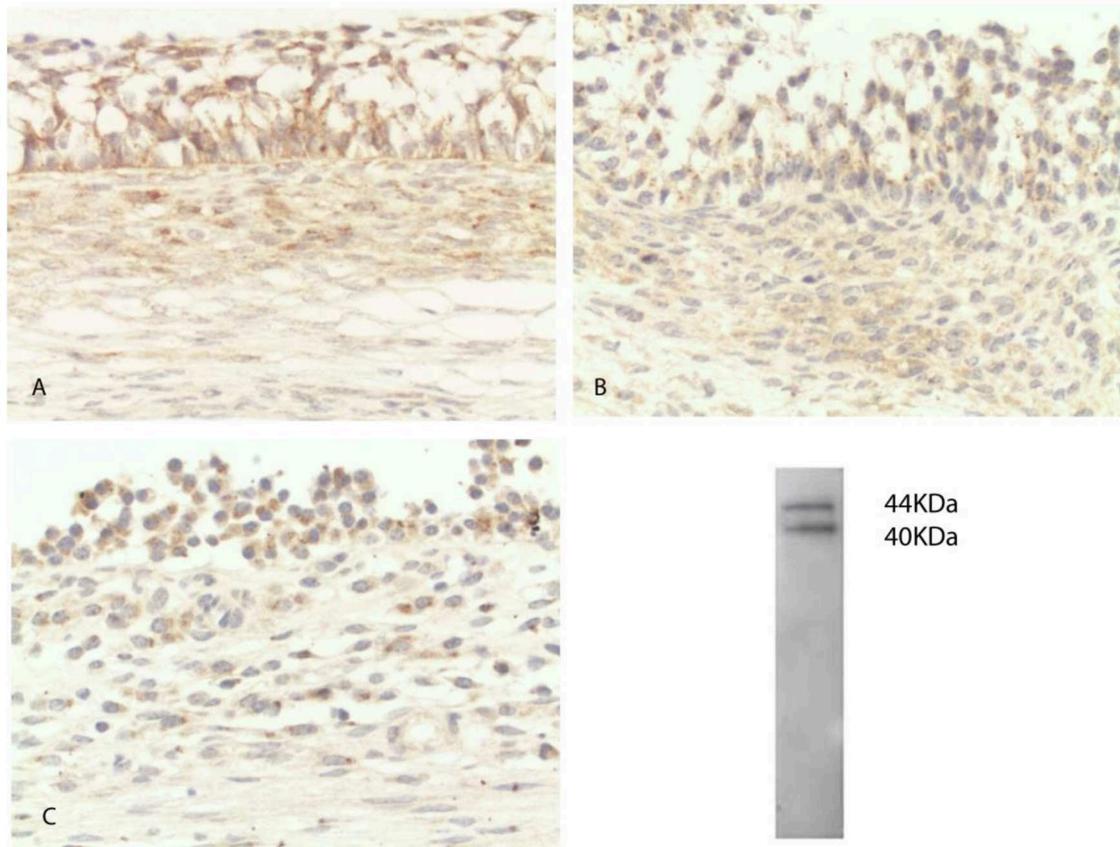


Figura 40: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IGFBP3 en folículos terciarios del grupo control (A), en folículos quísticos de los grupos con COD inducida con ACTH (B) y con la COD espontánea (C). La reacción positiva se evidencia por la presencia del depósito marrón en los citoplasmas de las células. Magnificación 40 X. La especificidad del anticuerpo se analizó por western blot, observándose dos bandas a 40 y 44 kDa correspondientes a IGFBP3.

Al comparar entre estructuras foliculares análogas se observaron niveles similares de expresión de IGFBP3 en células de la granulosa en los diferentes grupos estudiados ($p > 0,05$; Figura 39 y 40). De la misma manera, las células de la teca interna no evidenciaron diferencias entre los grupos analizados ($p > 0,05$; Figura 39 y 40).

4.3.5 Evaluación de la expresión de IGFBP4

4.3.5.1 Evaluación de IGFBP4 mediante PCR en tiempo real

La expresión génica de IGFBP4 analizada en pared folicular proveniente de ovarios de animales controles y con COD evidenciaron niveles similares de ARNm correspondiente a IGFBP4 en todas las estructuras analizadas ($p > 0,05$; Figura 41).

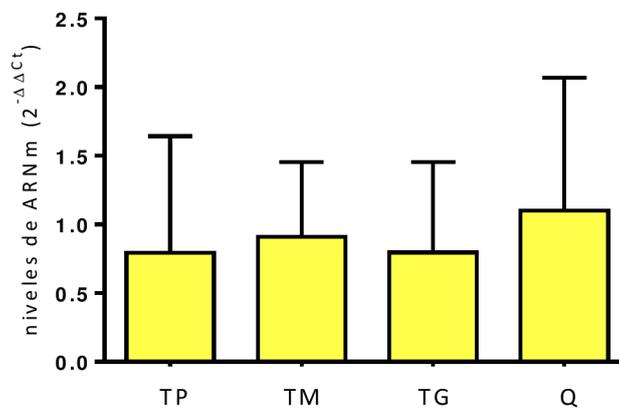


Figura 41: Cuantificación relativa del ARNm de IGFBP4 por PCR en tiempo real en pared completa de folículos controles terciarios pequeños (TP), medianos (TM) y grandes (TG) y en folículos quísticos (Q). Los valores $2^{-\Delta\Delta C_t}$ se representan como la media \pm DE.

4.3.5.2 Caracterización y evaluación de IGFBP4 mediante hibridación in situ

En animales del grupo control se observó una disminución de la expresión del ARNm codificante para IGFBP4 en células de la granulosa de folículos terciarios respecto a folículos en los menores estadios de desarrollo ($p < 0,05$; Figura 42 A). Por otro lado, en animales con COD inducida experimentalmente las células de la granulosa de los folículos en desarrollo presentaron un patrón de expresión génica de IGFBP4 similar al de los controles. Además, se evidenció una menor expresión aún en quistes respecto a las demás estructuras analizadas ($p < 0,05$; Figura 42 B). Por su parte, los animales con COD espontánea no mostraron diferencias entre las diferentes estructuras ($p > 0,05$; Figura 42 C).

La expresión génica de IGFBP4 fue mayor en células de la granulosa respecto a las células de la teca para todas las categorías foliculares de los tres grupos analizados ($p < 0,05$; Figura 42).

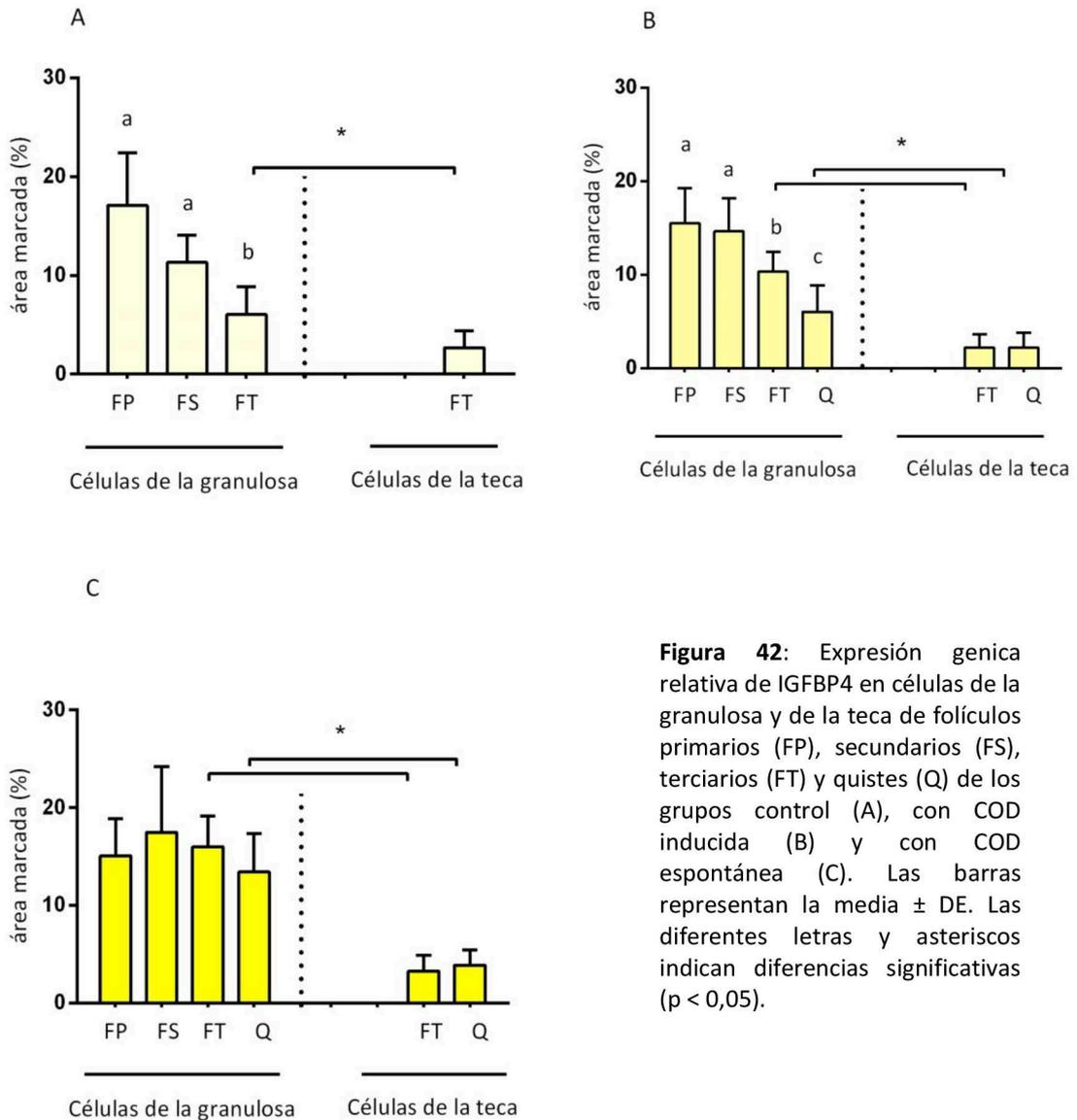


Figura 42: Expresión génica relativa de IGFBP4 en células de la granulosa y de la teca de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C). Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras y asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Entre estructuras análogas de los diferentes grupos, se observó marcación similar en todas las categorías foliculares analizadas ($p > 0,05$; Figura 43). Sin embargo, se evidenció una menor expresión del ARNm para IGFBP4 en células de la granulosa de quistes inducidos experimentalmente respecto a los quistes espontáneos ($p < 0,05$; Figura 43 y 44).

Además, se observó una disminución en la expresión génica en quistes inducidos comparados con los folículos terciarios del grupo control ($p < 0,05$; Figura 43 y 44).

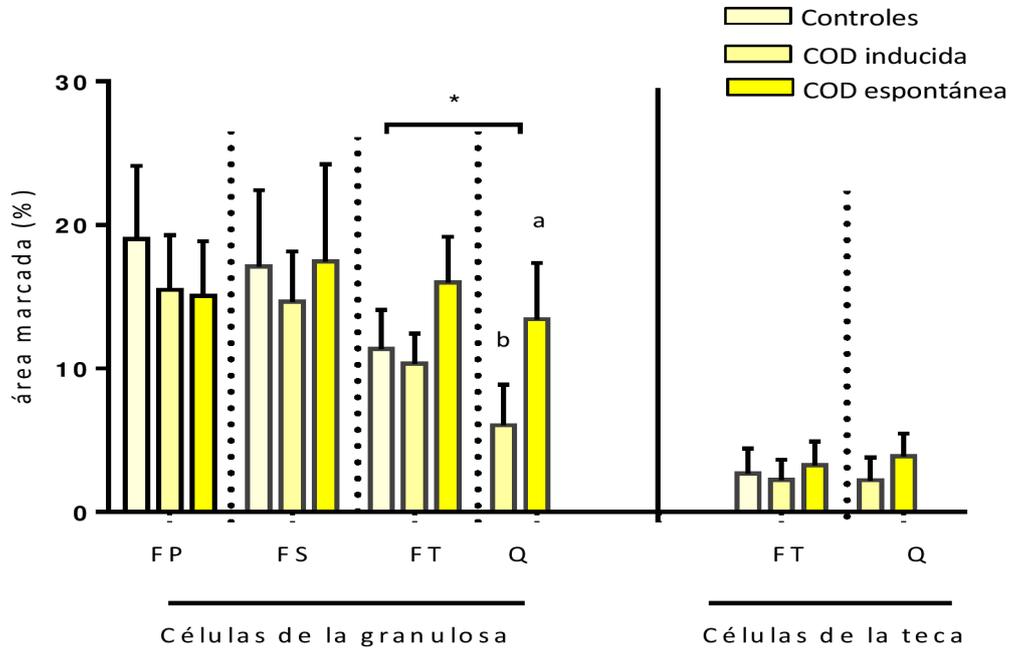


Figura 43: Expresión génica relativa de IGFBP4 por hibridación in situ en células de la granulosa y de la teca de folículos primarios (FP), secundarios (FS) terciarios (FT) y quistes (Q). Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras y el asterisco denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

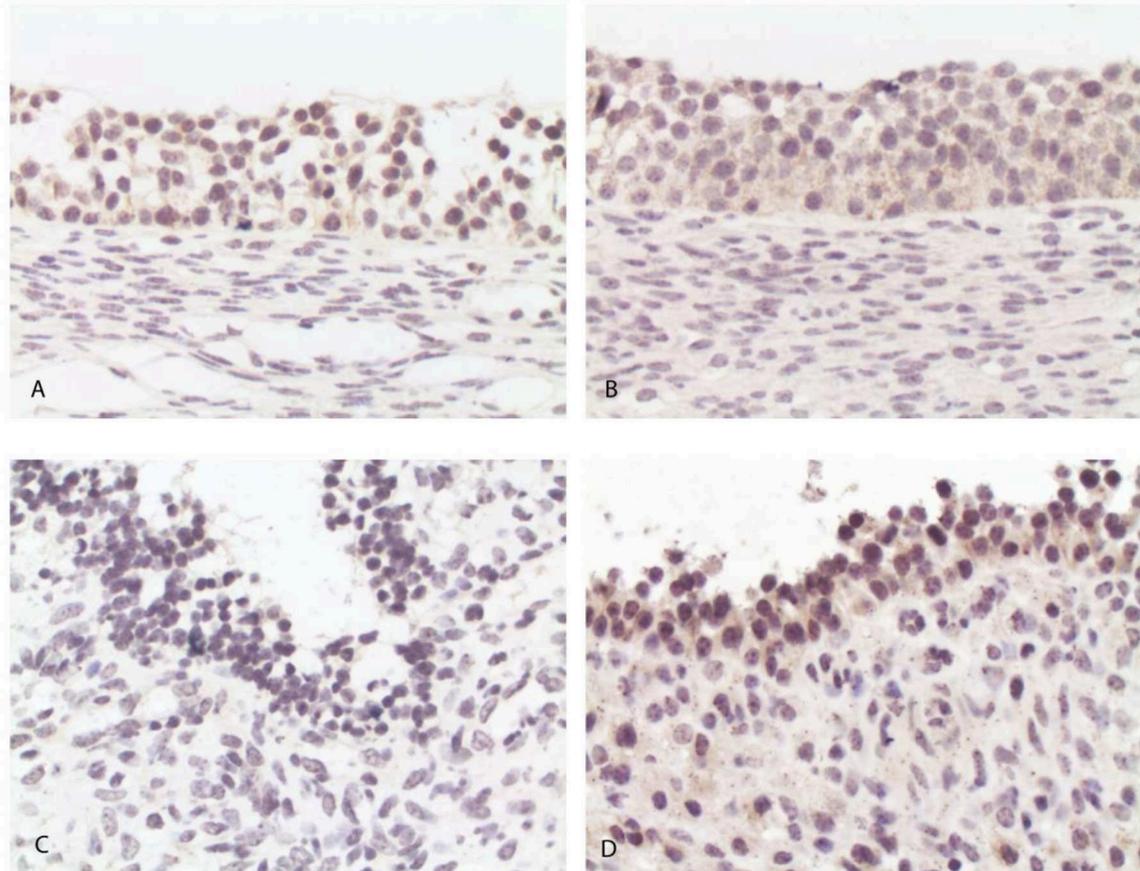


Figura 44: Imágenes representativas de la localización del ARNm de IGFBP4 en folículos terciarios del grupo control (A), folículos terciarios del grupo con COD espontánea (B) y en folículos quísticos de los grupos con COD inducida con ACTH (C) y con COD espontánea (D). El precipitado marrón de DAB muestra los citoplasmas de las células de la granulosa con expresión positiva.

4.3.5.3 Caracterización y evaluación de IGFBP4 mediante inmunohistoquímica

En ovarios de animales del grupo control se observó una marcación similar en todas las categorías de folículos analizadas ($p > 0,05$; Figura 45 A). En animales con COD inducida con ACTH, se determinó una menor expresión de IGFBP4 en los quistes respecto a los folículos primarios del mismo grupo ($p < 0,05$; Figura 45 B). El grupo de animales con COD espontánea evidenció una marcación similar en todos los folículos estudiados ($p > 0,05$; Figura 45 C).

Por otro lado, las células de la granulosa mostraron la mayor expresión en comparación con las células de la teca interna ($p < 0,05$; Figura 45).

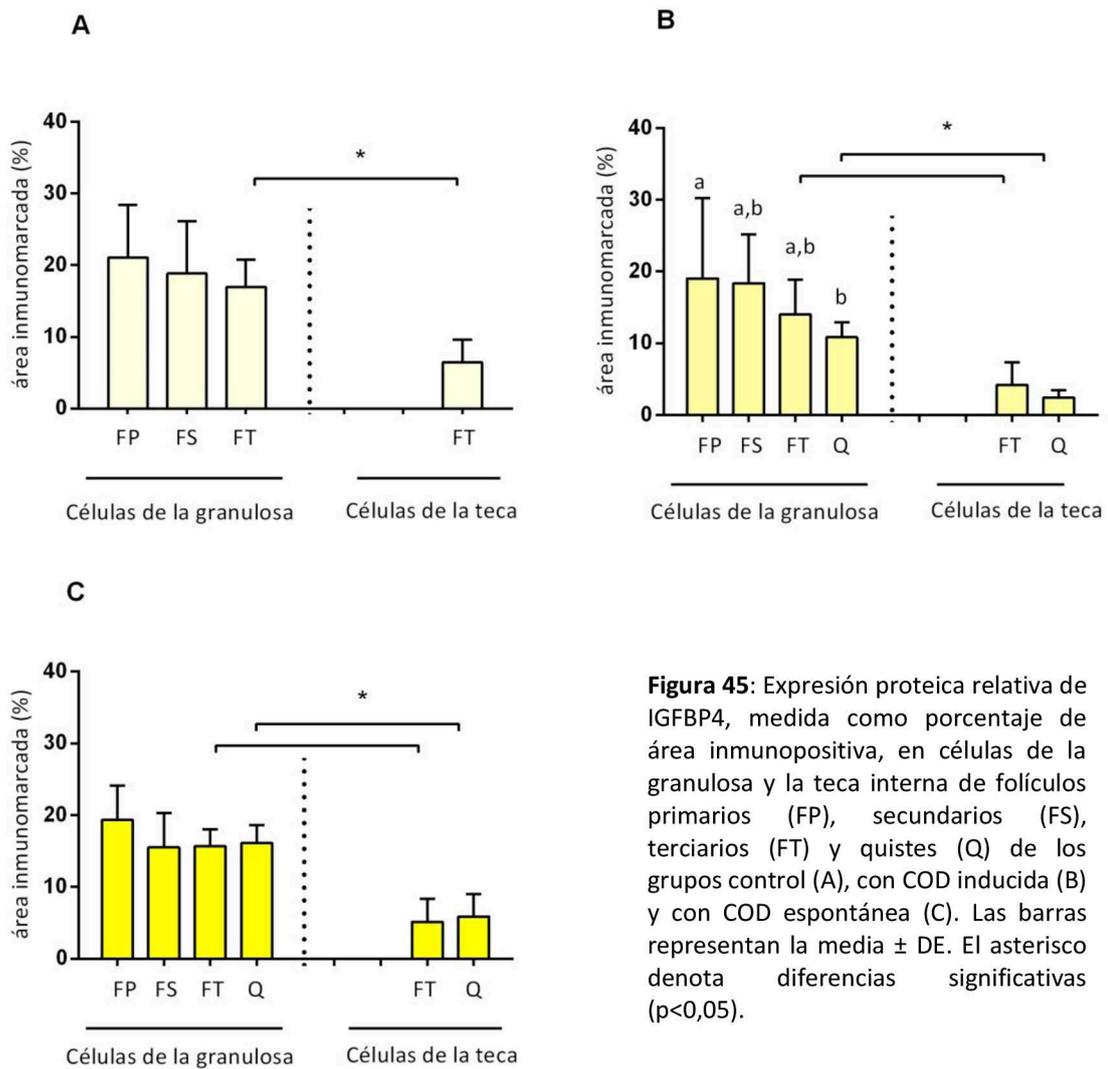


Figura 45: Expresión proteica relativa de IGFBP4, medida como porcentaje de área inmunopositiva, en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C). Las barras representan la media \pm DE. El asterisco denota diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando se realizó la comparación entre estructuras análogas de diferentes grupos se observaron similares niveles de inmunodetección en células de la granulosa en todas las categorías foliculares ($p > 0,05$; Figura 46).

Se observó una disminución de la inmunomarcación de IGFBP4 en quistes inducidos experimentalmente respecto a folículos terciarios controles ($p < 0,05$; Figura 46 y 47). Además, las células de la teca interna de folículos quísticos inducidos con ACTH evidenciaron la menor expresión de IGFBP4 respecto a folículos terciarios de animales controles ($p < 0,05$; Figura 46 y 47).

