



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE
RECEPTORES HORMONALES Y DEL BALANCE
PROLIFERACIÓN/APOPTOSIS EN LAS DIFERENTES
ESTRUCTURAS OVÁRICAS EN LA ENFERMEDAD
QUÍSTICA OVÁRICA BOVINA**

AUTORA: Vet. (MSc) NATALIA RAQUEL SALVETTI

DIRECTOR: DR. HUGO HÉCTOR ORTEGA

CO-DIRECTOR: DR. EDUARDO JUAN GIMENO

*“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia,
no podrá comprender su tiranía”
Mary Shelley (1797-1851)*

*Dedico este trabajo a mis padres de quienes siempre recibí apoyo
y a los que les debo esta pasión por saber.*

...a mis amores: Sofía y Laureano.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que, con gran esfuerzo, permitió que realizara mi sueño, por su apoyo incondicional y soporte emocional.

A mi director y amigo, Dr. Hugo Ortega, por su infinita paciencia y por estar siempre en los momentos precisos para dar una mano.

A mi codirector, Dr. Eduardo Gimeno, por estar disponible a resolver problemas y corregir manuscritos.

A mis amigos y compañeros de la Cátedra de Histología y Embriología por haberme alentado en este proyecto, por haber estado siempre dispuestos a colaborar durante todos estos años.

A mis compañeros de trabajo en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular.

A la Universidad Nacional de Litoral que a través del otorgamiento de subsidios y becas permitió la realización de este trabajo.

A los docentes, no-docentes y amigos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral.

A aquellos que contribuyeron directa e indirectamente en la realización de esta tesis, y que por una traición de mi memoria no fueron citados.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS UTILIZADAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	viii
SUMMARY	x
1- INTRODUCCIÓN	1
1.1. Histofisiología Ovárica.....	3
1.1.1. <i>Desarrollo folicular</i>	5
1.1.2. <i>Atresia folicular</i>	6
1.1.3. <i>Regulación de la Foliculogénesis</i>	7
1.1.4. <i>Factores involucrados en la foliculogénesis</i>	9
1.1.4.1. <i>Ondas Foliculares</i>	10
1.1.5. <i>Características de la dinámica ovárica en el ciclo reproductivo en la hembra bovina</i>	14
1.2. Balance Proliferación/Apoptosis.....	16
1.2.1. <i>Proliferación celular en el ovario</i>	16
1.2.1.1. <i>Mecanismos de control del ciclo celular en el ovario</i>	17
1.2.1.2. <i>Marcadores de proliferación celular</i>	19
1.2.2. <i>Apoptosis</i>	19
1.3. Hormonas esteroides y sus receptores.....	20
1.3.1. <i>Características Generales</i>	20
1.3.1.1. <i>Progesterona</i>	21
1.3.1.2. <i>Estrógenos</i>	22
1.4. Enfermedad Quística Ovárica.....	25
1.4.1. <i>Definición</i>	26
1.4.2. <i>Incidencia y prevalencia</i>	27
1.4.3. <i>Factores predisponentes en la formación de quistes ováricos</i>	27
1.4.3.1. <i>Factores Generales</i>	27
1.4.3.2. <i>Factores Específicos</i>	28
1.4.4. <i>Etiología y patogenia</i>	30
1.4.4.1. <i>Disfunción Hipotálamo-Hipofisaria</i>	31
1.4.4.2. <i>Disfunción ovárica</i>	33
1.4.5. <i>Dinámica folicular en la COD: Interacciones y perfiles hormonales</i>	34