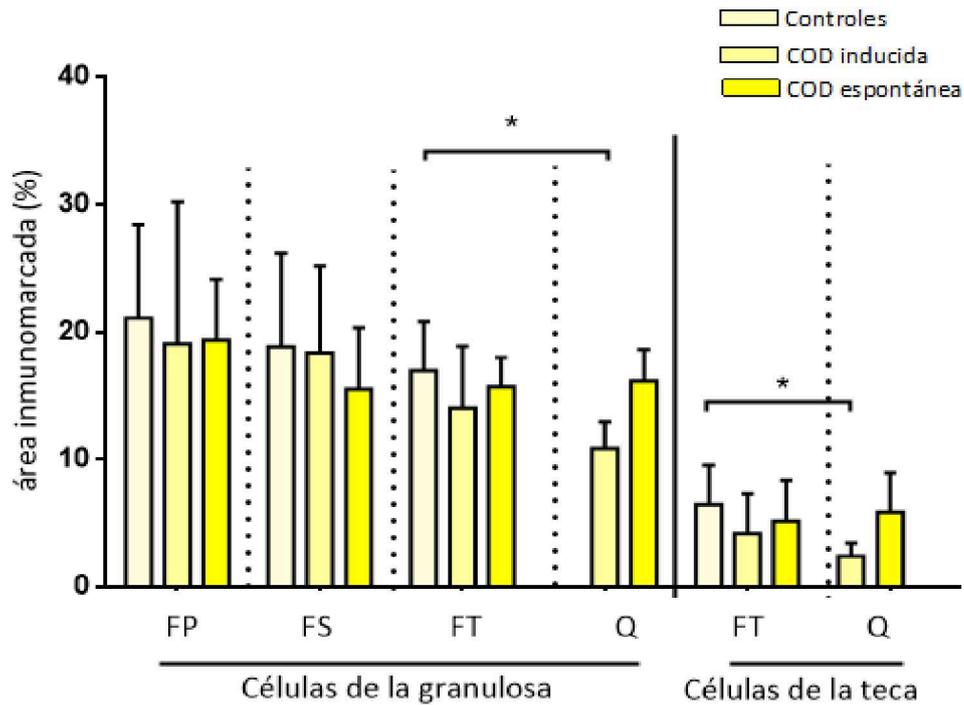


Figura 46: Expresión proteica relativa de IGFBP4 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quísticos (Q) de animales controles, con COD inducida y con COD espontánea. Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras y las barras con asterisco indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

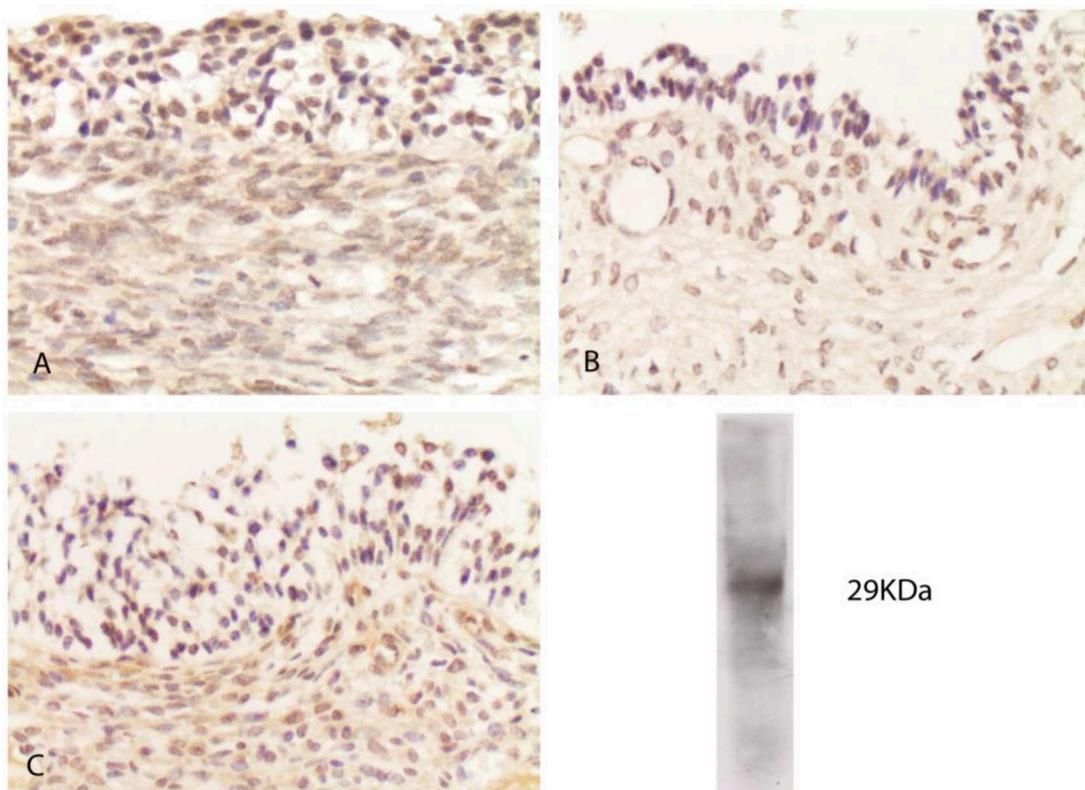


Figura 47: Imágenes representativas en 40X de la inmunomarcación de IGFBP4 en folículos terciarios del grupo control (A), y en folículos quísticos de los grupos con COD inducida con ACTH (B) y con COD

espontánea (C). La especificidad del anticuerpo se analizó por western blot, observándose una banda a 29KDa correspondientes a IGFBP4 glicosilada.

4.3.6 Evaluación de la expresión de IGFBP5

4.3.6.1 Evaluación de IGFBP5 mediante PCR en tiempo real

La expresión génica de IGFBP5 analizada en la pared de folículos terciarios de animales controles y quistes de animales con COD evidenció una expresión génica similar en los diferentes grupos analizados ($p > 0,05$; Figura 48).

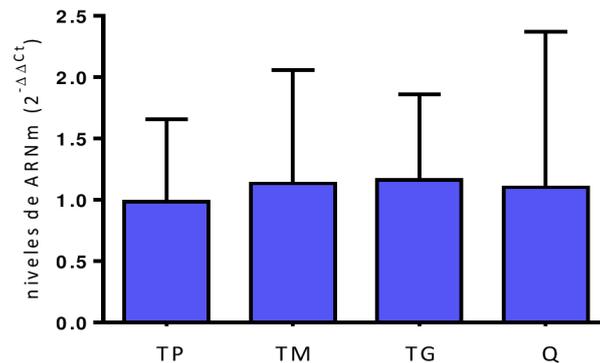


Figura 48: Cuantificación relativa del ARNm de IGFBP5 por PCR en tiempo real en pared completa de folículos controles terciarios pequeños (TP), medianos (TM) y grandes (TG) y en folículos quísticos (Q). Las barras representan como la media de los valores $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm DE$.

4.3.6.2 Caracterización y evaluación de IGFBP5 mediante hibridación in situ

En animales controles se evidenció una disminución en la expresión del ARNm de IGFBP5 en células de la granulosa de folículos terciarios respecto a folículos de menor desarrollo ($p < 0,05$; Figura 49 A). Por otro lado, en animales con COD inducida experimentalmente se evidenció una menor expresión génica de IGFBP5 en células de la granulosa de quistes comparada con folículos primarios y secundarios ($p < 0,05$; Figura 49 B).

En animales con COD espontánea se evidenció la menor marcación en células de la granulosa de folículos quísticos respecto a folículos primarios ($p < 0,05$; Figura 49 C).

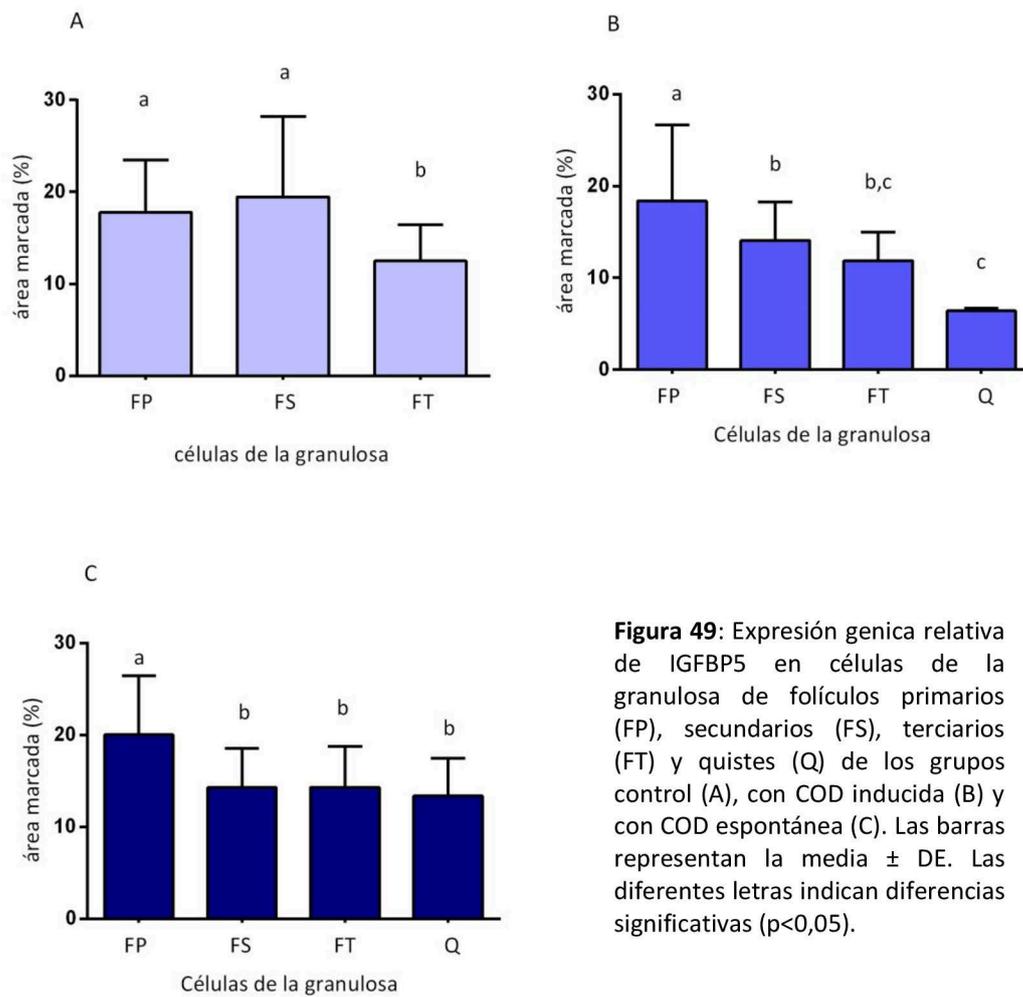


Figura 49: Expresión genica relativa de IGFBP5 en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C). Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando se realizó la comparación entre estructuras análogas de diferentes grupos se evidenció una menor expresión genica en células de la granulosa de quistes inducidos experimentalmente respecto a los quistes espontáneos ($p < 0,05$; Figura 50 y 51). Además, se evidenció una disminución en los quistes inducidos comparados con los folículos terciarios del grupo control ($p < 0,05$; Figura 50 y 51).

La expresión genica de IGFBP5 fue detectada en células de la teca de determinados folículos quísticos y en folículos terciarios los niveles detectados fueron bajos o nulos, por lo que no se pudo realizar la cuantificación (Figura 50 y 51).

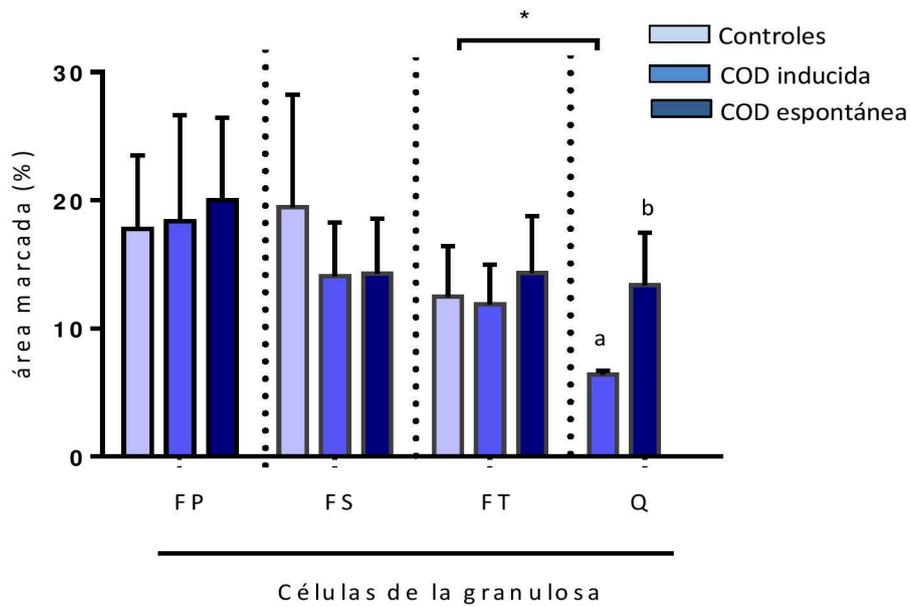


Figura 50: Expresión genica relativa de IGFBP5 por hibridación in situ en células de la granulosa folículos primarios (FP), secundarios (FS) terciarios (FT) y quistes (Q). Las barras representan la media \pm DE. Las diferente letras y las barras con asterisco denotan diferencias significativas.

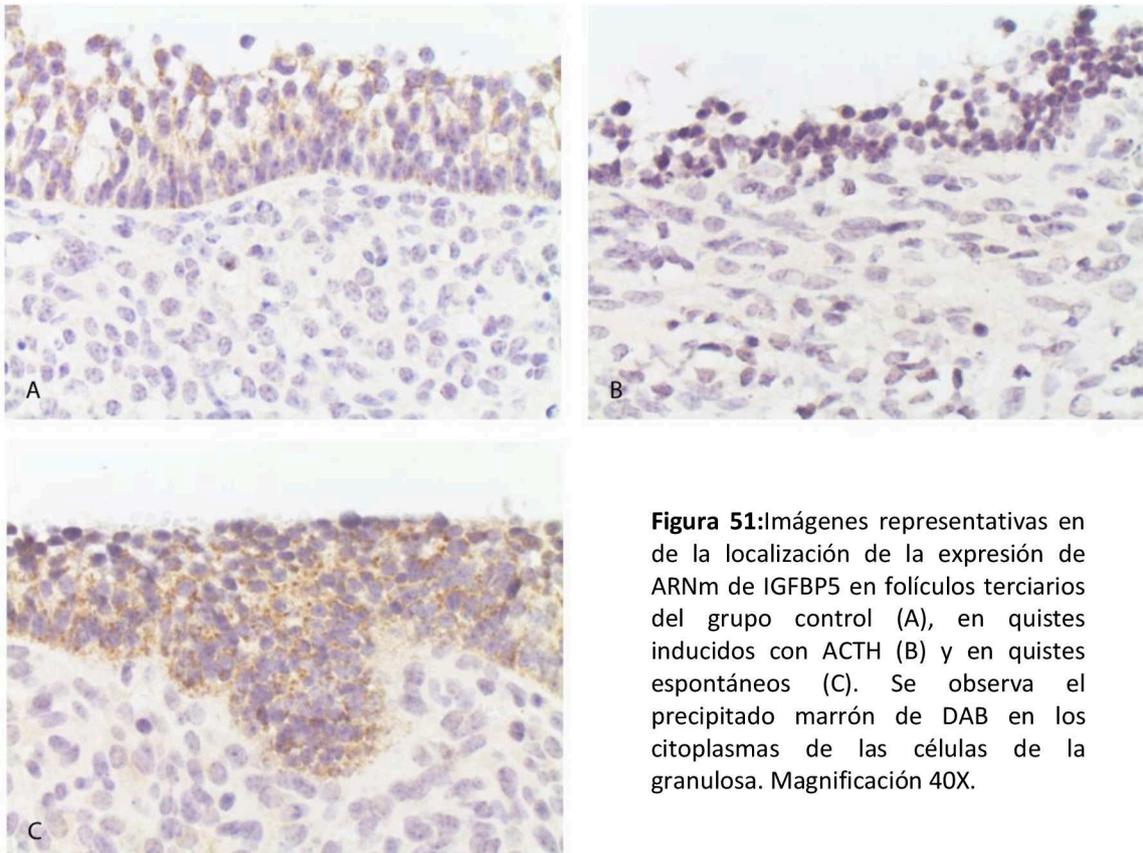


Figura 51: Imágenes representativas en de la localización de la expresión de ARNm de IGFBP5 en folículos terciarios del grupo control (A), en quistes inducidos con ACTH (B) y en quistes espontáneos (C). Se observa el precipitado marrón de DAB en los citoplasmas de las células de la granulosa. Magnificación 40X.

4.3.6.3 Caracterización y evaluación de IGFBP5 mediante inmunohistoquímica

La inmunomarcación de IGFBP5 en células de la granulosa del grupo de animales controles, disminuyó en folículos terciarios en comparación con los folículos primarios ($p < 0,05$; Figura 52 A). Por otro lado, en animales con COD inducida se evidenció una disminución de la marcación específica para IGFBP5 en las células de la granulosa de quistes y folículos terciarios respecto a folículos primarios y secundarios ($p < 0,05$; Figura 52 B). Asimismo, en el grupo de los animales con COD espontánea, las células de la granulosa de los quistes mostraron menor inmunomarcación que los folículos primarios ($p < 0,05$; Figura 52 C).

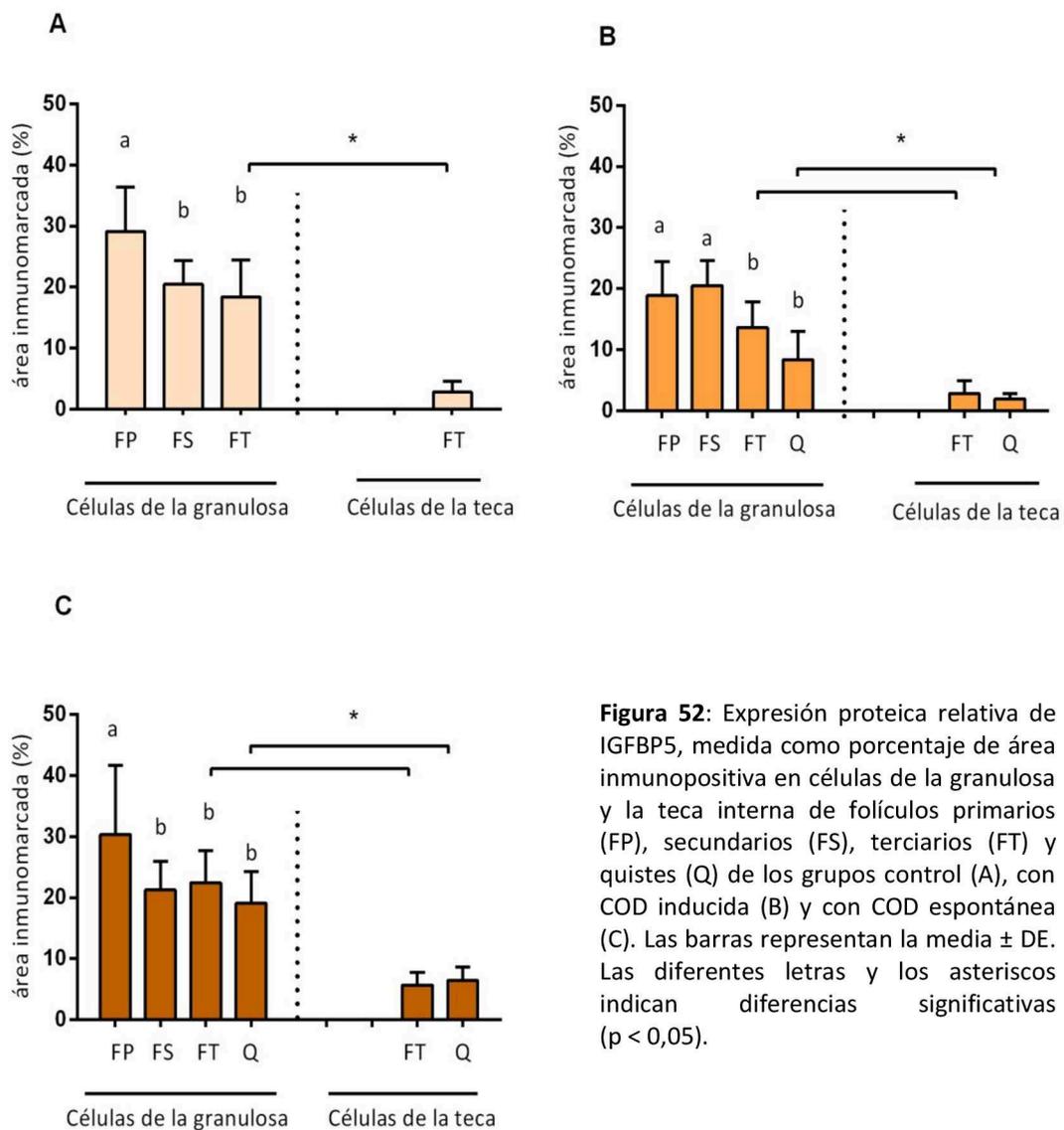


Figura 52: Expresión proteica relativa de IGFBP5, medida como porcentaje de área inmunopositiva en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C). Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras y los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se determinó una mayor expresión en las células de la granulosa en comparación con las células de la teca interna en todos los grupos analizados ($p < 0,05$; Figura 52). En ningún caso se observó diferencias en células de la teca de las categorías foliculares analizadas ($p > 0,05$; Figura 52)

El análisis comparativo entre los diferentes grupos evidenció una disminución en la expresión de IGFBP5 en las células de la granulosa de quistes inducidos experimentalmente respecto a quistes espontáneos ($p < 0,05$; Figura 53 y 54). A su vez, las células de la granulosa de los quistes inducidos mostraron una disminución en la expresión de esta proteína respecto a los folículos terciarios controles ($p < 0,05$; Figura 53 y 54).

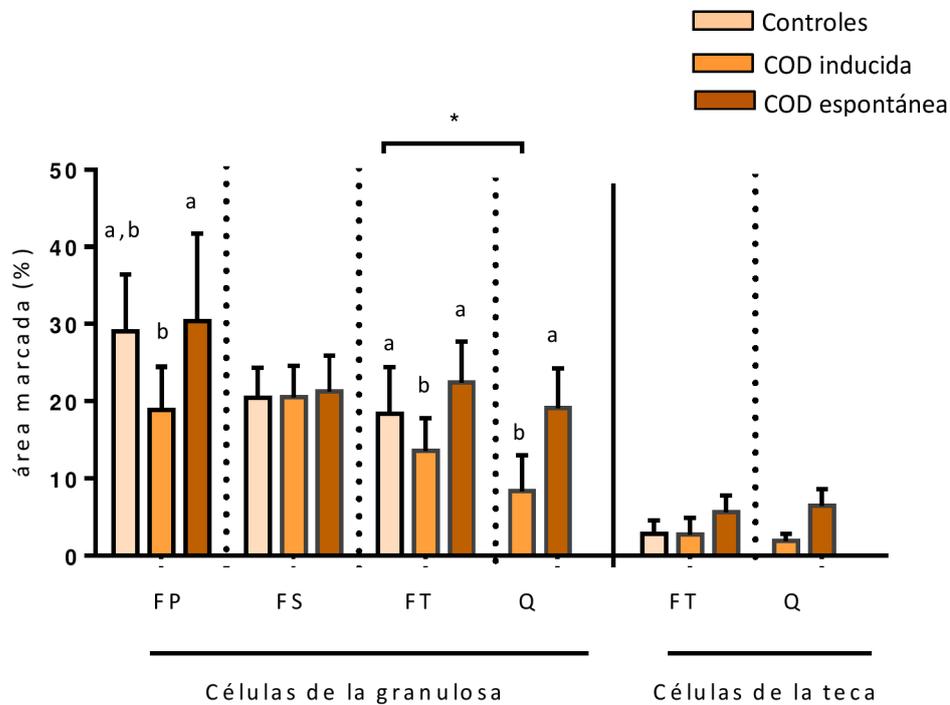


Figura 53: Expresión proteica relativa de IGFBP5 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quísticos (Q) de los animales controles, con COD inducida y con COD espontánea. Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras y las barras con asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

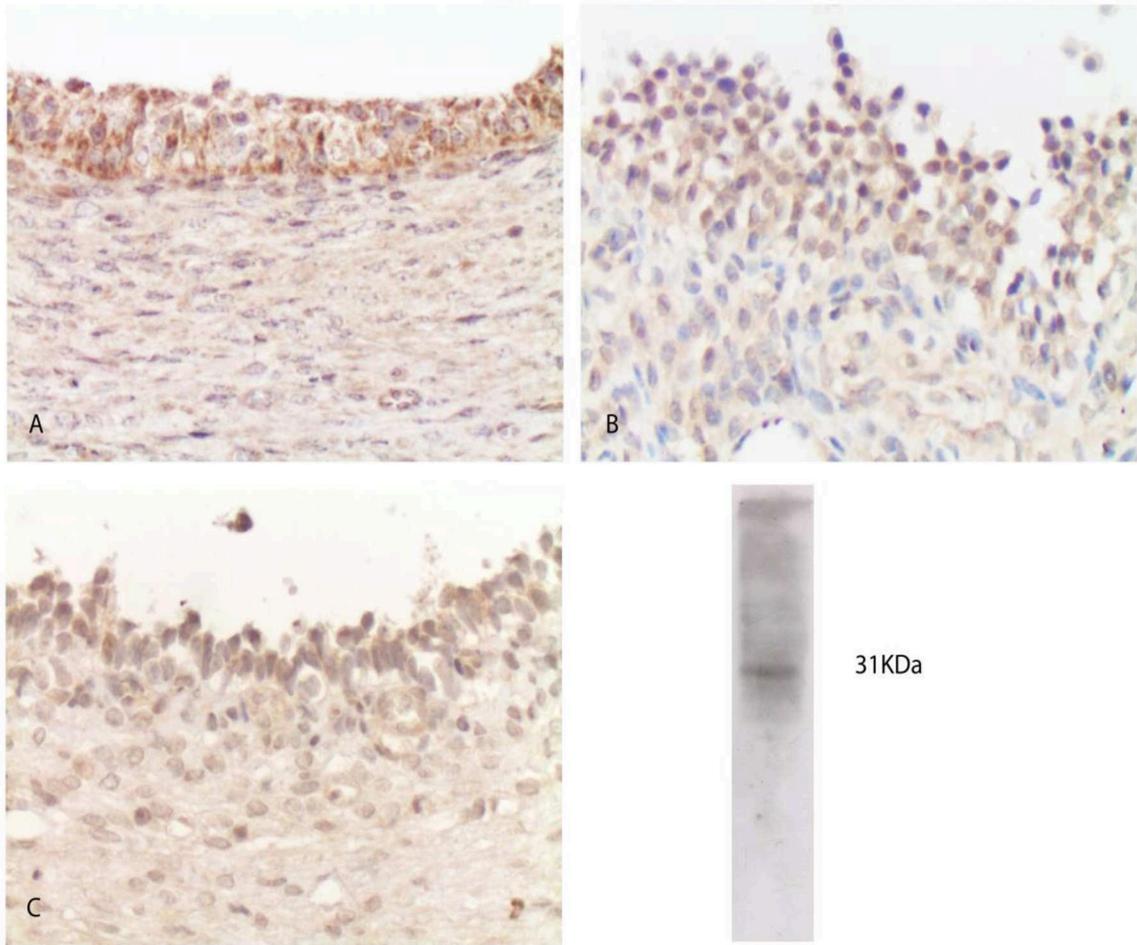


Figura 54: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IGFBP5 en folículos terciarios del grupo control (A), en folículos quísticos de los grupos con COD inducida con ACTH (B) y en folículos quísticos del grupo con la COD espontánea (C). Magnificación 40X. La especificidad del anticuerpo se evaluó por western blot, observándose una banda a 31KDa correspondientes a IGFBP5.

4.3.7 Evaluación de la expresión de IGFBP6

4.3.7.1 Evaluación de IGFBP6 mediante PCR en tiempo real

La expresión génica de IGFBP6 analizada en la pared de folículos provenientes de ovarios de animales controles y con quistes evidenció niveles similares para todas las estructuras analizadas ($p > 0,05$; Figura 55).

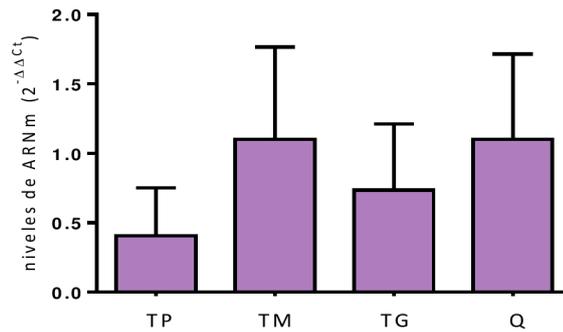


Figura 55: Cuantificación relativa del ARNm de IGFBP6 por PCR en tiempo real en pared completa de folículos controles terciarios pequeños (TP), medianos (TM) y grandes (TG) y en folículos quísticos (Q). Las barras representan como la media de los valores $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm DE$.

4.3.7.2 Caracterización y evaluación de IGFBP6 mediante hibridación in situ

La expresión del ARNm de IGFBP6 no se observó en ninguna categoría folicular de los diferentes grupos estudiados.

4.3.7.3 Caracterización y evaluación de IGFBP6 mediante inmunohistoquímica

Los animales del grupo control evidenciaron marcación similar en células de la granulosa de todas las estructuras analizadas ($p > 0,05$; Figura 56 A). Por otro lado, se evidenció mayor expresión de IGFBP6 en células de la granulosa de quistes y folículos terciarios respecto a folículos en el menor estadio de desarrollo en animales con COD inducida ($p < 0,05$; Figura 56 B). En animales con COD espontánea se determinó que los folículos primarios expresaron los menores niveles de IGFBP6 en células de la granulosa ($p < 0,05$; Figura 56 C).

Al comparar estructuras análogas de diferentes grupos se observó la mayor inmunomarcación para IGFBP6 en estructuras correspondientes a animales con COD espontánea (Figura 57 y 58). Además, se evidenció una mayor expresión de IGFBP6 en células de la granulosa de quistes respecto de los folículos terciarios controles ($p < 0,05$; Figura 57 y 58).

Las células de la teca presentaron ausencia de marcación específica (Figura 58).

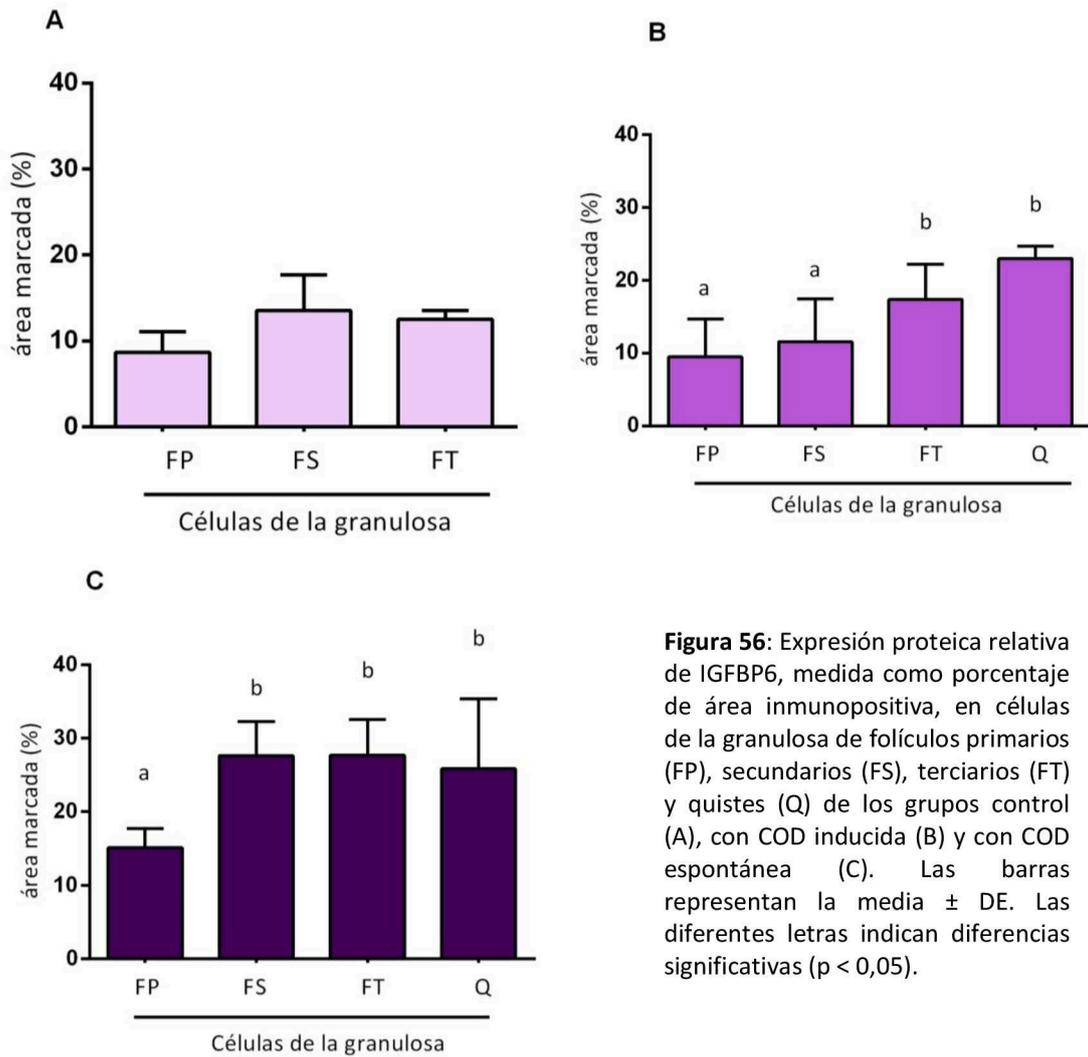


Figura 56: Expresión proteica relativa de IGFBP6, medida como porcentaje de área inmunopositiva, en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C). Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

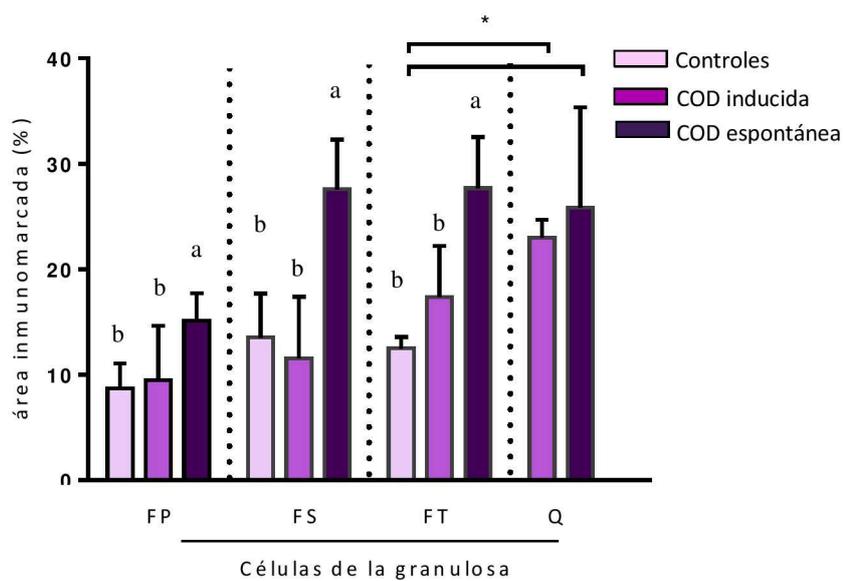


Figura 57: Expresión proteica relativa de IGFBP6 en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quísticos (Q) de los animales controles, con COD inducida y con COD

espontánea. Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras y las barras con asterisco denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

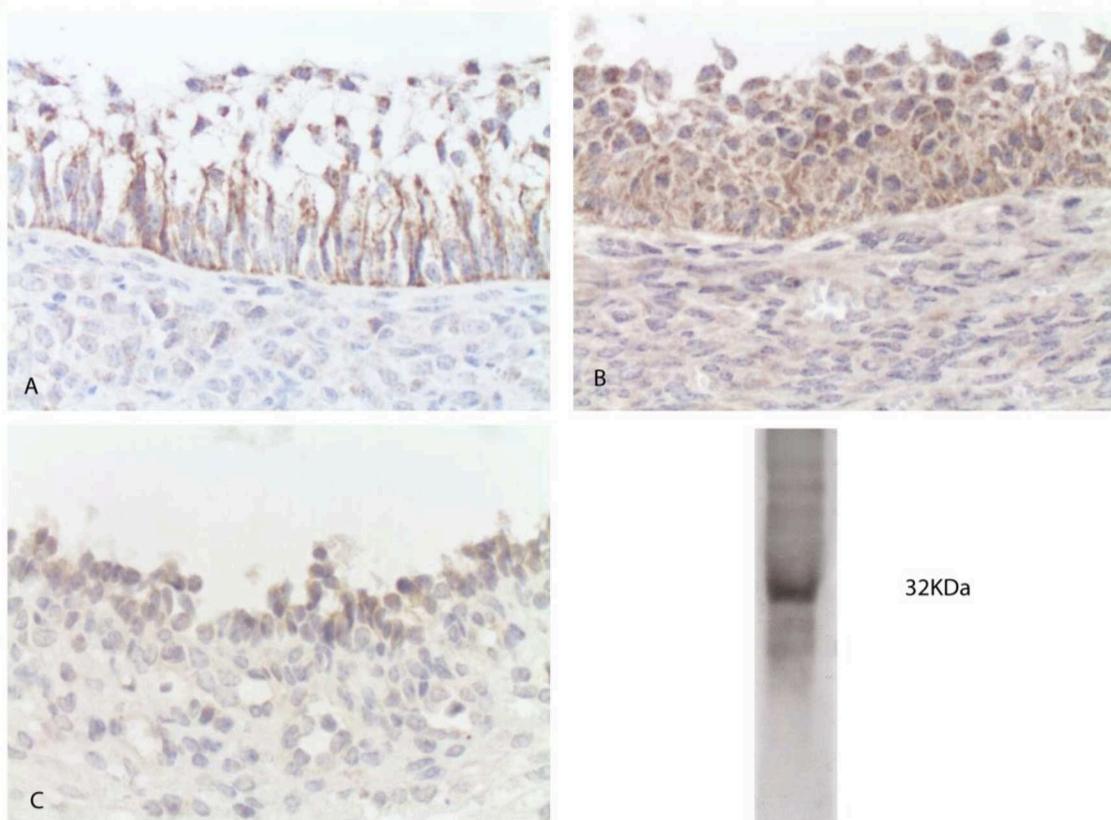


Figura 58: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IGFBP6 en folículos terciarios del grupo control (A), en folículos terciarios (B) y quísticos de los grupos con COD inducida con ACTH (C). Magnificación 40X. La especificidad del anticuerpo se determinó por western blot, detectando una banda a 32KDa correspondientes a IGFBP6.

4.3.8 Evaluación de la expresión del IGFR tipo 1

4.3.8.1 Evaluación de IGFR tipo 1 mediante PCR en tiempo real.

La expresión génica de IGFR1 analizada en células de la granulosa y de la teca de folículos provenientes de animales controles y con quistes evidenció una disminución en células de la granulosa de quistes comparados con los folículos terciarios controles de mayor tamaño ($p < 0,05$; Figura 59).

En las células de la teca la expresión del receptor fue similar en las estructuras foliculares evaluadas ($p > 0,05$; Figura 59).

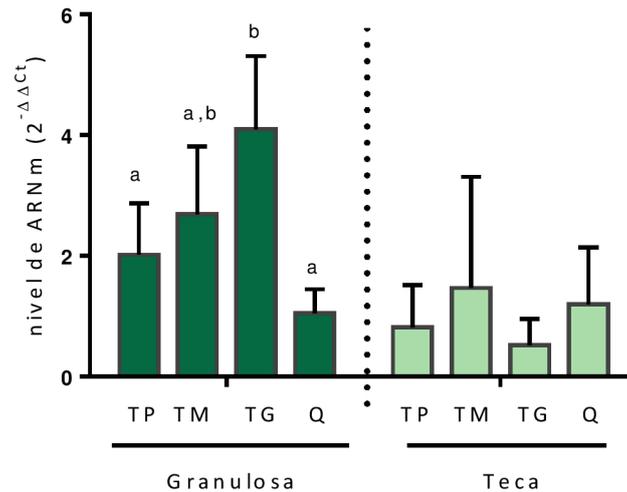


Figura 59: Cuantificación relativa del ARNm de IGFR1 por PCR en tiempo real en células de la granulosa y de la teca de folículos control terciarios pequeños (TP), medianos (TM) y grandes (TG) y en folículos quísticos (Q). Las barras representan la media de los valores $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm DE$. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.3.8.2 Caracterización y evaluación de IGFR tipo 1 mediante inmunohistoquímica.

Se realizó el análisis de la expresión del receptor para los animales del grupo control y animales con COD. En las células de la granulosa de folículos terciarios de animales control se evidenció un aumento en la expresión del receptor respecto a los folículos de menor desarrollo ($p < 0,05$; Figura 60 A). En animales con la COD inducida se detectaron niveles de expresión del receptor similares en células de la granulosa de folículos terciarios de mayor tamaño y quistes que, a su vez, fueron superiores en relación a folículos de menor grado de desarrollo ($p < 0,05$; Figura 60 B). Del mismo modo, las células de la granulosa de los folículos terciarios de animales con COD espontánea presentaron mayor expresión de IGFR1 que aquellos con menor desarrollo, siendo los quistes las estructuras con la mayor expresión respecto a las restantes estructuras analizadas en el grupo ($p < 0,05$; Figura 60 C).

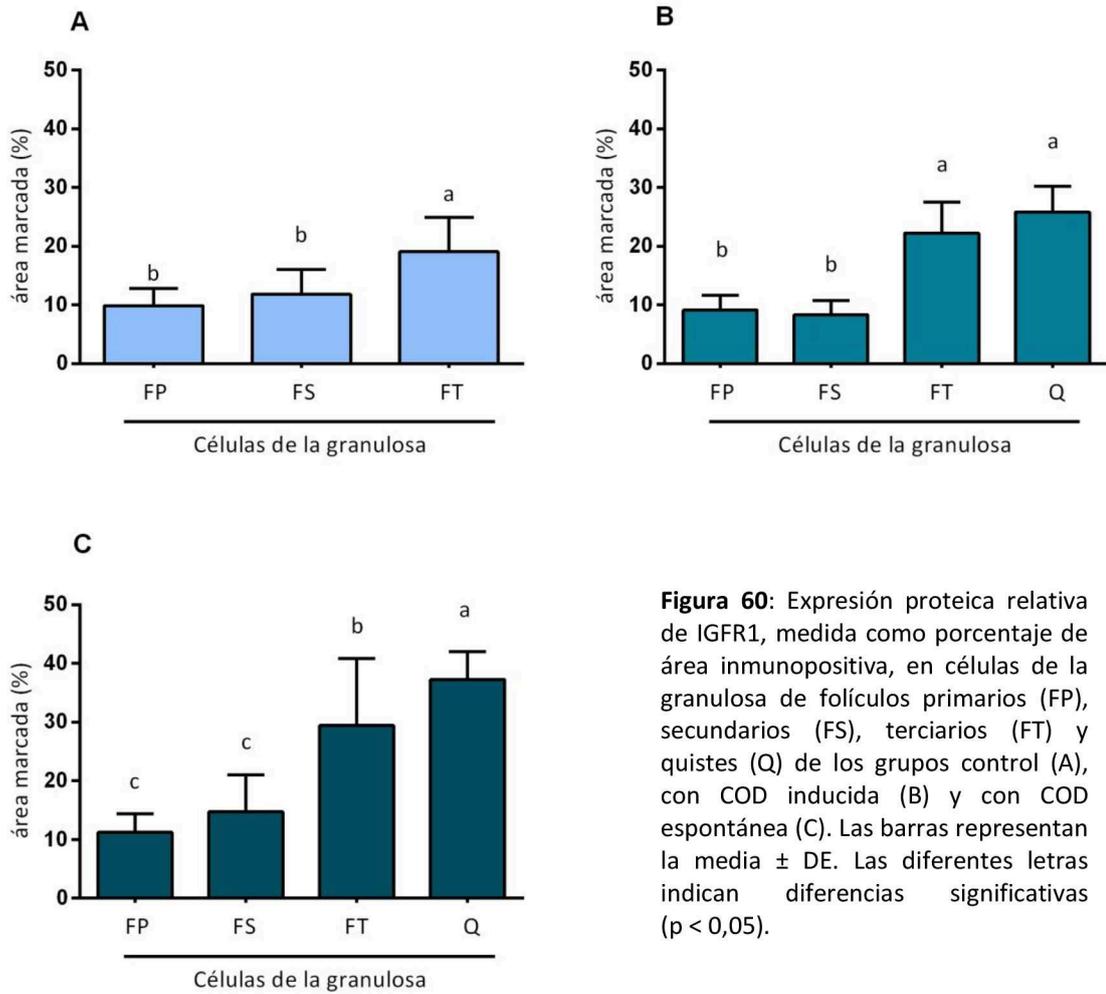


Figura 60: Expresión proteica relativa de IGFR1, medida como porcentaje de área inmunopositiva, en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quistes (Q) de los grupos control (A), con COD inducida (B) y con COD espontánea (C). Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

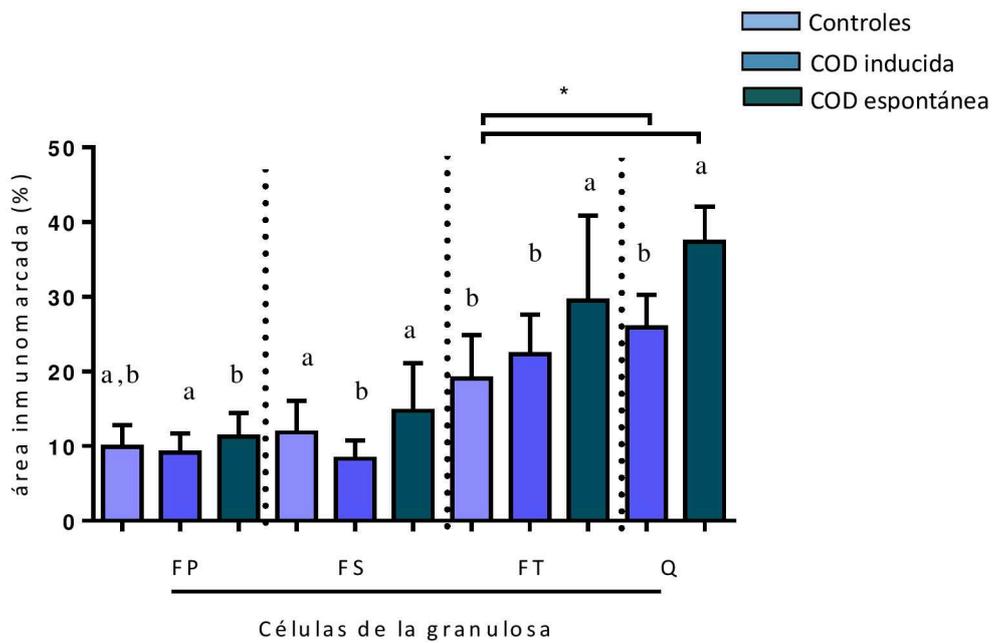


Figura 61: Expresión proteica relativa del IGFR1 en células de la granulosa de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y quísticos (Q) de los animales controles, con COD inducida y con COD

espontánea. Las barras representan la media \pm DS. Las diferentes letras y la barra con el asterisco indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