1.4.6. Clasificación de los quistes ováricos.....	35
2-OBJETIVOS.....	37
2. 1. Objetivos generales.....	38
2. 2. Objetivos específicos.....	38
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1. Procedimientos realizados con animales.....	41
3.1.1. Modelo Experimental.....	41
3.1.2. Animales.....	41
3.1.3. Grupos experimentales.....	42
3.1.4. Ultrasonografía.....	43
3.1.5. Toma de las muestras.....	43
3.1.6. Obtención de material en playa de faena.....	44
3.1.7. Cuantificación de los niveles hormonales.....	45
3.1.7.1. Cuantificación de Gonadotrofinas.....	45
3.1.7.2. Cuantificación de estradiol, progesterona, testosterona y cortisol.....	45
3.2. Procesamiento de las muestras para las técnicas histológicas.....	45
3.3. Procesamiento de las muestras para Western Blot.....	45
3.4. Procesamiento de las muestras para RT-PCR.....	46
3.4.1. Extracción de ARN total.....	46
3.4.2. Transcripción Reversa.....	46
3.5. Evaluación de la proliferación celular.....	47
3.5.1. Inmunohistoquímica.....	47
3.5.2. Evaluación de la expresión de ARNm de ciclinas D1 y E mediante RT-PCR.....	49
3.6. Evaluación de la apoptosis.....	50
3.6.1. Proteínas relacionadas con la apoptosis evaluadas por inmunohistoquímica.....	50
3.6.2. TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labelling).....	50
3.6.3. Evaluación de la expresión de ARNm para Bax, Bcl-2 y relación Bax/Bcl-2 mediante RT-PCR.....	51
3.7. Receptores de Hormonas Esteroides.....	52
3.7.1. Inmunohistoquímica.....	52
3.7.2. Western Blot.....	52
3.8. Análisis de los resultados.....	54
3.9. Evaluación Estadística.....	55
4. RESULTADOS.....	56
4.1. Caracterización de la inducción de la COD.....	57

4.2. Niveles Hormonales.....	58
4.2.1. Niveles de hormonas séricas en animales con COD inducida con ACTH.....	58
4.2.2. Niveles de hormonas en líquido folicular.....	61
4.3. Evaluación de la proliferación celular.....	62
4.3.1. Expresión de Ki-67 por inmunohistoquímica.....	62
4.3.2. Expresión de ARNm de ciclinas.....	64
4.4. Evaluación de la apoptosis celular.....	65
4.4.1. Proteínas relacionadas con la apoptosis detectadas por inmunohistoquímica.....	65
4.4.1.1. Bax.....	65
4.4.1.2. Bcl-2.....	67
4.4.1.3. Caspasa-3.....	69
4.4.2. Determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados para detectar proteínas relacionadas con apoptosis mediante Western Blot.....	71
4.4.3. Expresión de ARNm de Bax, Bcl-2 y relación entre ambos.....	72
4.4.4. Detección de la apoptosis in situ (TUNEL).....	73
4.5. Expresión de receptores hormonales.....	74
4.5.1. Receptores de estrógenos α	74
4.5.1.1. Inmunohistoquímica.....	74
4.5.1.2. Western blot.....	77
4.5.2. Receptores de estrógenos β	78
4.5.2.1. Inmunohistoquímica.....	78
4.5.2.2. Western blot.....	81
4.5.3. Receptores de progesterona.....	82
4.5.3.1. Inmunohistoquímica.....	82
4.5.3.2. Western blot.....	85
5- DISCUSIÓN.....	87
5.1. Inducción de la enfermedad quística ovárica en bovinos.....	88
5.2. Balance proliferación/apoptosis en los folículos ováricos quísticos.....	88
5.3. Expresión de receptores hormonales.....	93
6- CONCLUSIONES.....	100
7-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
8-PUBLICACIONES.....	124

ABREVIATURAS UTILIZADAS

µm	micrómetros
3β-HSD	3-β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa
ACTH	Adrenocorticotrofina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMH	Hormona anti-mulleriana
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BrdU	Bromodeoxyuridina
cdk	Kinasas dependientes de ciclinas
COD	Enfermedad quística ovárica
CRH	Hormona liberadora de corticotrofina
DAB	Diaminobencidina
DBD	Dominio de unión al ADN
DE	Desvío estándar
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DOI	Densidad óptica integrada
dNTP	Desoxi-nucleósido trifosfato
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos
FSH	Hormona foliculoestimulante
GAPDH	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenada
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
h	Hora/horas
IGF-1	Factor de crecimiento análogo a insulina-1
IHQ	Inmunohistoquímica
IHCSA	Área marcada con inmunohistoquímica
KO	KnockOut
LBD	Dominio de unión al ligando
LF	Líquido folicular
LH	Hormona luteinizante
M	Molar

mA	Miliampéres
mg	Miligramos
MgCl	Cloruro de magnesio
MHz	Megahertzios
ml	Militros
mm	Milímetros
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCOD	Enfermedad Poliquística Ovárica
PCOS	Síndrome Poliquístico Ovárico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
POMC	Proopiomelanocortina
RE	Receptor de Estrógenos
REα	Receptor de estrógenos α
REαKO	REα Knock Out
REβ	Receptor de estrógenos β
REβKO	REβ Knock Out
PM	Peso Molecular
RP	Receptor de progesterona
RPA	Receptor de progesterona A
RPB	Receptor de progesterona B
RPAKO	RPA Knock Out
RPBKO	RPB Knock Out
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa
SDS	Sodio Dodecil Sulfato
TBS-T	Buffer Tris Salino-Tween
TGF	Factor de crecimiento transformante
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling.
UV	Ultravioleta
V	Voltios
WB	Western Blot