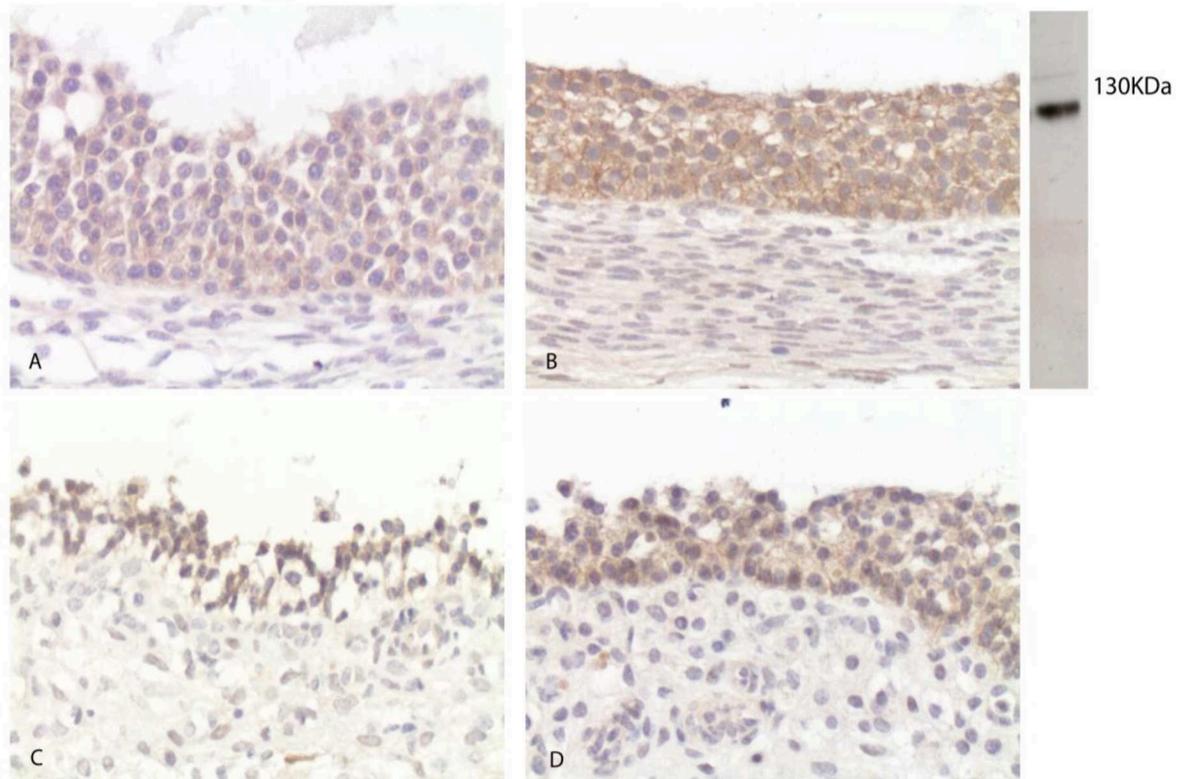


Figura 62: Imágenes representativas de la inmunomarcación de IGFR1 en folículos terciarios del grupo control (A), folículos terciarios del grupo con COD espontánea (B) y quistes de los grupos con COD inducida con ACTH (C) y con COD espontánea (D). Magnificación 40X. La especificidad del anticuerpo se determinó por western blot, detectando una banda a 130KDa correspondientes a IGFR1

La comparación entre estructuras análogas de diferentes grupos evidenció un aumento en la expresión del receptor en células de la granulosa de quistes espontáneos con respecto a los folículos terciarios del grupo control y terciarios con COD inducida ($p < 0,05$; Figura 61 y 62). Por otro lado, se observó un aumento en la expresión del IGFR1 en la granulosa de las estructuras foliculares de animales con COD espontánea comparada con las estructuras de los animales con COD inducida ($p < 0,05$; Figura 61 y 62).

Las células de la teca presentaron ausencia de marcación específica para IGFR1 (Figura 62).

4.3.9 Evaluación de la expresión de la enzima PAPP-A

4.3.9.1 Expresión del ARNm de PAPP-A mediante PCR en tiempo real

La expresión de ARNm para PAPP-A fue detectada en células de la granulosa de folículos quísticos y folículos terciarios grandes del grupo control, determinándose la ausencia de expresión en folículos terciarios pequeños y medianos. Además, se determinó una ausencia de expresión en células de la teca en los grupos analizados (Figura 63). Los niveles detectados en células de la granulosa fueron menores en quistes comparados con folículos terciarios grandes (Figura 63).

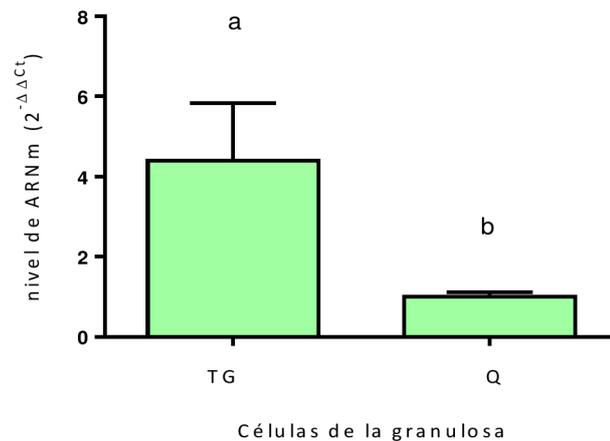


Figura 63: Cuantificación relativa del ARNm de PAPP-A por PCR en tiempo real en células de la granulosa de folículos control terciarios grandes (TG) y en folículos quísticos (Q). Las barras representan la media de los valores $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm DE$. Las barras con diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.3.9.2 Expresión de PAPP-A analizada mediante western blot

La detección de la PAPP-A secretada fue evaluada mediante western blot en muestras de LF provenientes de animales control y con COD espontánea (Figura 64).

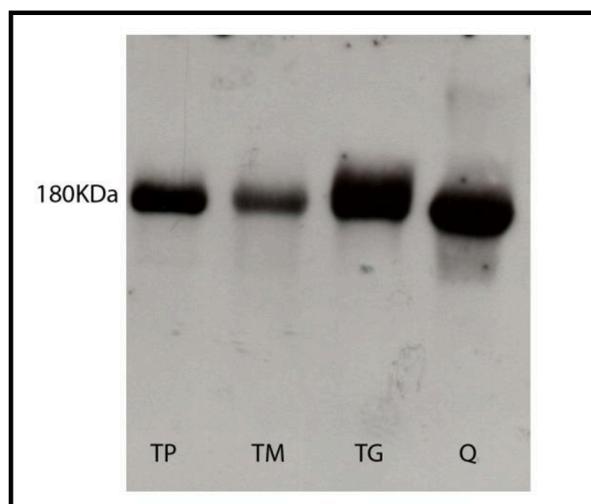


Figura 64: Imagen representativa del western blot que muestra la PAPP-A a 181KDa en folículos terciarios pequeños (TP), medianos (TM), grandes (TG) y quistes (Q).

Se observó un aumento en la inmunomarcación de la PAPP-A en líquido folicular de quistes respecto a folículos terciarios pequeños y medianos del grupo control ($p < 0,05$; Figura 65).

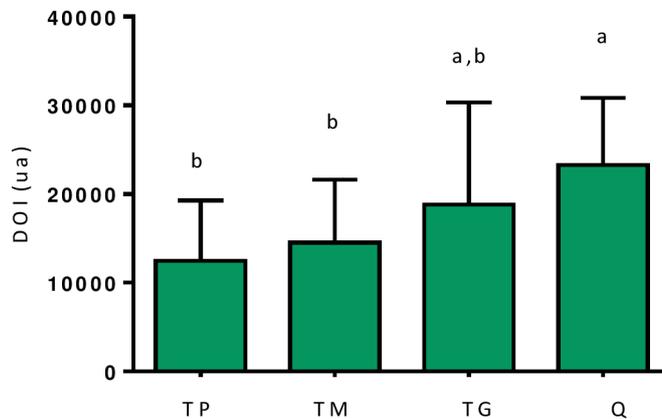


Figura 65: Detección de PAPP-A mediante western blot en líquido folicular proveniente de folículos controles terciarios pequeños (TP), medianos (TM) y grandes (TG) y en folículos quísticos (Q). Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.4 Evaluación de la actividad de las IGFBPs

El contenido de las IGFBPs activas presentes en el LF fue identificado mediante western ligand blot. Se detectaron según los PM y se identificaron bandas para IGFBP2 a 34 KDa, una doble banda en 40 y 44 KDa correspondiente a IGFBP3, una de 24 KDa y otra de 29 KDa para IGFBP4 no glicosilada y glicosilada respectivamente, y por último, para IGFBP5 se determinó una banda a 31KDa (Figura 66).

Los resultados de la cuantificación de los niveles presentes en LF de IGFBPs activas se observan en la figura 67. Se observó que los niveles de IGFBP2 y 3 fueron los más elevados en todas las estructuras analizadas. Los niveles de IGFBP2 permanecieron constantes en el LF de los diferentes folículos evaluados ($p > 0,05$). Para IGFBP3 se observaron niveles superiores en folículos quísticos respecto a los folículos terciarios pequeños ($p < 0,05$). En contraste, la IGFBP5 y la forma glicosilada de IGFBP4 mostraron niveles mayores en folículos terciarios pequeños que en folículos terciarios grandes y quísticos ($p < 0,05$). Los niveles de la forma no glicosilada de IGFBP4 fueron similares en las diferentes estructuras analizadas ($p > 0,05$).

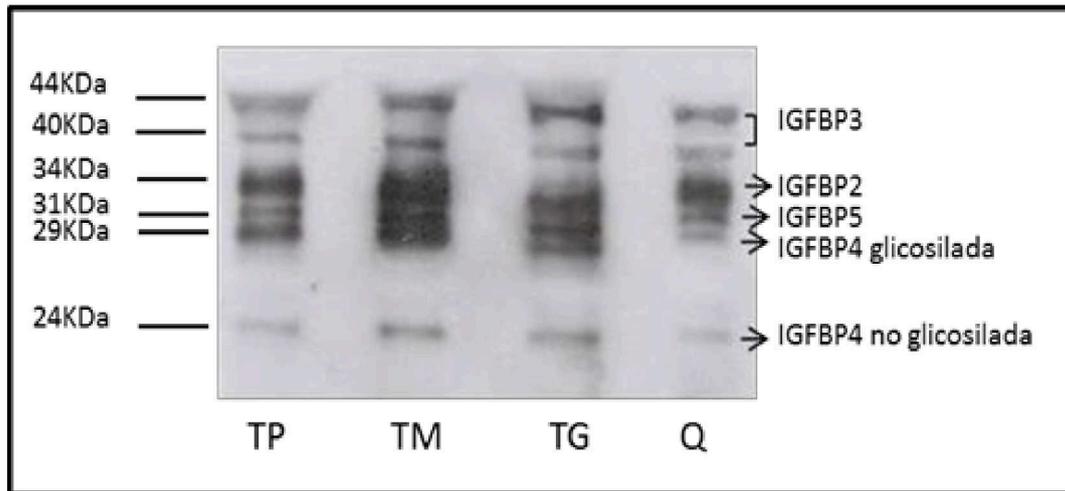


Figura 66: Imagen representativa del western ligand blot que muestra las IGFBPs unidas a IGF1 biotinilado. Se determinaron según el peso molecular: IGFBP2 (34KDa), IGFBP3 (40-44KDa) IGFBP4 no glicosilada (24KDa), IGFBP4 glicosilada (29KDa) y IGFBP5 (31KDa).

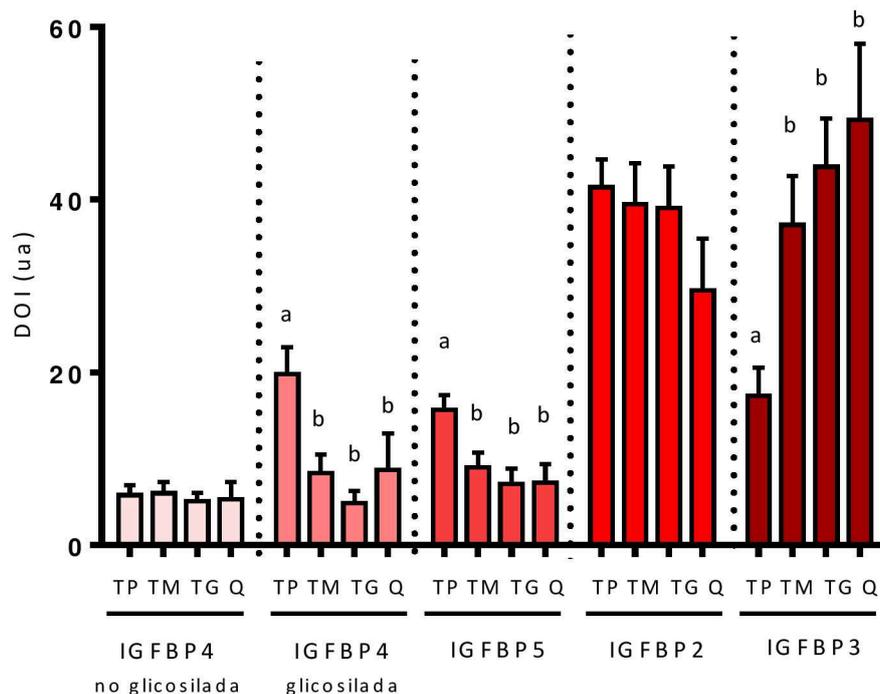


Figura 67: Cuantificación de las IGFBPs en líquido folicular por western ligand blot en folículos terciarios pequeños (TP), medianos (TM), grandes (TG) y quistes (Q). Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.5 Cultivos celulares. Ensayos preliminares.

La utilización de cultivos celulares en esta tesis se planteó para el estudio de la modulación de la producción de IGF1 como consecuencia de diferentes estímulos

hormonales (LH, FSH, insulina y 17β -estradiol). Para ello, inicialmente se deben optimizar las condiciones de cultivo con medios libres en su formulación de estos componentes para luego analizar las posibles modificaciones en los patrones de expresión proteica y de ARNm de IGF1 como respuesta a estímulos hormonales sobre poblaciones celulares provenientes de folículos ováricos de animales controles y con COD. De esta manera, caracterizar diferencias entre animales controles y con COD que aportarían información relevante para la comprensión de los procesos involucrados en la síntesis y secreción de IGF en el contexto de la enfermedad e inferir sobre potenciales acciones sobre la funcionalidad ovárica y mecanismos de su regulación.

4.5.1 Ensayo de medios de cultivo para células de la granulosa

El recuento de células sembradas en diferentes medios: DMEM:F12 y suplementado con FHS e insulina (FSH-I), con Insulina- Transferrina- Selenio (ITS), con Selenio- Transferrina (Se-T) y sin suplementos (Negativo), mostró una relación de recuento a diferentes tiempo (R) 2 veces mayor para las células cultivadas en un medio suplementado con selenio y transferrina (Figura 68, tabla 6).

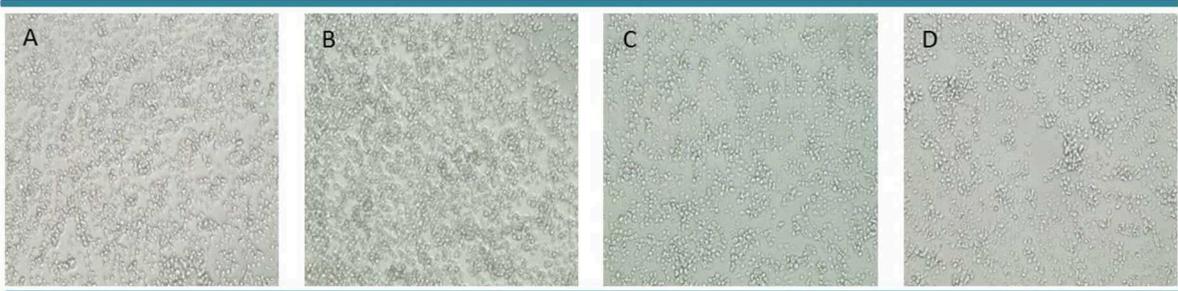


Figura 68: Fotografías en microscopio invertido de las células sembradas con DMEM:F12 y suplementado con FHS e insulina (A), con insulina- transferrina- selenio (B), con selenio- transferrina (C) y sin suplementos (D) a las 72 horas de cultivo. Magnificación 40X.

Tabla 6: Recuento de las células sembradas

Medio suplementado	Recuento 24h (cél/ ml)	Recuento 72h (cél/ ml)	R: rcto 72h/rcto24h
FSH-I	265.000	770.000	3
ITS	520.000	1.560.000	3
Se-T	315.000	1.580.000	5
Negativo	140.000	-	-

La relación de estrógenos/ progesterona fue mayor para el medio suplementado con ITS en cultivos cortos, en cambio a largo plazo los mejores resultados se observaron además del suplementado con ITS, en los suplementados con selenio-transferrina y sin suplementos (Figura 69).

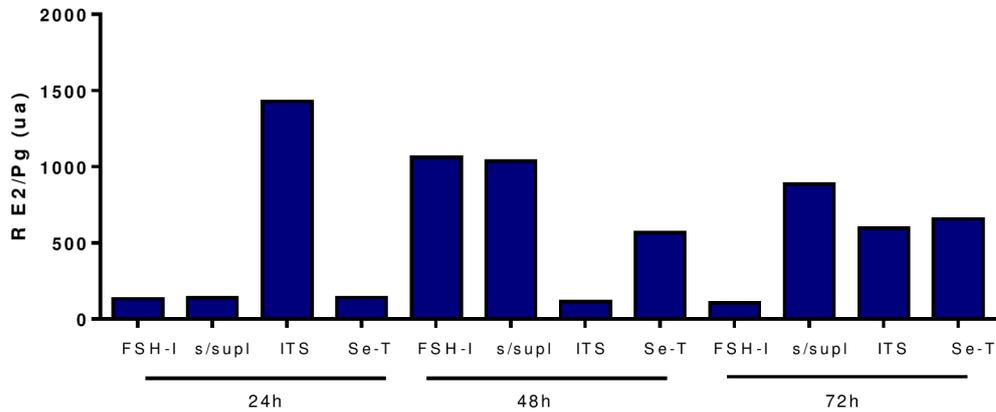


Figura 69: Relación estrógenos/progesterona correspondientes al medio de cultivo con diferentes suplementos obtenidos a diferentes tiempos.

Los resultados por PCR en tiempo real evidenciaron una mayor expresión de CYP19 en el medio suplementado con selenio-transferrina y el suplementado con ITS a las 24 h (Figura 70).

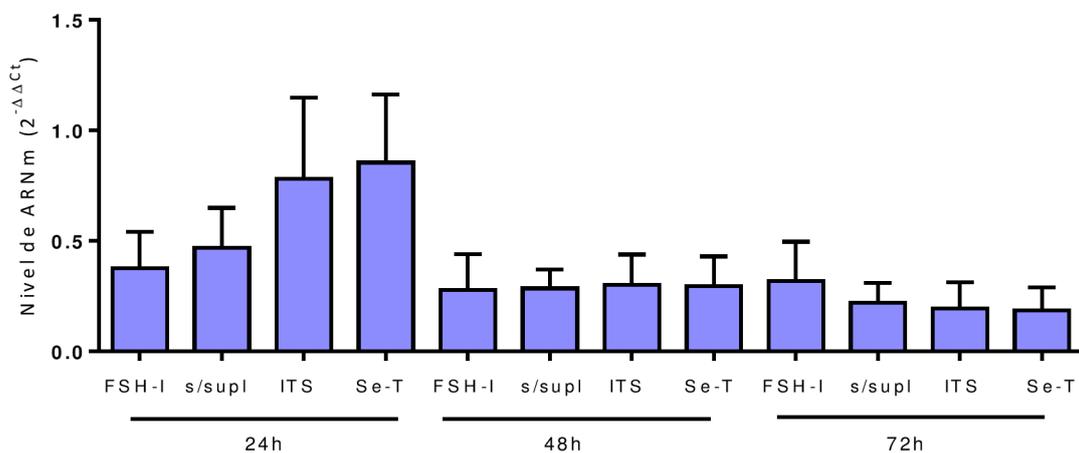


Figura 70: Medición de CYP19 en células de la granulosa cultivadas en medio de cultivo con distintos suplementos obtenidos a diferentes tiempos. Se graficó la media con el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.5.2 Ensayo de número de células a sembrar

Los resultados del ensayo donde se sembraron entre 10.000 y 50.000 células vivas por pocillo en dos tiempos diferentes (48 y 72 h), evidenciaron una relación estrógenos/ progesterona superior para los pocillos correspondientes a 10.000 células

sembradas (tabla 7). Además, esta relación se mantuvo constante con el tiempo, concluyendo que sería el número de células a sembrar de elección para futuros ensayos.

Tabla 7: Relación estrógenos/ progesterona para las diferentes concentraciones de células sembradas por pocillo.

<i>Muestra</i>	<i>E2/Pg</i>
10.000 48hs	21,04
20.000 48hs	8,85
30.000 48hs	8,46
40.000 48hs	8,92
50.000 48hs	7,43
10.000 72hs	21,58
20.000 72hs	8,05
30.000 72hs	9,56
40.000 72hs	7,48
50.000 72hs	9,65

4.5.2 Estímulo in vitro con LH de las células de la teca

Se utilizaron folículos de ovarios provenientes de frigorífico. Se realizó un ensayo de estímulo con LH de las células de la teca cultivadas in vitro (Figura 71).

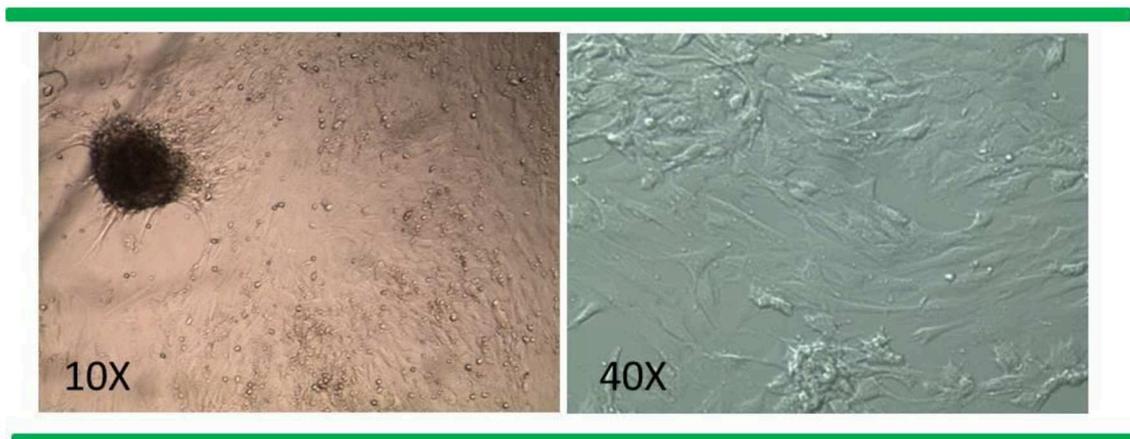


Figura 71: Fotografías en microscopio invertido de las células de la teca sembradas con DMEM:F12 y estimuladas con LH a las 12 h.

Los resultados de los niveles relativos de CYP17a1 en un único ensayo, podrían evidenciar que a pesar que el medio sin estímulos permitió la mayor expresión de CYP17a1 a las 12 h en las células de la teca, el estímulo de LH 100ng/ml a las 24h tendría el mayor efecto (Figura 72).

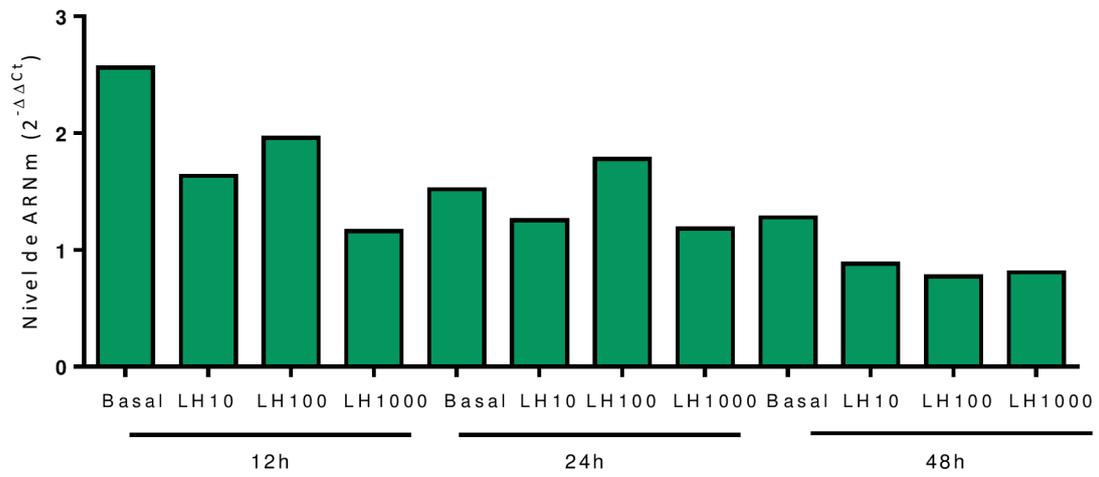


Figura 72: Medición de CYP17a1 en células de la teca cultivadas en medio de cultivo con distintos estímulos de LH obtenidas a diferentes tiempos. Se graficó la media con el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

DISCUSIÓN



5.1 Inducción experimental de la enfermedad quística ovárica. Relación con los hallazgos en la enfermedad manifestada espontáneamente en bovinos.

La enfermedad quística ovárica y los folículos persistentes asociados se encuentran involucrados en la disminución de la fertilidad del ganado bovino de leche (Roth y col., 2012). Existe consenso en el hecho de que los quistes se desarrollan a partir de folículos preovulatorios que fallan al ovular, persisten en el ovario e interfieren de esta manera con la funcionalidad ovárica normal (Vanholder y col., 2006). Diferentes estudios demostraron que el desarrollo de los quistes está asociado a un desbalance en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Silvia y col., 2002; Hatler y col., 2003). El estudio de la etiopatogenia de la COD en estos animales posee algunas limitaciones como el inconveniente de determinar el tiempo de permanencia de los quistes al momento de su diagnóstico. Además, las circunstancias que afectan la función del ovario al momento del diagnóstico pueden ser diferentes de las que prevalecían al momento de la formación del quiste. Por otro lado, son escasas las posibilidades de conocer y seguir los casos clínicos por un largo período debido a que los productores requieren de tratamientos inmediatos para sus animales (Ribadu y col., 2000, Probo y col., 2011, Roth y col., 2012).

Para lograr un correcto estudio, se han utilizado diversos modelos experimentales de inducción de quistes foliculares mediante diferentes tratamientos. Entre ellos se describen combinaciones de progesterona y estrógenos (Erb y col., 1973; Winters y col., 1986; Cook y col., 1991; Hamilton y col., 1995), estrógenos (Wiltbank, 1966; Nadaraja y Hansel, 1976; Carrie're y col., 1995), testosterona (Fathala y col., 1978), antisuero contra LH bovino (Nadaraja y Hansel, 1976) y administración de ACTH (Liptrap y Mc Nally, 1976; Refsal y col., 1987; Kawate y col., 1996). En la presente tesis, el modelo seleccionado para el desarrollo de quistes foliculares bovinos fue el de inducción con ACTH. El tratamiento con esta hormona estimula al eje hipotálamo-hipofisario-adrenal provocando importantes cambios en la actividad folicular ovárica. Probablemente dichas modificaciones sean causadas por una interrupción en la secreción pulsátil normal de la LH que conduce a una reducida aunque prolongada secreción de 17β -estradiol capaz de inhibir el pico de LH por retroalimentación negativa (Dobson et al., 2000). En un trabajo previo se logró realizar un seguimiento por ultrasonografía y palpación rectal en bovinos identificados con COD, y así detectar

el desarrollo de quistes (Ortega y col., 2008; Amweg y col., 2013). Así, el modelo experimental utilizado para la inducción de quistes con ACTH, permitió en esta tesis obtener quistes foliculares de animales en los que se conoce el tiempo de emergencia del quiste y lograr un análisis más exacto de su estructura y función.

5.2 Análisis de los niveles hormonales en animales con la enfermedad inducida y los detectados en forma espontánea.

Al momento de la ovariectomía se midieron los niveles de hormonas esteroides en suero de animales controles y animales con COD y en LF de los folículos preovulatorios (controles) y quistes. El patrón entre los niveles séricos e intrafoliculares de 17 β -estradiol y progesterona en animales controles como en los animales con COD, fueron similares. Si bien no se hallaron diferencias en las concentraciones intrafoliculares de 17 β -estradiol entre los distintos grupos analizados, se observó una tendencia a disminuir en los animales con quistes. Esta disminución de 17 β -estradiol y los altos niveles de testosterona detectados podrían relacionarse con las modificaciones detectadas a nivel histológico (Salveti y col., 2010). Se conoce que a medida que los folículos persisten en el tiempo, se pierden numerosas células de la granulosa y, las remanentes cambian o pierden la capacidad de producir determinadas hormonas. Las células encargadas de transformar los andrógenos provenientes de la teca interna en estrógenos, mediante un proceso de aromatización, son las células de la granulosa (Hafez y Hafez, 2000). En este sentido, sería comprensible que el LF de los quistes contenga menores niveles de 17 β -estradiol y mayores niveles de testosterona que los folículos del grupo control debido que a medida que aumenta la persistencia de los folículos se incrementa la pérdida de las células de la granulosa y por lo tanto, la posibilidad de aromatización de los andrógenos. Además, considerando que los quistes espontáneos podrían tener una persistencia superior a la de los quistes inducidos, se justificaría la detección de una concentración de testosterona aún mayor en dicha categoría. Diferentes autores describieron que el 17 β -estradiol permanece aumentado hasta el día 30 de la persistencia folicular, y propusieron que esta hormona, junto con la inhibina, ejerce una fuerte retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH (Baird y col., 1991), impidiendo que se inicie una nueva onda de crecimiento folicular (Dobson y col., 2000). Por lo tanto, el menor nivel de 17 β -

estradiol estaría relacionado además, a la disminución del número de receptores de LH y una baja actividad aromatasa como consecuencia de una menor cantidad de células de la granulosa al momento de la obtención de los ovarios.

Si bien los niveles séricos de progesterona en animales con COD fueron menores que en animales controles, se mantuvieron niveles subluteales en ambas poblaciones estudiadas. Estos resultados junto a las concentraciones de 17β -estradiol, podrían reflejar la ausencia de luteinización y la persistencia del folículo sin llegar a la ovulación (Amweg y col., 2013).

5.3 Análisis de los componentes del sistema IGF

5.3.1 Expresión de IGF1 en animales controles y con COD espontánea e inducida experimentalmente.

El hígado es la principal fuente de IGF (Lucy, 2000; Velazquez y col., 2008), sin embargo, los niveles de IGF1 y 2 pueden ser regulados localmente en diferentes tejidos, entre ellos, el ovario. La expresión de IGF1 y 2 en células de la granulosa sería ampliamente regulada durante la selección del folículo dominante (Fortune y col., 2004). Si bien se han demostrado los efectos de ambos ligandos sobre la proliferación y diferenciación de células de la granulosa, el IGF1 ejercería las principales funciones (Hastie y Haresing, 2006a) proponiéndolo como el factor más relevante en la regulación de la foliculogénesis en bovinos (Armstrong y col., 2000).

El desarrollo folicular está regulado principalmente por la FSH y la LH, aunque existen evidencias de que los factores de crecimiento como el sistema IGF, actúan en sinergia con las gonadotropinas y pueden actuar localmente en las células del folículo amplificando o atenuando la diferenciación celular (Spicer y col., 2000; Davidson y col., 2002). Se ha demostrado que la expresión de IGF1 (Hsu y Hammond, 1987; Samaras y col., 1996) y su ARNm está modulada por la FSH (Hastie y Haresing, 2006a). Altos niveles de FSH disminuyen (Spicer y Chamberlain, 2000) o no afectan la expresión de IGF1 (Wathes y col., 1995). En cambio, otros autores demostraron que IGF1 actuaría sinérgicamente con FSH para estimular la proliferación y la esteroidogénesis de las células de la granulosa in vitro (Hammond y col., 1991).

Diferentes estudios evidencian concentraciones variables entre IGF en circulación y en LF, siendo en LF menores (Echternkamp y col., 1990; Spicer y col.,

1991), iguales (Spicer y col., 1992), o superiores (Spicer y col., 1992; Ortega y col., 2008) que las concentraciones de IGF1 periféricas. Esto indicaría que las concentraciones provenientes del hígado pueden, en parte, modificarse significativamente sin afectar los niveles de IGF1 intrafolicular directamente (Spicer y col., 1992), probablemente por la síntesis local del ligando en el ovario.

Si bien ha sido claramente establecido que el IGF1 está expresado en las células de la granulosa de roedores y cerdos, la expresión del ARNm de IGF1 en rumiantes es controversial. En ovinos, se detectó expresión de ARNm de IGF1 en células de la granulosa y de la teca (Leeuwenberg y col., 1995) otros autores evidenciaron expresión sólo en células de la granulosa de folículos sanos (Hastie y Haresing, 2008). En bovinos, existen estudios que demuestran la presencia (Spicer y col., 1993; Leewenberg y col., 1995; Spicer y Echternkamp 1995; Yuan y col., 1998, Armstrong y col., 2000) o la ausencia (Perks y col., 1995; 1999; Armstrong y col., 1998) del ARNm codificante para IGF1 en células de la granulosa. In vitro, se demostró que las células de la granulosa bovina no luteinizadas no producen IGF1 en medios de cultivos libre de suero (Gutierrez y col., 1997), sin embargo, otros autores fueron capaces de detectar expresión ARNm de IGF1 en células de la granulosa cultivadas in vitro (Spicer y col 1993, Spicer y Echternkamp, 1995). En nuestro trabajo observamos expresión de ARNm codificante para IGF1 en células de la granulosa bovina, sin obtener niveles detectables en células de la teca, en acuerdo a lo reportado por otros autores (Spicer y Echternkamp 1995; Armstrong y col., 2000, Hastie y Haresing, 2006a).

Se ha sugerido que además de estar involucrado en la patogénesis, el IGF1 está involucrado en el mantenimiento de la COD en bovinos (Zulu y col., 2002; Probo y col., 2011). En estudios previos de nuestro grupo, se detectaron niveles séricos de IGF1 similares en animales controles y animales con COD tanto inducida como espontánea. En cambio, los niveles intrafoliculares mostraron una disminución en animales con COD comparados con los controles (Ortega y col., 2008) en concordancia con lo publicado por otros autores (Beam y Butler, 1997, 1998; Zulu y col., 2002). Las bajas concentraciones reportadas en LF podrían correlacionarse con la baja expresión del ARNm detectadas en esta tesis en animales con COD. Las diferencias obtenidas entre los niveles séricos que se mantienen constantes y la menor concentración a nivel folicular, se podrían deber a una menor internalización del IGF1 sintetizado en hígado.

Esto llevaría además a una falla en la regulación de su síntesis en el ovario por parte de las células de la granulosa cuando se encuentran disminuidas en quistes, sin descartar la regulación por parte de las IGFbps con acción local en el ovario (Sánchez y col., 2014).

5.3.2 Expresión de las IGFbps en animales controles y con COD espontánea e inducida experimentalmente.

La actividad biológica de los IGFs está controlada por su asociación con una familia específica de proteínas de unión que se encuentran unidas a la matriz extracelular, a la membrana de las células o libres en el LF. Estas IGFbps poseen un efecto inhibitorio bloqueando la unión de los ligandos a sus receptores, o un efecto estimulador protegiendo la degradación de los IGFs (Grimard y col., 2013). Dichos efectos dependen de cambios postraduccionales como fosforilaciones, degradación proteolítica o unión a la matriz extracelular (Monget y Bondy, 2000).

Utilizando hibridación in situ, el ARNm de IGFbp2, 3, 4 y 5 fue localizado en células de la granulosa, en consistencia con lo reportado en estudios realizados en ovinos (Hastie y Haresign, 2006a) y bovinos (Armstrong y col., 1998; Thomas y col., 2007). A pesar de haber determinado una ausencia en la expresión del gen en células de la teca, se detectaron las proteínas IGFbp2, 3 y 5 en dicha población celular. Los resultados obtenidos podrían sugerir un mecanismo de acción paracrina de las IGFbps y así favorecer la acción moduladora en ambas poblaciones celulares (Van Kleffens y col., 1999; Wathes y col., 2003; Santiago y col., 2005).

Las cantidades relativas de ARNm de las IGFbps analizadas por PCR en tiempo real son similares en la pared folicular de quistes y folículos terciarios controles. Estudios desarrollados en cerdos, determinaron que el ARNm de IGFbp4 se expresa en células de la granulosa (Grimes y col., 1994) y en humanos, tanto células de la granulosa como de la teca (El-Roeiy y col., 1994). En ovinos (Besnard y col., 1996a) y bovinos (Armstrong y col., 1996) se ha reportado la expresión del ARNm que codifica a IGFbp2 y 4 se encuentra restringida a células de la granulosa y de la teca, respectivamente. En esta tesis, detectamos expresión génica de IGFbp2 y de IGFbp4 en células de la granulosa, mientras que en células de la teca sólo hallamos niveles significativamente menores de IGFbp4, contrariamente a lo observado por otros

autores quienes detectaron la principal expresión de IGFBP4 en células de la teca (Armstrong y col., 1998; Roberts y Echterkamp, 2003).

La expresión de ARNm para IGFBP2 en células de la granulosa bovina fue mayor en folículos subordinados que en los dominantes bovinos (Yuan y col., 1998; Schams y col., 2002) de la misma manera que lo obtenido con la proteína (Santiago y col., 2005). Nosotros observamos que la expresión del ARNm para IGFBP2 fue similar en todos los estadios foliculares, hallándose una disminución en quistes respecto a los terciarios controles. Los resultados obtenidos se contraponen a lo reportado por otros autores que detectaron niveles menores de ARNm de IGFBP2 en folículos sanos de un tamaño superior a 8 mm respecto a folículos con menor diámetro (Roberts y Echterkamp, 2003). A nivel proteico, el patrón de marcación hallado fue diferente al descrito previamente, detectándose niveles similares en todas las categorías foliculares analizadas. Estos resultados indicarían que en quistes existe una modulación diferencial de la síntesis proteica que permite mantener niveles constantes respecto a los demás folículos.

Se detectaron niveles similares de ARNm de IGFBP3 y su proteína en los diferentes estadios foliculares en concordancia con trabajos previos desarrollados durante la foliculogénesis (Santiago y col., 2005). Sin embargo, en quistes se detectó la menor expresión génica y proteica respecto a folículos terciarios controles. Por otro lado, es la proteína con más actividad detectada en LF. Conjuntamente estos resultados indicarían que la acción local de IGFBP3 no es un producto de la síntesis in situ sino que podría haber una contribución sistémica en concordancia a lo reportado por otros autores (Echterkamp y col., 1994; Wathes y col., 2003; Santiago y col., 2005).

En cuanto a los niveles del ARNm de IGFBP4, determinamos una disminución en folículos terciarios respecto a folículos en el menor estadio de desarrollo. En concordancia, otros autores detectaron niveles disminuidos de ARNm de IGFBP4 en células de la granulosa de folículos dominantes de diferentes especies respecto a folículos menos desarrollados (Sánchez y col., 2014). Por otra parte, se detectaron disminuidos los niveles de ARNm de IGFBP4 y de su proteína en quistes respecto a los folículos terciarios controles, lo que estaría relacionado con la baja expresión génica. Además, esta disminución en quistes podría deberse a un aumento en la expresión de

la enzima PAPP-A encargada de la proteólisis de las IGFbps, indicando a la IGFBP4 como la más sensible a degradación por PAPP-A. Se ha sugerido que la producción de IGFBP4 debida a cambios en la expresión intrafolicular de ARNm, está correlacionada además, con la regulación de LH y degradación de esta proteína ligadora (Mazerbourg y col., 2001; Hastie y Haresign, 2010). Para respaldar el control ejercido por las hormonas esteroides en la producción de IGFbps, Spicer y Chamberlain (2000) observaron que el 17 β -estradiol inhibe la producción de IGFBP4 en células de la granulosa bovina in vitro, pero no determinaron si esta inhibición se debe a modificaciones en la proteólisis de IGFBP4. Sin embargo, otros autores demostraron que en humanos, el IGF1, la FSH y/o 17 β -estradiol inducen la proteólisis de la IGFBP4 en cultivo de células de la granulosa (Iwashita y col., 1998). Nuestros resultados mostraron una tendencia del 17 β -estradiol a disminuir en LF de quistes inducidos y una disminución de IGFBP4 en este tipo folicular, por lo que favorecería la hipótesis que el 17 β -estradiol estaría influyendo en la proteólisis de esta proteína en vez de estar inhibiendo la síntesis de esta IGFBP.

La expresión génica de IGFBP5 en este trabajo, se detectó en células de la granulosa y en muy bajas cantidades en células de la teca de ciertos quistes. En las restantes categorías foliculares se determinó una ausencia de expresión de ARNm para IGFBP5.

Tanto FSH como LH son capaces de inhibir la expresión del ARNm de IGFBP5. En este sentido se determinó en folículos ovinos, una disminución de los niveles del ARNm (Besnard y col., 1996; Hastie y Haresign, 2006a) y la proteína (Monget y col., 1993; Spicer y col., 2002) en folículos que incrementan su diámetro (Hastie y Haresign, 2010).

Los niveles de ARNm de IGFBP4 y 5 en células de la granulosa observados en esta tesis, disminuyen con el crecimiento folicular en el grupo control, igualmente a lo reportado en ovinos (Hastie y col., 2004; Hastie y Haresign, 2006a). Por otro lado, detectamos una expresión proteica reducida de IGFBP4 y 5 en células de la granulosa de quistes inducidos experimentalmente comparada con la expresión detectada en quistes espontáneos. Esta diferencia entre niveles proteicos se podrían deber a las diferencias en las condiciones ambientales y de manejo entre el modelo experimental

y los animales a campo, o la diferencia del tiempo de persistencia de los quistes, lo cuales podrían influenciar la expresión estas IGFBPs.

Si bien la expresión de IGFBP2 y 3 fue similar en todas las categorías foliculares analizadas, los niveles de ARNm fueron menores en quistes respecto a folículos terciarios controles. En cambio, el comportamiento de los niveles proteicos de IGFBP4 y 5 se corresponden al comportamiento del nivel de síntesis del ARNm de dichas IGFBPs. Dichos resultados podrían estar indicando un control hormonal en la síntesis de algunas IGFBPs y proteínas asociadas como las proteasas (Spicer, 2004; Aad y col., 2006; Sudo y col., 2007), evidenciando que IGFBP4 y 5 serían más sensibles a la degradación proteolítica que las demás IGFBPs.

En cuanto a la información sobre la expresión y regulación del ARNm y proteínas IGFBP1 y 6 es muy limitada en ovarios de rumiantes. En el presente estudio, no se evidenciaron cambios en los niveles de ARNm de IGFBP1 y 6 en la pared de folículos terciarios y quísticos analizados. Debido a que se detectaron bajos niveles de ARNm de estas proteínas ligadoras mediante la técnica de PCR en tiempo real, no se analizó la expresión del ARNm de estas IGFBPs por hibridación in situ.

Algunos autores reportaron que las concentraciones de IGFBP1 en suero y LF son detectados principalmente en mujeres con síndrome de ovario poliquístico (Thierry van Dessel y col., 1999). En nuestro trabajo, no se detectó IGFBP1 y 6 en LF por western ligand blot similar a lo detectado por otros autores (Nicholas y col., 2002) evidenciando la baja expresión en el ovario o que estas IGFBPs no podrían ser sintetizadas en el folículo pero serían internalizadas como resultado de cambios en la membrana basal en algún tipo folicular, especialmente en atrésicos (Nicholas y col., 2002). Por otro lado, Silva y col. (2011) evidenciaron expresión de ARNm de IGFBP1 en muy bajos niveles, a diferencia de Zhou y col. (1996) que no detectaron expresión de esta proteína en cerdos. Estudios recientes en ovinos (Hastie y col., 2004) y bovinos (Schams y col., 2002) localizaron ARNm de IGFBP1 en folículos de diferentes estadios de desarrollo, aunque con niveles extremadamente bajos. De esta manera se sugiere que esta IGFBP no sería relevante en la fisiología del ovario (Kamangar y col., 2006). Dichos resultados podrían explicar la ausencia de la proteína en los folículos analizados a pesar de detectar el ARNm para dicha IGFBP en la pared folicular o bien a una pérdida en la detección dada por el método utilizado (IHQ). En bovinos no se observó

expresión de IGFBP6 (Silva y col., 2009) a diferencia de lo observado en nuestro trabajo donde evidenciamos una expresión aumentada en células de la granulosa de quistes respecto a folículos terciarios controles, con menores niveles que las demás IGFBPs. Estos resultados evidenciarían que tanto IGFBP1 y 6 serían las de menor importancia en la regulación de las funciones ováricas.

5.3.2.1 Análisis de la actividad de IGFBPs en animales controles y animales con COD

Se ha detectado la síntesis a nivel intrafolicular de la mayor parte de las IGFBPs (Armstrong y col., 1998; Voge y col., 2004) además de IGFBPs activas en LF (Nicholas y col., 2002). Por su parte los IGFs están regulados por las concentraciones de estas IGFBPs presentes en el LF que dependen del estadio de desarrollo y de la condición de este folículo (Armstrong y Webb 1997).

Las IGFBPs ejercen una función determinante en la regulación de la biodisponibilidad del ligando. Los IGFs poseen mayor afinidad por las IGFBPs que por sus receptores específicos, es por ello que las IGFBPs son capaces de unir e inactivar a los IGFs circulantes dejándolos inaccesibles para la unión a sus receptores específicos (Mazerbourg y col., 2001; Brogan y col., 2010, Sanchez y col., 2014). Se han documentado variaciones en las concentraciones de las IGFBPs en LF durante el crecimiento y desarrollo folicular en bovinos (de la Sota y col., 1996; Stewart y col., 1996), ovinos (Perks y Wathes, 1996), y cerdos (Yuan y col., 1996).