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.....	48
Tabla 2.	Cebadores sentido y antisentido para Bcl-2, Bax, ciclinas D1 y E bovinos y condiciones de la PCR.....	49
Tabla 3.	Estándares de PM para SDS-PAGE, amplio espectro.....	52
Tabla 4.	Anticuerpos utilizados en la técnica de Western Blot.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	A- En este esquema se muestra un corte longitudinal de un ovario adulto en el cual se observan las distintas categorías de folículos en crecimiento, como así también la ovulación, cuerpo lúteo y cuerpo blanco. B- en este dibujo se muestran las principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento con sus componentes. (Gartner y Hiatt 1997).....	6
Figura 2.	Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipofisario y el ovario. (Gartner y Hiatt, 1997).....	9
Figura 3.	Esquema que ilustra las ondas foliculares a través del ciclo estral del bovino.....	12
Figura 4.	Estructura de los receptores hormonales nucleares (Drummond y col., 2000).....	21
Figura 5.	Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes ováricos foliculares mediante de ACTH.....	42
Figura 6.	Ultrasonografía de un animal con un quiste folicular de 30mm en el ovario derecho.....	57
Figura 7.	Quiste folicular de más de 4 cm obtenido en playa de faena. Q: quiste.....	57
Figura 8.	Detalle de la pared folicular de un quiste de un animal con COD inducida.....	57
Figura 9.	Detalle de la pared folicular de un quiste de un animal con COD espontánea.....	57
Figura 10.	Niveles séricos de LH en animales tratados con ACTH y controles sincroizados desde el inicio del tratamiento con ACTH (día 15 del ciclo estral) hasta 10 días posteriores a la finalización del mismo.	59
Figura 11.	Niveles séricos de FSH en animales tratados con ACTH y controles sincroizados desde el inicio del tratamiento con ACTH (día 15 del ciclo estral) hasta 10 días posteriores a la finalización del mismo.	59
Figura 12.	Niveles séricos de Estradiol 17- β en animales tratados con ACTH y controles sincroizados desde el inicio del tratamiento con ACTH (día 15 del ciclo estral) hasta la finalización del mismo.....	60
Figura 13.	Niveles séricos de Progesterona en animales tratados con ACTH y controles sincroizados desde el inicio del tratamiento con ACTH (día 15 del ciclo estral) hasta la finalización del mismo.....	60
Figura 14.	Niveles séricos de Cortisol en animales tratados con ACTH y controles sincroizados desde el inicio del tratamiento con ACTH (día 15 del ciclo estral) hasta la finalización del mismo.....	60
Figura 15.	Niveles de 17- β -estradiol (E2) en líquido folicular de Folículos Antrales Grandes (FG): Quísticos inducidos (Qind) y espontáneos (esp).....	61
Figura 16.	Niveles de Progesterona (P4) en líquido folicular de Folículos Antrales Grandes (FG): Quísticos inducidos (Qind) y espontáneos (esp).	61
Figura 17.	Relación entre los niveles de Progesterona (P4)/17- β -estradiol (E2) en líquido folicular de Folículos Antrales Grandes (FG), Quísticos inducidos (Qind) y espontáneos (esp).....	62
Figura 18.	Porcentaje de proliferación para Ki-67 en la granulosa de varios tipos foliculares.....	63
Figura 19.	Porcentaje de proliferación para Ki-67 en la teca interna de varios tipos foliculares.....	63
Figura 20.	Porcentaje de proliferación para Ki-67 en la teca externa de varios tipos foliculares.....	63
Figura 21.	Pared en un folículo terciario de un animal del grupo control inmunomarcado para ki-67.....	64
Figura 22.	Pared en un folículo atrésico de un animal del grupo control inmunomarcado para ki-67.....	64