Debido a que existe una estrecha relación entre las concentraciones de IGFBPs y la fertilidad (Grimard y col., 2013), diferentes autores postularon que IGFBP2, 3,4 y 5 son las principales IGFBPs reguladas durante el crecimiento folicular, presentando sus menores concentraciones durante la dominancia (Stewart y col., 1996; Armstrong y col., 1998; Hastie y Haresign, 2006a). La dominancia se asocia con la disminución de las concentraciones en LF de las IGFBPs de bajo peso molecular, como son IGFBP4 y 5 (Austin y col., 2001). Sin embargo, en nuestro trabajo, la IGFBP3 aparece como la proteína ligadora activa más importante en el LF en concordancia a lo postulado por otros autores (Monget y col., 1993; Stewart y col., 1996). La concentración de IGFBP3 en LF se vio incrementada en folículos controles mientras aumentaban el tamaño, con la mayor concentración observada en quistes. Las diferencias de IGFBP3 detectadas entre la síntesis in situ y las concentraciones en LF, apoyan la hipótesis de un origen

extracelular de esta proteína de unión dado que es la más importante en circulación, en acuerdo a lo reportado previamente (Echternkamp y col., 1994; Santiago y col., 2005; Rey y col., 2010).

Por otro lado, observamos una disminución en la actividad de IGFBP5 con el crecimiento del folículo, determinando los menores niveles en los quistes. Resultados similares fueron obtenidos con la IGFBP4 glicosilada (29 KDa), sin observar cambios en la forma no glicosilada (24 KDa) consistente con lo postulado por otros autores (Monget y col., 1993, Spicer, 2004, Aad y col., 2006). Estos resultados podrían deberse a que estas IGFBPs serían las más sensibles a la acción de enzimas proteolíticas específicas.

La evidencia indica que los cambios encontrados en las IGFBPs del LF se dan debido a, en parte, cambios en la síntesis local y ocurren a través de una combinación de cambios en la expresión génica (Nicholas y col., 2002; Davidson y col., 2002; Spicer, 2004). Otra causa podría ser la modificación postraduccional mediante la degradación proteolítica de las IGFBPs que regulan los cambios en la síntesis local y en la proteólisis, o una utilización selectiva de las IGFBPs desde la circulación durante el crecimiento del folículo (Armstrong y col., 1998). Además, existen inhibidores de las proteasas que estarían regulados temporalmente y hormonalmente para participar indirectamente en la bioutilización de los ligandos IGFs (Spicer, 2004).

Por otro lado, la actividad de las IGFBPs fue negativamente correlacionada con las concentraciones de 17β -estradiol en LF (Stewart y col., 1996) y otros autores evidenciaron que las IGFBPs inhiben directamente la síntesis de 17β -estradiol en células de la granulosa de rata (Ui y col., 1989). Por lo tanto, el aumento en la actividad de IGFBP3 en folículos quísticos respecto a folículos controles evidenciado en esta tesis, se podría correlacionar con la disminución de 17β -estradiol observada en quistes respecto a folículos controles.

5.3.3 Análisis de IGFR1 en animales controles y en animales con COD.

El IGFR1 media las acciones biológicas de IGF1 y 2, teniendo un rol importante en el desarrollo folicular (Echternkamp y col., 2004; Yang y col., 2013). En esta tesis, detectamos expresión de ARNm codificante para IGFR1 en células de la granulosa coincidente con lo encontrado por otros autores (Hastie y Haresing, 2008, Sanchez y

col., 2014). Por otro lado, si bien se detectó expresión génica en células de la teca de folículos controles y quistes, la expresión fue menor a la obtenida en células de la granulosa consistente con lo observado en estudios previos en ovinos (Perks y col., 1995; Hastie y Haresign, 2006a) y bovinos (Perks y col., 1999; Armstrong y col., 2000).

Mediante PCR en tiempo real se evidenció un incremento de los niveles de ARNm de IGFR1 en las células de la granulosa, en la medida que aumentaba el diámetro del folículo en concordancia con lo encontrado por otros autores (Wandji y col., 1992; Perks y col., 1995; Spicer y col., 1994; Schams y col., 2002, Hastie y Haresign, 2006a). Sin embargo, en otros trabajos se han detectado niveles constantes (Perks y col., 1999; Armstrong y col., 2000) o disminuidos (Perks y col., 1995; Hastie y Haresign, 2006a) de ARNm de IGFR1 en células de la granulosa con el incremento del tamaño de los folículos en diferentes especies. La discrepancia entre los resultados encontrados podría estar asociada a diferencias metodológicas, de modelos, de razas utilizadas o diferencias en la expresión según la especie.

En porcinos (Caubo y Tonetta, 1989), y en bovinos (Stewart y col., 1996; Schams y col., 2002), se ha detectado expresión proteica en células tecaes de folículos terciarios, siendo, en todos los casos, menores que las concentraciones en células de granulosa. En cambio, en nuestro trabajo observamos la principal expresión en células de la granulosa sin evidencia de expresión de este receptor en células de la teca igualmente a lo publicado por otros autores (Wandji y col., 1992; El-Roeiy y col., 1993, Armstrong y col., 2002).

Analizando la inmunolocalización proteica del IGFR1 en las diferentes categorías foliculares de ovarios controles y con COD espontánea e inducida con ACTH, evidenciamos que el receptor se expresa en las células de la granulosa de todos los estadios foliculares. El patrón de marcación fue creciente a medida que aumenta el tamaño del folículo, igualmente a lo descrito por otros autores (Wandji y col., 1992; Lucy, 2008; Silva y col., 2009).

Si bien en algunos estudios se observó que el número de receptores de IGF1 en células de la granulosa no se alteraba con el tamaño del folículo (Stewart y col., 1996), otros autores reportaron cambios en el folículo dominante (Sanchez y col., 2014). En nuestro trabajo detectamos un aumento en los niveles de transcripto de IGFR1 en la granulosa de folículos terciarios mayores a 10 mm. Estos resultados son consistentes

con los reportados por otros autores que evidenciaron un mayor número de receptores en las células de la granulosa de folículos superiores a 8 mm respecto a folículos con un diámetro inferior a 1-5 mm (Spicer y col., 1994).

A pesar de los bajos niveles de ARNm de IGFR1 en los folículos quísticos, se detectaron los mayores niveles de expresión proteica. Probablemente estas diferencias se deban a modificaciones postraduccionales o niveles alterados en la expresión de reguladores de este receptor. La activación del receptor de IGF participa en la transducción de señales que median el crecimiento y la inhibición de la apoptosis (Kwiontkiewicz y Giudice, 2009). El IGFR1 puede actuar mediante 2 vías, la cascada de señalización señalización Ras/MAPK y/o la vía del PI3K/Akt (LeRoith y col., 1995; Poretsky y col., 1999). En trabajos realizados en nuestro laboratorio se observaron variaciones en ciertos moduladores de la cascada de señalización PI3K (Hein y col., 2013). La modulación diferencial de los componentes de esta vía de señalización o la posibilidad de que PI3K sea reclutada y activada por hormonas o factores de crecimiento como el sistema IGF, que utilizan esta vía común para ejercer su respuesta, podrían estar implicados en las variaciones de los niveles de IGFR1 detectados en este trabajo.

Diversos estudios sugieren una regulación de diferentes componentes del sistema IGF por las gonadotropinas (Spicer y col., 1994; Hastie y Haresing, 2006a; 2006b; 2008; Kwiontkiewicz y Giudice, 2009). Frente a niveles reducidos de FSH, la expresión del ARNm del IGFR1 se incrementa en folículos sanos (Hastie y Haresing 2006a). Por otro lado, en presencia de bajos niveles de LH, la expresión de ARNm de IGFR1 disminuye gradualmente. Por lo tanto, la expresión de los ARNm de los receptores sería dependiente tanto de la FSH como de la LH (Hastie y Haresing 2006b). Además, estudios in vitro demostraron que las células de la granulosa tratadas con el factor de crecimiento epidermal (EGF), 17 β -estradiol y FSH, aumentan la expresión de IGFR1 de modo que las células de granulosa adquieren dicho receptor durante la diferenciación folicular (Spicer y col., 1994). En este sentido, en animales con quistes, se produce una alteración hormonal que incluye una inadecuada producción de FSH, frecuencias de los pulsos de LH alteradas, inhibición del pico preovulatorio de esta gonadotropina que impiden un funcionamiento ovárico normal (Battaglia y col., 2000;

Williams y col., 2001; Peter, 2004). Por lo tanto la expresión del receptor podría verse modificada por el ambiente hormonal alterado en animales con COD.

Algunos estudios sugieren que el 17 β -estradiol estimularía la proliferación celular mediante la activación del IGFR1 independiente de los ligandos (Song y col., 2004, Kamanga-Sollo y col., 2013). Sin embargo, otros autores postulan que la actividad de este receptor es dependiente del ligando, el IGF se une, produce un cambio conformacional provocando su activación (Kavran y col., 2014). Así, los altos niveles de IGFR1 en quistes podrían estar estimulados por los niveles de 17 β -estradiol, tendientes a aumentar en estas estructuras (Amweg y col., 2013), cuando las concentraciones de IGF1 son bajas como hemos demostrado previamente en quistes (Ortega y col., 2008). Esto indicaría una posible regulación de la expresión de IGFR1 dependiente del ligando cuando éste se encuentra presente, transformarse a independiente del ligando, en condiciones patológicas cuando el ligando se encuentra en bajas concentraciones, donde la expresión estaría estimulada por el 17 β -estradiol.

De esta manera, el aumento del receptor se debería a la necesidad de incrementar la posibilidad de respuesta frente a los bajos niveles de IGF1 detectados en quistes (Ortega y col., 2008). Así, los quistes serían capaces de mantener las respuestas a IGF1, tales como la proliferación (Salvetti y col., 2010) y la esteroidogénesis activas (Ortega y col., 2008; Amweg y col., 2013). Por lo tanto, a medida que el folículo bovino se desarrolla o se forma el quiste, el ambiente hormonal se volvería propicio para incrementar la expresión de IGFR1 de manera que el folículo sea capaz de responder más sensiblemente a los ligandos (Perks y col., 1999). En este sentido, se postula que el desarrollo folicular bovino estaría determinado por la cantidad de IGF1 libre en LF más que por la expresión del receptor en células de la granulosa (Sudo y col., 2007).

5.3.4 Análisis de PAPP-A en animales controles y animales con COD

La biodisponibilidad de los IGFs es el resultado de una relación entre las IGFBPs y sus proteasa (Mazerbourg y col., 2001; Boldt y Conover., 2007; Ning y col., 2008). Las proteasas específicas han sido detectadas en el LF de ovinos con concentraciones y actividad variable durante la foliculogénesis (Besnard y col., 1996a). La PAPP-A se caracterizó como la principal proteasa reguladora de los niveles de IGF1 libre en el

folículo dominante bovino (Mazerbourg y col., 2001; Spicer y col., 2004; Sánchez y col., 2014).

Si bien se detectó la expresión del ARNm de PAPP-A en la teca de folículos humanos (Rhoton-Vlasak y col., 2003), otros estudios reportaron expresión en las células de la granulosa humanas (Hourvitz y col., 2000, Alexiadis y col., 2006) y en roedores (Matsui et al 2004). En bovinos, se reportó mayor expresión del ARNm de PAPP-A en células de la granulosa de folículos dominantes que subordinados (Santiago y col., 2005). En esta tesis detectamos expresión de ARNm en células de la granulosa de folículos terciarios y quistes, consistente con lo publicado por otros autores (Mazerbourg et al., 2001; Santiago et al., 2005; Sánchez et al., 2014). Sin embargo, no observamos expresión en células de la teca como lo que evidenciaron Aad y col. (2006) en bovinos donde la expresión génica se observó en ambas poblaciones celulares. Además, en células de la granulosa de folículos terciarios pequeños y medianos no detectamos expresión de ARNm de PAPP-A, evidenciándose expresión únicamente en terciarios con un tamaño superior a 10 mm. Estos resultados concuerdan con lo publicado por algunos autores que reportaron expresión del ARNm de PAPP-A en células de la granulosa de folículos dominantes con diámetro superior a 18mm (Santiago y col., 2005) y difieren de lo publicado por Aad y col. (2006) donde se reportó expresión de ARNm de PAPP-A en folículos de 5 mm de diámetro.

La expresión del ARNm de PAPP-A fue detectada en células de la granulosa en acuerdo a lo reportado previamente por otros autores (Mazerbourg y col., 2001; Aad y col., 2006; Santiago y col., 2005). Además, la proteína secretada fue detectada en el LF igualmente a lo observado por otros autores (Mazerbourg y col., 2001; Monget y col., 2003; Rivera y Fortune, 2003b).

En diversas especies, como en bovinos, la disminución en los niveles de las IGFBP4 y 5 en folículos dominantes se debe al incremento en la actividad proteasa (Spicer y col., 2004). Elevadas concentraciones de proteasas específicas para IGFBP4 y 5, con una baja actividad de unión de IGFBP4 y grandes cantidades de IGF1 libre son algunos de los cambios que suceden en el crecimiento folicular bovino (Spicer y col., 2004). En este sentido, la expresión de la PAPP-A, como componente principal de la degradación de IGFBP4 en el LF (Besnard y col., 1996b; Monget y col., 2003), mostró una tendencia a aumentar con el desarrollo del folículo (Santiago y col., 2005). El

folículo dominante presenta la mayor capacidad de síntesis de PAPP-A, la que mantendría las menores concentraciones de IGFBP4 (Mazerbourg y col., 2001; Rivera y Fortune, 2001; Fortune y col., 2004). Consecuentemente, se favorecería la mayor disponibilidad de IGF1 durante el crecimiento folicular (Spicer et al., 1993; 1996; Fortune et al., 2004). Por otro lado, el aumento de los niveles de PAPP-A en el LF de quistes respecto a los folículos terciarios de menor tamaño, junto a la disminución de IGFBP4 obtenida en el LF de los quistes, estarían evidenciando una mayor actividad proteolítica de esta enzima, que llevaría a la disponibilidad de los bajos niveles de IGF1 en quistes (Ortega y col., 2008) para mantener la esteroidogénesis, la diferenciación y persistencia folicular.

La diferencia obtenida entre la expresión génica en algunas estructuras foliculares, y la detección de la PAPP-A secretada en todos los folículos analizados, indicaría que la detección de la proteasa en el LF sería el resultado de una síntesis local y una liberación proveniente de la síntesis de otros tejidos para actuar de manera endócrina y paracrina (Piñon y Kaski, 2006; Conover, 2012). Además, estas diferencias podrían reflejar una mayor estabilidad de la proteína liberada al LF al momento de la detección o bien a una secreción regulada por los bajos niveles de IGF1 detectados en quistes (Ortega y col., 2008). En este sentido, la expresión de PAPP-A estaría regulada por la presencia de los ligandos o por diferentes inhibidores presentes en el LF bovino (Spicer, 2004). Por lo tanto, los cambios en la actividad de la PAPP-A podrían ocurrir sin cambios en los niveles de ARNm (Santiago y col., 2005). Otra forma de regulación de la actividad de la PAPP-A además de la biodisponibilidad de IGF, es la actividad de las proMBP, que unen covalentemente a PAPP-A inhibiendo su actividad (Kwintkiewicz y Giudice, 2009). Así, la actividad de PAPP-A podría modificarse sin que se detecten cambios en los niveles de la proteína. Por otro lado, se reportó una correlación significativa entre el ARNm de la enzima aromatasa y el ARNm de PAPP-A en células de la granulosa de folículos sanos de diferentes tamaños (Spicer, 2004). De esta manera, la baja expresión del ARNm de PAPP-A en quistes foliculares podría estar relacionada a la baja expresión de aromatasa debida a la baja población de células de la granulosa en esta estructura. Además, se reportó que las concentraciones de PAPP-A y 17 β -estradiol están estrechamente correlacionadas (Spicer, 2004), por lo que la alta expresión proteica de PAPP-A estaría más relacionada con altos niveles de

concentración de 17 β -estradiol, el cual mostró expresión similar en folículos controles y quistes (Amweg y col., 2013).

5.4 Cultivos

La proliferación de las células de la granulosa desempeña un rol importante en la foliculogénesis. Las gonadotropinas y los estrógenos son los principales moduladores del crecimiento celular durante el periodo preovulatorio (Colman Lerner y col., 1995). El cultivo de células de granulosa bovina ha sido ampliamente estudiado y se han desarrollado diferentes sistemas in vitro para la evaluación de la regulación fisiológica del crecimiento folicular y la ovulación, entre otros procesos (Gutierrez y col., 1997). Las células de la granulosa bovina son capaces de proliferar in vitro en presencia de diferentes factores de crecimiento y en presencia o ausencia de suero fetal bovino. En este sentido, una combinación adecuada de factores de crecimiento y hormonas serían suficientes para promover a las células a ingresar a la fase de síntesis (S) de ciclo celular (Colman-Lerner y col., 1995). En diversos estudios que involucran cultivos celulares de granulosa han proporcionado suero durante las primeras horas del cultivo o tratado previamente las placas de cultivo para facilitar la adhesión celular y así incrementar la viabilidad celular (Langhout y col., 1991; Gong y col., 1994). Bajo las condiciones mencionadas, las células se podrían luteinizar espontáneamente, independientemente de las gonadotropinas y rápidamente pierden su fenotipo celular de granulosa incluyendo la pérdida de la actividad CYP19A1 (Roberts y Echterkamp, 1994). En este trabajo se realizó el cultivo in vitro de células de la granulosa en un medio libre de suero donde observamos bajos niveles de progesterona y altos niveles de 17 β -estradiol, que indicarían que las células lograron sobrevivir por períodos extendidos sin luteinizarse.

El sistema de cultivo para células de la granulosa utilizado actualmente en diferentes trabajos incorpora FSH e insulina, solos o combinados, para lograr un crecimiento eficaz y para mantener las células sin luteinizarse (Gutierrez y col., 1997; Ferreira y col., 2011). La insulina estimula la síntesis de ADN, ARN, proteínas y lípidos, interviene en la regulación de funciones celulares (Rao y col., 1990; Barrio y col., 2003), induce la captación de glucosa y aminoácidos y posee actividad mitogénica y antiapoptótica (Rao y col., 1990; Pereira, 2013). Se ha propuesto que la insulina ejerce

un efecto antioxidante en el medio de cultivo, eliminando los posibles iones Fe^{3+} del medio de cultivo, previniendo su reducción a Fe^{2+} y la consiguiente generación de radicales libres, de los cuales es conocido que poseen efectos perjudiciales sobre las células (Gutteridge, 1989). Si bien se postula que IGF1 e insulina estimulan la proliferación celular, tratamientos combinados con ambas hormonas no aumentarían el número de células de la granulosa (Spicer y col., 2002). En cambio, las gonadotropinas solas no ejercen efectos en el número de células pero incrementan la sensibilidad de las células de la granulosa por el efecto mitótico de la insulina. Igualmente, la FSH estimula el número de células y el porcentaje de viabilidad (Spicer y col., 2002). La FSH ejerce un rol determinante en el desarrollo folicular junto a la LH, y controla la secreción de hormonas ováricas como el 17β -estradiol y progesterona. Se postula que la FSH promueve el desarrollo folicular tardío, incluyendo la expresión del receptor de LH en las células de la granulosa (El-Hayek y col., 2014). Debido a que las hormonas mencionadas son esenciales en el desarrollo y crecimiento del folículo es que su uso es altamente frecuente en el cultivo de células de la granulosa.

Si bien el medio de cultivo utilizado en la actualidad es eficiente, su uso para estudios de estímulos hormonales es limitado. Debido a la necesidad de evaluar las consecuencias de estímulos de las hormonas previamente citadas, nos propusimos evaluar suplementos alternativos en el medio de cultivo de modo de reemplazarlos en el medio de cultivo base y lograr un crecimiento celular eficaz. Para ello, se utilizó transferrina y selenio como nuevos suplementos. La adición de la transferrina sola o con adición de insulina o selenio al medio de cultivo, estimularía el crecimiento celular (Barrio y col., 2003). El selenio regula la actividad de la glutatión peroxidasa, previniendo la generación de radicales libres superóxidos, que dañan las membranas; por ello el selenio podría imitar los efectos antioxidantes de las células somáticas (Barrio y col., 2003). Por otro lado, el selenio es un nutriente esencial para diferentes tipos de células cultivadas *in vitro*. La transferrina y el selenio son oligoelementos con actividad antioxidante. Una combinación de ellos en medios de cultivo causan una reducción de radicales libres y peroxidación de lípidos (Lee y Menon, 2005). En nuestro trabajo observamos que el mayor crecimiento celular fue el medio suplementado con selenio y transferrina, indicando a estos suplementos como los de elección para el desarrollo de un medio de cultivo para estímulos hormonales.

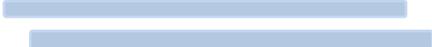
Si bien las células de la granulosa mantienen niveles constantes de progesterona y actividad aromatasa, se mantienen sensibles a la FSH, IGF1 e insulina; sin embargo adquieren aspecto de fibroblastos (Spicer y col., 2002). En cambio en nuestro sistema de cultivo, las células mantienen la morfología esférica, con niveles constantes de progesterona y alta concentración de 17β -estradiol, que indicaría que las células no están luteinizadas. Por otro lado, la expresión de CYP19A1 evidenció un incremento en los medios suplementados con insulina- transferrina- selenio y con selenio y transferrina, determinando que este último suplemento sería el de elección para independizarse del efecto de las hormonas.

A pesar que faltarían más estudios que soporten la importancia de nuestro hallazgo, nuestros resultados demostrarían que logramos desarrollar un sistema de cultivo libre de suero para las células de granulosa bovina en la cual se mantiene la expresión y actividad de la CYP19A1. Además, logramos obtener un crecimiento celular eficiente de manera que estas células son capaces de permanecer sensibles a concentraciones fisiológicas de FSH y factores de crecimiento para el estudio posterior con tratamientos hormonales de FSH, LH e insulina.

Con respecto a células de la teca, aunque no logramos obtener un número suficiente de ensayos, en base a ensayos preliminares podemos suponer que la concentración de 100 ng/mL sería la de mayor influencia en la expresión de CYP17A1. En base a las concentraciones conocidas de LH sérico en hembras bovinas durante la fase luteal y la fase preovulatoria (<10 a >10 ng/mL respectivamente), (Spicer y col., 2002), evaluamos niveles iguales y superiores a los mismos para ver el efecto sobre las células de la teca a diferentes tiempos.

Los resultados obtenidos para células de la granulosa y de la teca son preliminares y es necesario continuar estudiando y evaluando diferentes concentraciones y estímulos para lograr entender la influencia del sistema IGF y su interacción con otras hormonas en el desarrollo de la patogenia de la enfermedad.

CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos, sumado a los aportes de otros autores ampliamente discutidos en este trabajo, nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

En la tesis se utilizó un modelo experimental para la inducción de quistes con ACTH que permitió obtener quistes foliculares conociendo el tiempo de emergencia de esta estructura. Se encontraron ciertas diferencias entre el modelo utilizado y los casos espontáneos de quistes que podrían explicarse principalmente por el tiempo de persistencia. El modelo permite el estudio de cambios o alteraciones fundamentales ocurridos en la formación temprana del quiste, para lograr ampliar el conocimiento de las causas de su formación y formular estrategias preventivas.

Cabe destacar que la caracterización hormonal de los animales utilizados evidenció niveles disminuidos de 17β -estradiol y los altos niveles de testosterona en quistes que podrían ser una consecuencia del menor número de células de la granulosa, encargadas de la aromatización de los andrógenos en estrógenos, en los diferentes momentos de la obtención de los ovarios.

En este trabajo, demostramos que las células de la granulosa son la principal fuente de síntesis en el ovario de los diferentes componentes del sistema IGF.

En quistes se obtuvo una disminución de la expresión de su ARNm en células de la granulosa respecto a folículos controles que justificarían los niveles proteicos de IGF1 disminuidos detectados en trabajos previos.

Los niveles de IGFBP2 y su actividad fueron similares en todas las estructuras analizadas, sin embargo su expresión génica fue menor en quistes, indicando una modulación diferencial que permite mantener niveles de proteína constantes en las diferentes estructuras foliculares.

Los niveles de IGFBP3 son similares en las estructuras analizadas, sin embargo, su expresión génica fue menor en quistes comparados con terciarios controles. La actividad de esta proteína de unión se incrementó en quistes respecto a folículos controles, lo que indicaría que la acción local no es acción únicamente de su síntesis local.

La síntesis de IGFBP4 y 5 se encuentra disminuida en quistes respecto a los folículos controles, además, las actividades de ambas IGFBPs presentaron los niveles menores en estas estructuras, por lo que estas IGFBPs serían las de mayor influencia en el bovino y las más sensibles a la degradación proteolítica.

No se detectó expresión de IGFBP1 y la IGFBP6 se detectó en menores niveles que las otras IGFBPs. Además, las actividades de ambas IGFBPs no se lograron detectar, indicando que son las proteínas de unión menos relevantes para la regulación de IGFs en el ovario bovino.

El aumento del receptor en estructuras quísticas respecto a folículos del grupo control, se debería a la necesidad de incrementar la posibilidad de respuesta frente a los bajos niveles de IGF1 detectados en dichas estructuras. Los resultados demuestran que la expresión de IGFR1 estaría regulada directamente por los ligandos en casos donde la funcionalidad del ovario es normal y podría serlo por el 17 β -estradiol en casos donde el ovario presenta su función alterada o el ligando es insuficiente para mantener las respuestas.

El incremento en la expresión de PAPP-A en quistes indicaría la necesidad de liberar el IGF1 asociado a las proteínas de unión en el líquido folicular debido a las bajas concentraciones del ligando presentes en los mismos. La actividad de esta enzima podría estar regulada por los ligandos o por inhibidores presentes en líquido folicular.

En relación a los cultivos primarios de células de la granulosa y de la teca, los resultados no son claros aún, por lo que será necesario continuar estudiando y evaluando diferentes concentraciones y estímulos para lograr un mejor entendimiento de la influencia del sistema IGF y su interacción con otras hormonas en el desarrollo de la patología de la enfermedad. Es por ello que se optimizaron condiciones de cultivos celulares que permitirían un abordaje de estos estudios.

Como conclusión final podríamos sugerir al sistema IGF como un modulador intraovárico esencial para las funciones reproductivas. Alteraciones en alguno de sus componentes podrían estar afectando mecanismos regulatorios relacionados a funciones ováricas como la ovulación, la esteroidogénesis y la patología de la COD.

BIBLIOGRAFÍA



- Aad PY, Voge JL, Santiago CA, Malayer JR, Spicer LJ. 2006. Real time RT-PCR quantification of pregnancy-associated plasma proteinA mRNA abundance in bovine granulosa and theca cells: effects of hormones in vitro. *Domest. Anim. Endocrinol.* 31, 357–372.
- Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology.* 69: 72-80.
- Adams GP, Pierson RA. 1995. Ovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenology* 43:113-120
- Adashi EY. 1998. The IGF family and folliculogenesis. *J Reprod Immunol* 39:13-9.
- Aerts JMJ, Bols PEJ. 2010a. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reprod Dom Anim.* 45: 171-179.
- Aerts JMJ, Bols PEJ. 2010b. Ovarian Follicular Dynamics: A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects. *Reprod Dom Anim.* 45: 180-187.
- Alexiadis M, Mamers P, Chu S, Fuller PJ. 2006. Insulin-like growth factor, insulin-like growth factor-binding protein-4, and pregnancy-associated plasma protein-A gene expression in human granulosa cell tumors. *Int J Gynecol Cancer.*16:1973-9.
- Alfaro NS, Salvetti NR, Velázquez MML, Stangaferro ML, Rey F, Ortega HH. 2011. Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Research in Veterinary Science.* 92: 478-485.
- Amweg AN, Paredes AH, Salvetti NR, Lara HE, Ortega HH. 2011. Expression of melanocortin receptors mRNA, and direct effects of ACTH on steroid secretion in the bovine ovary. *Theriogenology.* 75: 628-637.
- Amweg AN. 2013. Expresión y actividad de elementos de respuesta a estrés en el ovario y su implicancia en la patogenia de la enfermedad quística ovárica en bovinos. Tesis doctoral en Ciencias Veterinarias- Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral. Argentina.

- Amweg AN, Salvetti NR, Stangaferro ML, Paredes A, Lara HH, Rodríguez FM, Ortega HH. 2013. Ovarian localization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD): effects of ACTH stimulation and its relationship with bovine cystic ovarian disease. *Domestic Animal Endocrinology* 45:126–140
- Armstrong DG, Hogg CO, Campbell BK, Webb R. 1996. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein production by primary cultures of ovine granulosa and theca cells. The effects of IGF-I, gonadotropin, and follicle size. *Biol Reprod.* 55:1163-71.
- Armstrong DG, Baxter G, Gutierrez CG, Hogg CO, Glazyrin AL, Campbell BK, Bramley TA, Webb R. 1998. Insulin-like growth factor binding protein-2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology* 139, 2146–2154.
- Armstrong DG, Gutierrez CG, Baxter G, Glazyrin AL, Mann GE, Woad KJ, Hogg CO, Webb R. 2000. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *J Endocrinol.* 165:101-13.
- Armstrong DG, Gong JG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R. 2002. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction.* 123:371-8.
- Armstrong DG, Webb R. 1997. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reproduction* 2:139–46
- Austin EJ, Mihm M, Evans ACO, Knight PG, Ireland JLH, Ireland JJ, Roche JF. 2001. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biol. Reprod.* 64, 839–848.
- Austin EJ, Mihm M, Evans AC, Ireland JL, Ireland JJ, Roche JF. 2002. Effects of oestradiol and progesterone on secretion of gonadotrophins and health of first wave follicles during the oestrous cycle of beef heifers. *Reproduction.* 124:531-41.
- Baird DT, Campbell BK, Mann GE, McNeilly AS. 1991. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Reprod Fertil.* 43: 125-138.

- Barrio M, Peña AI, Quintela LA, Becerra JJ, Herradón PG. 2003. Efectos de la composición y renovación parcial del medio de cultivo sobre el desarrollo de los embriones bovinos producidos in vitro. *Arch. Zootec.* 52: 441-451.
- Bartolome JA, Thatcher WW, Melendez P, Risco CA, Archbald LF. 2005. Strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cysts in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 227:1409-14.
- Bartolome JA, Kamimura S, Silvestre F, Arteché AC, Trigg T, Thatcher WW. 2006. The use of a deslorelin implant (GnRH agonist) during the late embryonic period to reduce pregnancy loss. *Theriogenology.* 65:1443-53.
- Battaglia DF, Krasa HB, Padmanaban V, Viguie C, Karsch FJ. 2000. Endocrine alterations that underlie endotoxin-mediated disruption of the follicular phase in ewes. *Biol Reprod.* 62: 45-53.
- Bauman DE, Currie WB. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci.* 63:1514-29.
- Beam SW, Butler WR. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol Reprod.* 56:133-42.
- Beam SW, Butler WR. 1998. Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *J Dairy Sci.* 81:121-31.
- Beam SW, Butler WR. 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 411–424.
- Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. 2009. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev.* 30:586-623.
- Besnard N, Pisselet C, Zapf J, Hornebeck W, Monniaux D, Monget P. 1996a. Proteolytic activity is involved in changes in intrafollicular insulin-like growth factor-binding

- protein levels during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology*. 137:1599-607.
- Besnard N, Pisselet C, Monniaux D, Locatelli A, Benne F, Gasser F, Hatey F, Monget P. 1996b. Expression of messenger ribonucleic acids of insulin-like growth factor binding protein-2, -4, and -5 in the ovine ovary: localization and changes during growth and atresia of antral follicles. *Biol Reprod*. 55:1356-67.
- Block SS, Butler WR, Ehrhardt RA, Bell AW, Van Amburgh ME, Boisclair YR. 2001. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *J Endocrinol*. 171:339-48.
- Boldt HB, Conover CA. 2007. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): a local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. *Growth Horm IGF Res*. 17:10-8.
- Bosu WT, Peter AT. 1987. Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 28:725-36.
- Braw-Tal R, Pen S, Roth Z. 2009. Ovarian cysts in high-yielding dairy cows. *Theriogenology* 72, 690–698
- Brogan RS, Mix S, Puttabyatappa M, VandeVoort CA, Chaffin CL. 2010. Expression of the insulin-like growth factor and insulin systems in the luteinizing macaque ovarian follicle. *Fertil Steril*. 93:1421-9.
- Butler WR. 1997. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci*. 60-61: 449-457.
- Butler WR. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*. 60-61:449-57.
- Canfield RW, Butler WR. 1990. Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. *Domest Anim Endocrinol*. 7:323-30.
- Cantero M, Cortés C, Bernal Y, Ansola C, Sanchez- Gómez M, Bermúdez A, Marín M. 2007. Insulin-like growth factors (IGF1 y 2) in serum of patients with mole hiditiform. *Revista Electrónica Hominis*. 1, 1:7

- Carrie're PD, Amaya D, Lee B. 1995. Ultrasonography and endocrinology of ovarian dysfunction in heifers with estradiol valerate. *Theriogenology*. 43: 1061-1076.
- Caubo, B., Tonetta, S.A., 1989. Binding sites for IGF-I identified on theca cells from large porcine follicles. En: Hirshfield AN (ed), *Growth Factors and the Ovary*. New York: Raven Press. 1, 69-174.
- Christians JK, de Zwaan DR, Fung SH. 2013. Pregnancy associated plasma protein A2 (PAPP-A2) affects bone size and shape and contributes to natural variation in postnatal growth in mice. *PLoS One*. 8:56260.
- Colman-Lerner AA, Salamone DF, Chiappe ME, Barañao JL. 1995. Comparative studies between freshly isolated and spontaneously immortalized bovine granulosa cells: protein secretion, steroid metabolism, and responsiveness to growth factors. *J Cell Physiol*.164:395-403.
- Conover CA, Faessen GF, Ilg KE, Chandrasekher YA, Christiansen M, Overgaard MT, Oxvig C, Giudice LC. 2001. Pregnancy-associated plasma protein-a is the insulin-like growth factor binding protein-4 protease secreted by human ovarian granulosa cells and is a marker of dominant follicle selection and the corpus luteum. *Endocrinology*.142:2155.
- Conover CA. 2012. Key questions and answers about pregnancy-associated plasma protein-A. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 23:5.
- Cook DL, Parfet JR, Smith CA, Moss GE, Youngquist RS, Garverick HA. 1991. Secretory patterns of LH and FSH during development and hypothalamic and hypophyseal characteristics following development of steroid-induced ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J Reprod Fertil*. 91: 19-28.
- Davidson TR, Chamberlain CS, Bridges TS, Spicer LJ. 2002. Effect of Follicle Size on In Vitro Production of Steroids and Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I, IGF-II, and the IGF-Binding Proteins by Equine Ovarian Granulosa Cells. *Biology of reproduction* 66,1640–1648.
- de la Sota RL, Simmen FA, Diaz T, Thatcher WW. 1996. Insulin-Like Growth Factor System in Bovine First-Wave Dominant and Subordinate Follicles. *Biology of reproduction* 55, 803-812.

- De Silva M, Reeves JJ. 1988. Hypothalamic-Pituitary function in chronically cystic and regularly cycling dairy cows. *Biol. Reprod.* 38: 264-269.
- Delgado Motta PA, Cuéllar NR, González Sánchez CM, Castro Rojas EC. 2011. Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *Vet.zootec.* 5: 88-99.
- Dellmann HD, Eurell JA. 1998. *Textbook of veterinary histology*, 5th ed. London: Williams & Wilkins. p. 252.
- Dobson H, Smith RF. 1995. Stress and reproduction in farm animals. *J Reprod Fertil Suppl.* 49:451-61.
- Dobson H, Ribadu AY, Noble KM, Tebble JE, Ward WR. 2000. Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 120: 405-10.
- Drummond AE. 2006. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol.* 4: 16.
- Echternkamp SE, Spicer LJ, Gregory KE, Canning SF, Hammond JM. 1990. Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol Reprod.* 43:8-14.
- Echternkamp SE, Howard HJ, Roberts AJ, Grizzle J, Wise T. 1994. Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. *Biol Reprod.* 51:971-81.
- Echternkamp SE, Roberts AJ, Lunstra DD, Wise T, Spicer LJ. 2004. Ovarian follicular development in cattle selected for twin ovulations and births. *J Anim Sci.*;82:459-71.
- El-Hayek S, Demeestere I, Clarke HJ. 2014. Follicle-stimulating hormone regulates expression and activity of epidermal growth factor receptor in the murine ovarian follicle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25;111:16778-83.
- El-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, LeRoith D, Roberts CT Jr, Yen SS. 1993. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin

- receptor genes and localization of the gene products in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 77:1411-8.
- El-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, Shimasakai S, Ling N, LeRoith D, Roberts CT Jr, Yen SS. 1994. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 78:1488-96.
- Enciclopedia Bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Primera edición. 2008. Universidad Nacional Autónoma de México. Capítulo 10. P393.
- Endo N, Nagai K, Tanaka T, Kamomae H. 2012. Comparison between lactating and non-lactating dairy cows on follicular growth and corpus luteum development, and endocrine patterns of ovarian steroids and luteinizing hormone in the estrous cycles. *Anim Reprod Sci.* 134: 112-118.
- Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829–838.
- Erb RE, Monk EL, Callahan CJ, Mollet TA. 1973. Endocrinology of induced ovarian follicular cysts. *J Anim Sci.* 37: 310.
- Espinoza-Villavicencio JL, Ortega Pérez R, Palacios Espinosa A, Valencia Méndez J, Aréchiga Flores CF. 2007. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia.* 32: 93-99.
- Etherton TD, Bauman DE. 1998. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev.* 78:745-61.
- Fathala MA, Geissenger HD, Liptrap RM. 1978. Effects of endometrial damage and prostaglandin F2a in experimental cystic ovarian follicles in the cow. *Res Vet Sci.* 25: 269-279.
- Ferreira R, Gasperin B, Santos J, Rovani M, Santos RA, Gutierrez K, Oliveira JF, Reis AM, Gonçalves PB. 2011. Angiotensin II profile and mRNA encoding RAS proteins during bovine follicular wave. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 12:475-82.

- Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. 2011. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci.*124:163-9
- Fortune JE1, Rivera GM, Yang MY. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci.* 82-83:109-26.
- Funston RN, Seidel GE, Klindt J, Roberts AJ. 1996. Insulin-Like Growth Factor I and Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins in Bovine Serum and Follicular Fluid before and after the Preovulatory Surge of Luteinizing Hormone. *Biology of reproduction* 55, 1390-1396.
- Gaidamauskas E, Gyrop C, Boldt HB, Schack VR, Overgaard MT, Laursen LS, Oxvig C. 2013. IGF dependent modulation of IGF binding protein (IGFBP) proteolysis by pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): Multiple PAPP-A-IGFBP interaction sites. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 2701–2709.
- Garnero O, Perusia O. 2002. Manual de anestésias y cirugías del bovino. 1a edición. Editorial Imprenta San Cayetano, Santa Fe, Argentina. p. 125.
- Gartner LP, Hiatt JL. 1997. Histología. Texto y Atlas. McGraw-Hill Interamericana, México. P. 506.
- Garverick HA. 1997. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 80:995-1004.
- Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. 2001. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod.* 65:638-47.
- Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Kot K. 2002. Activin A, Estradiol, and Free Insulin-Like Growth Factor I in Follicular Fluid Preceding the Experimental Assumption of Follicle Dominance in Cattle. *Biology of reproduction* 67,14–19.
- Giudice L. 1992. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocrinology. Rev.* 13:641-69.
- Gong JG, McBride D, Bramley TA, Webb R. 1994. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. *J Endocrinol.*143:157-64.

- Goodman AL, Hodgen GD. 1983. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res.* 39:1-73.
- Grimard B, Marquant-Leguienne B, Remy D, Richard C, Nuttinck F, Humblot P, Ponter AA. 2013. Postpartum variations of plasma IGF and IGFBPs, oocyte production and quality in dairy cows: relationships with parity and subsequent fertility. *Reprod Domest Anim.* 48:183-94
- Grimes RW, Barber JA, Shimasaki S, Ling N, Hammond JM. 1994. Porcine ovarian granulosa cells secrete insulin-like growth factor-binding proteins-4 and -5 and express their messenger ribonucleic acids: regulation by follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-1. *Biol Reprod.* 50:695-701.
- Gutiérrez CG, Campbell BK, Webb R. 1997. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod.* 56:608-16.
- Gutteridge JM, Halliwell B. 1989. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol.* 2:195-256.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ma. Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. D.F. México.
- Hamilton SA, Garverick HA, Keisler DH, Xu ZZ, Loos K, Youngquist RS, Salfen BE. 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol Reprod.* 53: 890-898.
- Hammond JM, Mondschein JS, Samaras SE, Canning SF. 1991. The ovarian insulin-like growth factors, a local amplification mechanism for steroidogenesis and hormone action. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 40:411-6.
- Hastie PM, Onagbesan OM, Haresign W. 2004. Co-expression of messenger ribonucleic acids encoding IGF-I, IGF-II, type I and II IGF receptors and IGF-binding proteins (IGFBP-1 to -6) during follicular development in the ovary of seasonally anoestrous ewes. *Anim Reprod Sci.* 84:93-105.

- Hastie PM, Haresign W. 2006a. Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor (IGF) ligands, IGF receptors and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci.* 92:284-99.
- Hastie PM, Haresign W. 2006b. A role for LH in the regulation of expression of mRNAs encoding components of the insulin-like growth factor (IGF) system in the ovine corpus luteum. *Anim Reprod Sci.* 96:196-209.
- Hastie PM, Haresign W. 2008. Modulating peripheral gonadotrophin levels affects follicular expression of mRNAs encoding insulin-like growth factors and receptors in sheep. *Anim Reprod Sci.* 109:110-23.
- Hastie PM, Haresign W. 2010. Modulating peripheral gonadotrophin levels affects follicular expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor binding proteins in sheep. *Anim Reprod Sci* 119:198-204.
- Hatler TB, Hayes SH, Laranja da Fonseca LF, Silvia WJ. 2003. Relationship between endogenous progesterone and follicular dynamics in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts. *Biol Reprod.* 69: 218-223.
- Hein, GJ, Panzani CG, Rodríguez FM, Benítez GA, Huber E, Salvetti NR, Ortega HH, Rey F. Expresión diferencial de componentes de la cascada de señalización intracelular como moduladores de la respuesta a insulina en folículos ováricos de bovinos con enfermedad quística. Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Buenos Aires. Noviembre de 2013. P.246.
- Hooijer GA, Lubbers RB, Ducro BJ, van Arendonk JA, Kaal-Lansbergen LM, van der Lende T. 2001. Genetic parameters for cystic ovarian disease in Dutch Black and White dairy cattle. *J Dairy Sci.* 8: 286-291.
- Hooijer GA. 2003. Cystic ovarian disease in dairy cattle. Treatment, heritability, and epidemiology. Utrecht. Netherlands. P11-33.
- Hooijer GA, van Oijen MA, Frankena K, Noordhuizen JP. 2005. Influence of negative energy balance on the reproductive performance after treatment of cystic

- ovarian disease with gonadotrophin-releasing hormone in dairy cows. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 52:298-304.
- Hourvitz A, Widger AE, Filho FL, Chang RJ, Adashi EY, Erickson GF. 2000. Pregnancy-associated plasma protein-A gene expression in human ovaries is restricted to healthy follicles and corpora lutea. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(12):4916-20.
- Hsu CJ, Hammond JM. 1987. Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology.* 120:198-207.
- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev.* 20:761-87.
- Isobe N. 2007. Follicular cysts in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 78:1–6.
- Isobe N, Yoshimura Y. 2007. Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle. *J Reprod Dev.* 53: 1119-1124.
- Iwashita M, Kudo Y, Takeda Y. 1998. Effect of follicle stimulating hormone and insulin-like growth factors on proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-4 in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod.* 4:401-5.
- Johnston W, Jou P, Buckrell B. 1997. Cystic ovarian disease a new perspective. *Proceedings of Annual Meeting of the 37 Society for Theriogenology, Montreal, Canada.* p. 98-107.
- Jones JI, Clemmons DR. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrinology. Rev.* 16:3-34.
- Kamangar BB, Gabillard JC, Bobe J. 2006. Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-1, -2, -3, -4, -5, and -6 and IGFBP-related protein 1 during rainbow trout postvitellogenesis and oocyte maturation: molecular characterization, expression profiles, and hormonal regulation. *Endocrinology.* 147:2399-410.
- Kamanga-Sollo E, White ME, Weber WJ, Dayton WR. 2013. Role of estrogen receptor- α (ESR1) and the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGFR1) in estradiol-stimulated proliferation of cultured bovine satellite cells. *Domest Anim Endocrinol.* 44:36-45.

- Kavran JM, McCabe JM, Byrne PO, Connacher MK, Wang Z, Ramek A, Sarabipour S, Shan Y, Shaw DE, Hristova K, Cole PA, Leahy DJ. 2014. How IGF-1 activates its receptor. *Elife*. 25;3.
- Kawashima C, Fukihara S, Maeda M, Kaneko E, Montoya CA, Matsui M, Shimizu T, Matsunaga N, Kida K, Miyake Y, Schams D, Miyamoto A. 2007. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction*. 133:155-63.
- Kawate N, Inaba T, Mori J. 1990. A quantitative comparison in the bovine of steroids and gonadotropin receptors in normally developing follicles and in follicular and luteinized cysts. *Anim Reprod Sci*. 23: 273-281.
- Kawate N, Inaba T, Mori J. 1996. Changes in plasma concentrations of gonadotropins and steroid hormones during the formation of bovine follicular cysts induced by the administration of ACTH. *J Vet Med Sci*. 58: 141-144.
- Kinder J, Kojima F, Bergfeld E, Wehrman M, Fike K. 1996. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J Anim Sci*. 74: 1424-1440.
- Kwiontkiewicz J, Giudice LC. 2009. The Interplay of Insulin-Like Growth Factors, Gonadotropins, and Endocrine Disruptors in Ovarian Follicular Development and Function. *Seminars in reproductive medicine*. 27: 43-51.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagaly DV, Aad PY, Grado-Ahuir JA, Hulsey LB, Spicer LJ. 2008. Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Mol. Cell Endocrinol*. 284, 38-45.
- Langhout DJ, Spicer LJ, Geisert RD. 1991. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. *J Anim Sci*. 69:3321-34.