Figura 23.	Pared en un folículo terciario de un animal tratado con ACTH inmunomarcado para ki-67.....	64
Figura 24.	Pared en un folículo quístico de un animal con COD inducida inmunomarcado para ki-67.....	64
Figura 25.	Expresión relativa de ARNm para ciclina D1 en relación al normalizador.....	65
Figura 26.	Expresión relativa de ARNm para ciclina E en relación al normalizador.....	65
Figura 27.	IHCSA para la proteína proapoptótica Bax en la granulosa de varios tipos foliculares.....	66
Figura 28.	IHCSA para la proteína proapoptótica Bax en la teca interna de varios tipos foliculares.....	66
Figura 29.	IHCSA para la proteína proapoptótica Bax en la teca externa de varios tipos foliculares.....	67
Figura 30.	Pared en un folículo terciario de un animal del grupo control inmunomarcado para bax.....	67
Figura 31.	Pared en un folículo atrésico de un animal del grupo control inmunomarcado para bax.....	67
Figura 32.	Pared en un folículo quístico de un animal tratado con ACTH inmunomarcado para bax.....	67
Figura 33.	Pared en un folículo atrésico de un animal con quistes ováricos inducidos mediante ACTH inmunomarcado para bax.....	67
Figura 34.	IHCSA para la proteína proapoptótica Bcl-2 en la granulosa de varios tipos foliculares.....	68
Figura 35.	IHCSA para la proteína proapoptótica Bcl-2 en la teca interna de varios tipos foliculares.....	68
Figura 36.	IHCSA para la proteína proapoptótica Bcl-2 en la teca externa de varios tipos foliculares.....	68
Figura 37.	Pared en un folículo terciario de un animal normal inmunomarcado para bcl-2. x 40.....	69
Figura 38.	Pared en un folículo atrésico de un animal control inmunomarcado para bcl-2. x 40.....	69
Figura 39.	Pared en un folículo quístico de un animal con COD inducida inmunomarcado para bcl-2. x40.....	69
Figura 40.	Pared en un folículo quístico de un animal con COD espontánea inmunomarcado para bcl-2.....	69
Figura 41.	IHCSA con Caspasa-3 en la granulosa de varios tipos foliculares.....	70
Figura 42.	IHCSA con Caspasa-3 en la teca interna de varios tipos foliculares.....	70
Figura 43.	Pared en un folículo terciario de un animal control inmunomarcado para caspasa-3. X40.....	70
Figura 44.	Pared en un folículo atrésico de un animal control inmunomarcado para caspasa-3. X40.....	70
Figura 45.	Pared en un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para caspasa-3. X40.....	71
Figura 46.	Pared en un folículo atrésico de un animal con COD inmunomarcado para caspasa-3. X40.....	71
Figura 47.	Inmunoblot para identificar la especificidad de anticuerpos para Bax, Bcl-2 y caspasa-3.....	71
Figura 48.	Expresión relativa de ARNm para Bcl-2 en relación al normalizador GAPDH.....	72
Figura 49.	Expresión relativa de ARNm para Bax en relación al normalizador GAPDH.....	72
Figura 50.	Relación entre ARNm de Bcl-2/Bax.....	73
Figura 51.	Detección in situ de apoptosis en la pared en un folículo terciario de un animal control. X40.....	73

Figura 52.	Detección in situ de apoptosis en la pared en un folículo atrésico de un animal control. X40.....	73
Figura 53.	Detección in situ de apoptosis en la pared en un folículo terciario de un animal con COD. X40.....	74
Figura 54.	Detección in situ de apoptosis en la pared en un folículo atrésico de un animal con COD. X40.....	74
Figura 55.	Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE α en la granulosa de varios tipos foliculares en material obtenido del modelo experimental.....	75
Figura 56.	Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE α en la teca interna de varios tipos foliculares en material obtenido del modelo experimental.....	75
Figura 57.	Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE α en la granulosa de varios tipos foliculares en material obtenido de frigorífico.....	76
Figura 58.	Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE α en la teca interna de varios tipos foliculares en material obtenido de frigorífico.....	76
Figura 59.	Pared de un folículo terciario de un animal normal (muestras obtenidas en matadero) inmunomarcada para RE α . X40.....	76
Figura 60.	Pared de un folículo quístico de un animal con COD espontánea marcada para Re α . X 40.....	76
Figura 61.	Folículo terciario de un animal control sincronizado inmunomarcado para RE α	77
Figura 62.	Folículo atrésico de un animal control sincronizado inmunomarcado para RE α . X40.....	77
Figura 63.	Pared de un folículo terciario de un animal con COD inducida inmunomarcada para RE α . X40....	77
Figura 64.	Pared de un folículo quístico de un animal con COD inducida marcada para Re α . X40.....	77
Figura 65.	Densidad Óptica Integrada para RE α en relación a β -actina en la pared folicular completa de varios tipos foliculares.....	78
Figura 66.	Autoradiografía representativa de un Western Bot que muestra la expresión del Receptor de Estrógenos α en la pared completa de varios tipos foliculares.....	78
Figura 67.	Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE β en la granulosa de varios tipos foliculares en material obtenido del modelo experimental.....	79
Figura 68.	Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE β en la teca interna de varios tipos foliculares en material obtenido del modelo experimental.....	79
Figura 69.	Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE β en la granulosa de varios tipos foliculares en material obtenido de frigorífico.....	80
Figura 70.	Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE β en la teca interna de varios tipos foliculares en material obtenido de frigorífico.....	80
Figura 71.	Pared de un folículo terciario de un animal con COD inducida por ACTH marcado para RE β . X40.....	80
Figura 72.	Folículo quístico de un animal con COD inducida mediante ACTH marcado para RE β . X40.....	80
Figura 73.	Folículo terciario de un animal control proveniente de frigorífico marcado para RE β . X40.....	81
Figura 74.	Folículo terciario de un animal con COD espontánea marcado para RE β . X40.....	81
Figura 75.	Densidad Óptica Integrada para RE β en relación a β -actina en la pared folicular completa de varios tipos foliculares.....	81

Figura 76.	Autoradiografía representativa de un Western Bot que muestra la expresión del Receptor de Estrógenos β en la pared completa de varios tipos foliculares.....	81
Figura 77.	Porcentaje de Área Inmunomarcada para RP en la granulosa de varios tipos foliculares en muestras del modelo experimental.....	82
Figura 78.	Porcentaje de Área Inmunomarcada para RP en la teca interna de varios tipos foliculares en muestras del modelo experimental.....	82
Figura 79.	Porcentaje de Área Inmunomarcada para RP en la granulosa de varios tipos foliculares en muestras obtenidas de frigorífico.....	83
Figura 80.	Porcentaje de Área Inmunomarcada para RP en la teca interna de varios tipos foliculares en muestras obtenidas de frigorífico.....	83
Figura 81.	Pared de un folículo terciario de un animal control sincronizado marcado para RP. X 40.....	83
Figura 82.	Pared de un folículo quístico de un animal con COD inducida marcado para RP. X 40.....	83
Figura 83.	Pared de un folículo terciario de un animal control (frigorífico) marcado para RP. X 40.....	84
Figura 84.	Pared de un folículo quístico de un animal con COD espontánea marcado para RP. X 40.....	84
Figura 85.	Densidad Óptica Integrada para todas las isoformas de RP en relación a β -actina en la pared folicular completa de varios tipos foliculares... ..	81
Figura 86.	Densidad Óptica Integrada para la isoforma A1 de RP en relación a β -actina en la pared folicular completa de varios tipos foliculares.....	85
Figura 87.	Densidad Óptica Integrada para la isoforma A2 de RP en relación a β -actina en la pared folicular completa de varios tipos foliculares.....	85
Figura 88.	Densidad Óptica Integrada para la isoforma B de RP en relación a β -actina en la pared folicular completa de varios tipos foliculares.....	86
Figura 89.	Densidad Óptica Integrada para la isoforma C de RP en relación a β -actina en la pared folicular completa de varios tipos foliculares.....	86
Figura 90.	Autoradiografía representativa de un Western Bot que muestra la expresión del Receptor de Progesterona en la pared completa de varios tipos foliculares.....	86