- Lee J, Menon RK. 2005. Molecular defects in the growth hormone-IGF axis. *Indian J Pediatr.* 72:145-8.
- Leeuwenberg BR, Hurst PR, McNatty KP. 1995. Expression of IGF-I mRNA in the ovine ovary. *J Mol Endocrinol.* 15:251-8.
- LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr. 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev.* 16:143-63.
- Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, Dewulf J, de Kruif A. 2004. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology.* 62:1131-43.
- Liefers SC, Veerkamp RF, te Pas MF, Delavaud C, Chilliard Y, van der Lende T. 2003. Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight, and estrus in dairy cows. *J Dairy Sci.* 86:799-807.
- Liptrap RM, McNally PJ. 1976. Steroid concentrations in cows with corticotropin-induced cystic ovarian follicles and the effect of prostaglandin F₂alpha and indomethacin given by intrauterine injection. *Am J Vet Res.* 37: 369-375.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data usingm real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method. *Methods.* 25, 402-408.
- Llewellyn S, Fitzpatrick R, Kenny DA, Murphy JJ, Scaramuzzi RJ, Wathes DC. 2007. Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system in pre-recruitment ovarian follicles of post partum dairy cows. *Reproduction.* 133:627-39.
- Llewellyn, S., Fitzpatrick, R., Kenny, D.A., Patton, J., Wathes, D.C., 2008. Endometrial expression of the insulin-like growth factor system during uterine involution in the postpartum dairy cow. *Domest. Anim. Endocrinol.* 34, 391-402.
- Lopez-Diaz MC, Bosu WTK. 1992. A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. *Theriogenology.* 37: 1163-1183.

- Lucy M. 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.* 83:1635-47.
- Lucy M. 2008. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reprod Domest Anim.* 43:31-9.
- Mani AM, Fenwick MA, Cheng Z, Sharma K, Singh D, Wathes DC. 2010. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositoldependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction* 139:139–151.
- Marelli B, Díaz PU, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. 2014. mRNA expression pattern of gonadotropin receptors in bovine follicular cysts. *Reproductive Biology*. En prensa
- Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. 2012. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev.* 58: 44-50.
- Matsui M, Sonntag B, Hwang SS, Byerly T, Hourvitz A, Adashi EY, Shimasaki S, Erickson GF. 2004. Pregnancy-associated plasma protein-a production in rat granulosa cells: stimulation by follicle-stimulating hormone and inhibition by the oocyte-derived bone morphogenetic protein-15. 2004. *Endocrinology.* 145:3686-95.
- Mazerbourg S, Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M, Conover C, Laurendeau I, Vidaud M, Tosser-klopp G, Zapf J, Monget P. 2001. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) in Ovine, Bovine, Porcine, and Equine Ovarian Follicles: Involvement in IGF Binding Protein-4 Proteolytic Degradation and mRNA Expression During Follicular Development. *Endocrinology* 142:5243–5253.
- Mihm M, Austin EJ. 2002. The final stages of dominant follicle selection in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 23: 155-166.
- Monget P, Monniaux D, Pisselet C, Durand P. 1993. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology.* 132:1438-46.

- Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C, Monniaux D. 1996. Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. *Horm. Res.* 45:211-7.
- Monget P, Bondy C. 2000. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 25;163:89-93.
- Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen JM, Mazerbourg S, Pisselet C, Monniaux D. 2002. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 139–154.
- Monget P, Mazerbourg S, Delpuech T, Maurel MC, Maniere S, Zapf J, Gilles Lalmanach, Oxvig C, Overgaard MT. 2003. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A Is Involved in Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 (IGFBP-2) Proteolytic Degradation in Bovine and Porcine Preovulatory Follicles: Identification of Cleavage Site and Characterization of IGFBP-2 Degradation. *Biology of reproduction* 68:77–86.
- Moser DR, Lowe WL Jr, Dake BL, Booth BA, Boes M, Clemmons DR, Bar RS. 1992. Endothelial cells express insulin-like growth factorbinding proteins 2 to 6. *Mol. Endocrinol.* 6, 1805–1814.
- Nadaraja R, Hansel W, 1976. Hormonal changes associated with experimentally produced cystic ovaries in the cow. *J Reprod Fertil.* 47: 203-208.
- Nelson ST, Martin AD, Osteras O. 2010. Risk factors associated with cystic ovarian disease in Norwegian dairy cattle. *Acta Vet Scand.* 52: 60.
- Nicholas B, Scougall RK, Armstrong DG, Webb R. 2002. Changes in insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) isoforms during bovine follicular development. *Reproduction* 124, 439–446.
- Ning Y, Schuller AG, Conover CA, Pintar JE. 2008. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 is both a positive and negative regulator of IGF activity in vivo. *Mol Endocrinol.* 22:1213-25
- Odore R, Re G, Badino P, Donn A, Vigo D, Biolatti B, Girardi C. 1999. Modifications of receptor concentrations for adrenaline, steroid hormones, prostaglandin F₂ α

- and gonadotropins in hypophysis and ovary of dairy cows with ovarian cysts. *Pharmacol Res.* 39: 297-304.
- Opsomer G, Mijten P, Coryn M, de Kruif A. 1996. Post-partum anoestrus in dairy cows: a review. *Vet Q.*18:68-75.
- Opsomer G, Wensing T, Laevens H, Coryn M, de Kruif A. 1999. Insulin resistance: the link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows? *Anim Reprod Sci.* 56:211-22.
- Ortega HH, Salvetti NR, Amable P, Dallard BE, Baravalle C, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2007a. Intraovarian localization of growth factors in induced cystic ovaries in rats. *Anat Histol Embryol.* 36:94-102.
- Ortega HH, Salvetti NR, Müller LA, Amable P, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2007b. Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with cystic ovarian disease. *J Comp Pathol.*136:222-30.
- Ortega HH, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2008. Insulin-like growth factor I in ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous and induced cystic ovarian disease. *Res. in Vet. Sci.* 84:419-27.
- Ortega HH, Salvetti NR, Padmanabhan V. 2009. Developmental programming: prenatal androgen excess disrupts ovarian steroid receptor balance. *Reproduction.* 137:865-77
- Ortega HH, Rey F, Velazquez MM, Padmanabhan V. 2010. Developmental programming: effect of prenatal steroid excess on intraovarian components of insulin signaling pathway and related proteins in sheep. *Biol Reprod.* 82:1065-75
- Palma GA. 2008. *Biotechnología de la reproducción. Capítulo 2: Biología de la reproducción.* 2da. Edición. *Repro Biotec.* p. 59.
- Parrott JA., Skinner MK. 1998. Developmental and hormonal regulation of hepatocyte growth factor expression and action in the bovine ovarian follicle. *Biol. Reprod.* 59:553–560.

- Pereira SA. 2013. Efeito da Presença da Insulina-Transferrina-Selênio (ITS) e L-ácido Ascórbico (AA) na Produção in vitro de Embriões Bovinos. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. Brasil.
- Perks CM, Denning-Kendall PA, Gilmour RS, Wathes DC. 1995. Localization of messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and the type 1 IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 136:5266-73.
- Perks CM, Wathes DC. 1996. Expression of mRNAs for insulin-like growth factor binding proteins-2, -3 and -4 in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *J Endocrinol.*151:241-9.
- Perks CM, Peters AR, Wathes DC. 1999. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. *J Reprod Fertil.* 116:157-65.
- Peter AT, Malven PV, Shaftoe S, Bosu WTK. 1991. Quantification of circulating beta-endorphin and white blood cells in heifers after intrauterine administration of *Escherichia coli* endotoxin. *Theriogenology.* 36: 1009-1014.
- Peter AT. 1997. Infertility due to abnormalities of the ovaries. En: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (Ed. Youngquist, RS) WB Saunders, Philadelphia. p. 349-354.
- Peter AT. 2000. Managing postpartum health and cystic ovarian disease. *Proceed Eighteenth Annual Western Canadian Dairy Seminar: Advances in Dairy Technology.* Alberta. Canada. p. 85-99.
- Peter AT, Dhanasekaran N. 2003. Apoptosis of granulosa cells: a review on the role of MAPK-signaling modules. *Reprod Dom Anim.* 38: 209-213.
- Peter AT. 2004. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod Dom Anim.* 39: 1-7.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 2003-2007.

- Pfaffl MW, Georgieva TM, Georgiev IP, Ontsouka E, Hageleit M, Blum JW. 2002. Realtime RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domest. Anim. Endocrinol.* 22, 91–102.
- Piñon P, Kaski JC. 2006. Inflamación, aterosclerosis y riesgo cardiovascular: PAPP-A, Lp-PLA2 y cistatina C. Nuevas aportaciones o información redundante?. *Rev Esp Cardiol.* 59:247-58.
- Plath-Gabler A, Gabler C, Sinowatz F, Berisha B, Schams D. 2001. The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland. *J. Endocrinol.* 168, 39–48.
- Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. 1999. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev.* 20:535-82. Review.
- Probo M, Comin A, Cairoli F, Faustini M, Kindahl H, De Amicis I, Veronesi MC. 2011. Selected metabolic and hormonal profiles during maintenance of spontaneous ovarian cysts in dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 46:448-54.
- Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. 1997. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr. Rev.* 18:801-31.
- Rechler MM, Clemmons DR. 1998. Regulatory Actions of Insulin-like Growth Factor-binding Proteins. *TEM* 9, 5.
- Refsal KR, Jarrin-Maldonado JH, Nachreiner RF. 1987. Endocrine profiles in cows with ovarian cysts experimentally induced by treatment with exogenous estradiol or adrenocorticotrophic hormone. *Theriogenology.* 28: 871-889.
- Rey F, Rodríguez FM, Salvetti NR, Palomar MM, Barbeito CG, Alfaro NS, Ortega HH. 2010. Insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor-binding proteins in bovine cystic ovarian disease. *J Comp Pathol.* 142: 193-204.
- Rhoton-Vlasak A, Gleich GJ, Bischof P, Chegini N. 2003. Localization and cellular distribution of pregnancy-associated plasma protein-a and major basic protein

- in human ovary and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril.* 79(5):1149-53.
- Ribadu AY, Nakada K, Moriyoshi M, Zhang WC, Tanaka Y, Nakao T. 2000. The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 64:21-31.
- Rivera GM, Fortune JE. 2001. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. *Biol Reprod.* 65:112-8.
- Rivera GM, Fortune JE. 2003a. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. *Endocrinology.* 144:437-46.
- Rivera GM, Fortune JE. 2003b. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology.* 144:2977-87.
- Rizzo A, Campanile D, Mutinati M, Minoia G, Spedicato M, Sciorsci RL. 2011. Epidural vs intramuscular administration of lecorelin, a GnRH analogue, for the resolution of follicular cysts in dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 126: 19-22.
- Roa J, Castellano JM, Navarro VM, Handelsman DJ, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2009. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides* 30:57-66.
- Roberts AJ, Echterkamp SE. 1994. In vitro production of estradiol by bovine granulosa cells: evaluation of culture condition, stage of follicular development, and location of cells within follicles. *Biol Reprod.* 51:273-82.
- Roberts AJ, Echterkamp SE. 2003. Insulin-like growth factor binding proteins in granulosa and thecal cells from bovine ovarian follicles at different stages of development. *J Anim Sci.* 81:2826-39.
- Roche JF. 1996. Control and regulation of folliculogenesis-a symposium in perspective. *Rev Reprod.* 1: 19-27.

- Ross M, Kaye G, Pawlina W. 2004. Electronic Image Collection for Histology. A text and Atlas with cell and molecular biology. 4ta Edición. Eds. Lippincot Williams and Wilkins.
- Roth Z, Biran D, Lavon Y, Dafni I, Yakobi S, Braw-Tal R. 2012. Endocrine milieu and developmental dynamics of ovarian cysts and persistent follicles in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci.* 95:1729-37
- Rukkwamsuk T, Geelen MJ, Kruij TA, Wensing T. 2000. Interrelation of fatty acid composition in adipose tissue, serum, and liver of dairy cows during the development of fatty liver postpartum. *J Dairy Sci.* 83:52-9.
- Ryan KE, Glister C, Lonergan P, Martin F, Knight PG, Evans AC. 2008. Functional significance of the signal transduction pathways Akt and Erk in ovarian follicles: in vitro and in vivo studies in cattle and sheep. *J Ovarian Res.*1;1:2.
- Salvetti NR, Gimeno EJ, Lorente JA, Ortega HH. 2004. Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. *Cells Tissues Organs.* 178:117-25.
- Salvetti NR, Acosta JC, Gimeno JE, Muller LA, Mazzini RA, Taboada AF, Ortega HH. 2007. Estrogen Receptors α and β and Progesterone Receptors in Ovarian Follicles of Cows with Cystic Ovarian Disease. *Vet. Pathol.* 44:373-8.
- Salvetti NR, Stangaferro ML, Palomar MM, Alfaro NS, Rey F, Gimeno EJ, Ortega HH. 2010. Cell proliferation and survival mechanisms underlying the abnormal persistence of follicular cysts in bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Anim Reprod Sci.* 122: 98-110.
- Samaras SE, Canning SF, Barber JA, Simmen FA, Hammond JM. 1996. Regulation of insulin-like growth factor I biosynthesis in porcine granulosa cells. *Endocrinology.*137:4657-64.
- Samoto T, Maruo T, Matsuo H, Katayama K, Barnea ER, Mochizuki M. 1993. Altered expression of insulin and insulin-like growth factor-I receptors in follicular and stromal compartments of polycystic ovaries. *Endocr J.* 40:413-24.

- Sanchez R, Schuermann Y, Gagnon-Duval L, Baldassarre H, Murphy BD, Gevry N, Agellon LB, Bordignon V, Duggavathi R. 2014. Differential abundance of IGF1, bile acids, and the genes involved in their signaling in the dominant follicle microenvironment of lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*. 1;81(6):771-9.
- Santiago C, Voge JL, Aad PY, Allen DT, Stein DR, Malayer JR, Spicer LJ. 2005. Pregnancy-associated plasma protein-A and insulin-like growth factor binding protein mRNAs in granulosa cells of dominant and subordinate follicles of preovulatory cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 28, 46–63.
- Schams D, Berisha B, Kosmann M, Amselgruber WM. 2002. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. *Domest Anim Endocrinol*.22:51-72.
- Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Andrade ER, Binelli M, Oliveira JA, Nascimento AB. 2003. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*. 59(5-6):1435-40.
- Shibaya M, Matsuda A, Hojo T, Acosta TJ, Okuda K. 2007. Expressions of estrogen receptors in the bovine corpus luteum: cyclic changes and effects of prostaglandin F2alpha and cytokines. *J. Reprod. Dev.* 53, 1059–1068.
- Silva JR, Figueiredo JR, van den Hurk R. 2009. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*. 71:1193-208.
- Silva PV, Guimarães SEF, Guimarães JD, Neto JB, Lopes PS, do Nascimento CS, de Campos CF, Weller MMCA, Botelho ME, Faria VR. 2011. Gene expression in swine granulosa cells and ovarian tissue during the estrous cycle. *Genetics and Molecular Research* 10: 2258-2267.
- Silvia WJ, Alter TB, Nugent AM, Laranja da Fonseca LF. 2002. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest. Anim. Endocrinol*. 23:167-77.

- Silvia WJ, McGinnis AS, Hatler TB. 2005. A comparison of adrenal gland function in lactating dairy cows with or without ovarian follicular cysts. *Reprod Biol.* 5: 19-29.
- Sirois J, Fortune JE. 1988. Ovarian follicular dynamics during estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod.* 39: 308-317.
- Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ. 2004. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17;101:2076-81.
- Souza Lenz MI, Ramirez Benavidez GF, Uribe Velásquez LF. 2007. Papel del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF1) en la regulación de la función ovárica. *Biosalud.* 6, 149-159.
- Spicer LJ, Enright WJ, Murphy MG, Roche JF. 1991. Effect of dietary intake on concentrations of insulin-like growth factor-I in plasma and follicular fluid, and ovarian function in heifers. *Domest Anim Endocrinol.* 8:431-7.
- Spicer LJ, Crowe MA, Prendiville DJ, Goulding D, Enright WJ. 1992. Systemic but not intraovarian concentrations of insulin-like growth factor-I are affected by short-term fasting. *Biol Reprod.* 46:920-5.
- Spicer LJ, Alpizar E, Echterkamp SE. 1993. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J Anim Sci.* 71:1232-41.
- Spicer LJ, Alpizar E, Vernon RK. 1994. Insulin-like growth factor-I receptors in ovarian granulosa cells: effect of follicle size and hormones. *Mol Cell Endocrinol.* 102:69-76.
- Spicer LJ, Echterkamp SE. 1995. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol.* 12:223-45.

- Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE. 1996. Insulin-like growth factor I enhancement of steroidogenesis by bovine granulosa cells and thecal cells: dependence on de novo cholesterol synthesis. *J Endocrinol.* 151:365-73.
- Spicer LJ, Chamberlain CS. 2000. Production of insulin-like growth factor-I by granulosa cells but not thecal cells is hormonally responsive in cattle. *J Anim Sci.* 78:2919-26.
- Spicer LJ, Alvarez P, Prado TM, Morgan GL, Hamilton TD. 2000. Effects of intraovarian infusion of insulin-like growth factor-I on ovarian follicular function in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 18:265-78.
- Spicer LJ, Chamberlain CS. 2002. Estradiol and luteinizing hormone regulation of insulin-like growth factor binding protein production by bovine granulosa and thecal cells. *Endocrine.* 17:161-8.
- Spicer LJ, Chamberlain CS, Maciel SM. 2002. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol* 22:237-54.
- Spicer LJ. 2004. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biol. Reprod.* 70:1223-30.
- Spicer LJ, Voge JL, Allen DT. 2004. Insulin-like growth factor-II stimulates steroidogenesis in cultured bovine thecal cells. *Mol Cell Endocrinol.* 30;227:1-7.
- Stangaferro M. 2013. Participación de miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en la patogenia de la enfermedad quística ovárica. Tesis de Maestría en Ciencias Veterinaria- Facultad de Ciencias Veterinaria. Universidad Nacional del Litoral. Argentina.
- Staples CR, Burke JM, Thatcher WW. 1998. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J Dairy Sci.* 81:856-71.
- Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE, Dawson LJ, Morgan GL, Echterkamp SE. 1996. Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first

- follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles. *Endocrinology* 137:2842-50.
- Sudo N, Shimizu T, Kawashima C, Kaneko E, Tetsuka M, Miyamoto A. 2007. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: relationship among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). *Mol Cell Endocrinol.* 264:197-203.
- Suzuki C, Yoshioka K, Iwamura S, Hirose H. 2001. Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous in Holstein heifers. *Domest Anim Endocrinol.* 20: 267-278.
- Thierry van Dessel HJ, Lee PD, Faessen G, Fauser BC, Giudice LC. 1999. Elevated serum levels of free insulin-like growth factor I in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:3030-5.
- Thomas FH, Campbell BK, Armstrong DG, Telfer EE. 2007. Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development in vitro. *Reproduction.* 133:1121-8
- Ui M, Shimonaka M, Shimasaki S, Ling N. 1989 An insulin-like growth factor-binding protein in ovarian follicular fluid blocks follicle-stimulating hormone-stimulated steroid production by ovarian granulosa cells. *Endocrinology.* 125:912-916
- Ungerfeld R. 2002. Reproducción en los animales domésticos. Tomo I. Melibea ediciones. Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay.
- van Kleffens M, Groffen CA, Dits NF, Lindenbergh-Kortleve DJ, Schuller AG, Bradshaw SL, Pintar JE, Zwarthoff EC, Drop SL, van Neck JW. 1999. Generation of antisera to mouse insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP)-1 to -6: comparison of IGFBP protein and messenger ribonucleic acid localization in the mouse embryo. *Endocrinology.* 140:5944-52.
- Vanholder T, Opsomer G, de Kruif A. 2006. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nutr Dev.* 46:105-19.
- Velazquez MA, Spicer LJ, Wathes DC. 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domest Anim Endocrinol.* 35:325-42

- Voge JL, Santiago CA, Aad PY, Goad DW, Malayer JR, Spicer LJ. 2004. Quantification of insulin-like growth factor binding protein mRNA using real-time PCR in bovine granulosa and theca cells: effect of estradiol, insulin, and gonadotropins. *Domest Anim Endocrinol.* 26:241-58
- Wandji SA, Pelletier G, Sirard MA. 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.* 47:814-22.
- Wathes DC, Perks CM, Davis AJ, Denning-Kendall PA. 1995. Regulation of insulin-like growth factor-I and progesterone synthesis by insulin and growth hormone in the ovine ovary. *Biol Reprod.* 53:882-9.
- Wathes DC, Taylor VJ, Cheng Z, Mann GE. 2003. Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. *Reprod Suppl.* 61:219-37
- Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci.* 82: 63-74.
- Williams CY, Harris TG, Battaglia DF, Viguie C, Karsch FJ. 2001. Endotoxin inhibits pituitary responsiveness to gonadotrophin-releasing hormone. *Endocrinology.* 142: 1915-1922.
- Wiltbank JN. 1966. Modification of ovarian activity in the bovine following injection of oestrogen and gonadotrophin. *J Reprod Fertil.* 1: 1-10.
- Wiltbank M, Gümen A, Sartori R. 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology.* 57: 21-52.
- Winters TA, Cook DL, Callahan CJ, Allrich RD. 1986. Induction of ovarian cysts in cattle by injection of progesterone and oestradiol-17 β . *J Anim Sci* 63: 361.
- Woolums AR, Peter AT. 1994b. Cystic ovarian condition in cattle. Part II. Pathogenesis and treatment. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 16: 1247-1254.

- Yang WC, Yang LG, Riaz H, Tang KQ, Chen L, Li SJ. 2013. Effects in cattle of genetic variation within the IGF1R gene on the superovulation performance and pregnancy rates after embryo transfer. *Anim Reprod Sci.* 143:24-9.
- Yuan W, Lucy MC, Smith MF. 1996. Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and -II, insulin-like growth factor-binding protein-2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. *Biol Reprod.* 55:1045-54.
- Yuan W, Bao B, Garverick HA, Youngquist RS, Lucy MC. 1998. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15:55-63.
- Zhang L, Smith DW, Gardiner BS, Grodzinsky AJ. 2013. Modeling the Insulin-Like Growth Factor System in Articular Cartilage. *PLoS ONE* 8(6): e66870.
- Zhou J, Adesanya OO, Vatzias G, Hammond JM. 1996. Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. *Endocrinology* 137: 4893-4901.
- Zulu VC, Penny C. 1998. Risk factors of cystic ovarian disease in dairy cattle. *J Reprod Physiol.* 44: 191-195.
- Zulu VC, Sawamukai Y, Nakada K, Kida K, Moriyoshi M. 2002. Relationship among insulin-like growth factor-I, blood metabolites and postpartum ovarian function in dairy cows. *J Vet Med Sci.* 64:879-85.