RESUMEN

La enfermedad quística ovárica (cystic ovarian disease: COD) es uno de los trastornos reproductivos más comunes en vacas lecheras y afecta entre el 6 y el 19% de las hembras en producción. El impacto económico de esta enfermedad está en directa relación con el intervalo parto concepción y los costos asociados. El objetivo de la presente tesis fue validar un modelo experimental de COD en bovinos e identificar las posibles alteraciones presentes en los ovarios de estos animales relacionadas con el balance apoptosis/proliferación celular y la expresión de receptores hormonales esteroides. Se utilizaron bovinos de la raza Holando Argentino puros por cruce a los cuales se les realizó sincronización del ciclo estral y luego se los trató con ACTH sintética cada 12 horas durante 7 días. Se realizó el seguimiento de los animales mediante ultrasonografía y tacto rectal hasta encontrar estructuras ováricas compatibles con quistes foliculares. Se recolectó sangre para la determinación de los valores de hormonas esteroideas y gonadotróficas. Posteriormente se realizó la extracción de los ovarios mediante ovariectomía. Las muestras obtenidas fueron procesadas de acuerdo a las distintas técnicas para estudiar el balance proliferación/apoptosis mediante inmunohistoquímica (expresión de ki-67, caspasa-3, bcl-2 y bax) y RT-PCR (ciclinas D1 y E; Bax y Bcl-2); y por medio de inmunohistoquímica e inmunoblot para estudiar la expresión proteica de los receptores de estrógenos (α y β) y de progesterona. Además se recolectaron muestras de ovarios compatibles con COD en playa de faena de los frigoríficos de la zona para poder realizar la comparación entre lo que ocurre de manera espontánea y el modelo experimental elegido. Mediante la ultrasonografía, tacto rectal y análisis de las hormonas en suero pudo determinarse que la inducción de los quistes fue exitosa. Los folículos quísticos, tanto inducidos como espontáneos presentaron niveles de proliferación y de apoptosis disminuidos con respecto a los folículos sanos de diferentes categorías para las tres capas foliculares. Además, se hallaron diferencias en la expresión proteica de receptores de estrógenos y de progesterona. Los receptores de estrógenos presentaron una relación alterada entre subtipos con respecto a los ovarios de los animales normales, siendo mayor la expresión de RE α en los folículos terciarios de ambos grupos y quistes inducidos. Todas las categorías foliculares de los ovarios de animales con COD inducida presentaron niveles inferiores de RE β en relación a la misma categoría de los animales control excepto los quistes foliculares, los cuales

presentaron niveles similares a los de los folículos terciarios. Sin embargo los niveles de este subtipo de receptor se mantuvieron similares a los de los folículos terciarios de los animales control. Se observaron diferencias en la expresión de las isoformas del RP, así como en su cuantificación total por inmunohistoquímica. Los quistes mostraron menores niveles de expresión de RP total. El RP-A2 se encontró aumentado en los folículos controles y se observó una tendencia a disminuir del RP-B en los quistes espontáneos. Existieron diferencias en cuanto a lo encontrado en animales provenientes de frigorífico. En estos se observó un aumento significativo de los niveles de RE α y una disminución de RE β en los quistes en relación a las otras categorías estudiadas.

Los resultados obtenidos en esta tesis y su discusión con los aportes de otros autores, nos permiten llegar a las siguientes conclusiones: 1- El balance proliferación/apoptosis se vio alterado en los ovarios de los animales afectados por la enfermedad, encontrándose baja proliferación en las capas celulares de los folículos terciarios y quísticos de esos animales; con un concomitante bajo índice de apoptosis. Esto indicaría que si bien estos folículos no siguen creciendo, tampoco están destinados a la atresia, por lo menos de manera temprana; 2- La expresión de RE mostró diferencias entre los folículos en crecimiento normales de los ovarios control con respecto a los mismos en los ovarios de animales con COD. Esto indica cambios en la relación RE α /RE β en los ovarios de los animales con la enfermedad, y considerando que ambos receptores tienen distinta afinidad por el 17- β -estradiol, mediando diferentes respuestas, esta podría ser una de las causas de las alteraciones celulares observadas en los ovarios de los animales con la enfermedad; 3- Se evidencia un cambio en la relación de las isoformas del RP expresadas en los animales tratados, probablemente asociado con las alteraciones en la proliferación y diferenciación celular; 4- Las diferencias entre lo observado en los folículos quísticos obtenidos del modelo experimental y los provenientes de frigorífico tal vez se deban a la alta heterogeneidad en estas últimas y a la falta de datos sobre el estado reproductivo del animal, tratamientos previos, gestaciones, edad de los animales, etc. Estos hallazgos resaltan la importancia de trabajar con modelos experimentales en donde pueden controlarse algunas cuestiones tales como la edad de los animales, estado reproductivo y el tiempo de persistencia de los folículos, entre otras cosas.

SUMMARY

Cystic ovarian disease (COD) is one of the most common reproductive disorders in dairy cows and affects 6-19% of cattle. The economic impact of this disease is directly related to the conception-birth interval and, the associated costs, estimated that each event of the disease adds between 22 and 64 days in this interval and the approximate cost is estimated at approximately US\$ 130 per cow distributed in decreased milk production and veterinary costs. The objective of this thesis was to validate an experimental model of COD in cattle and identify possible alterations in the ovaries of these animals related with the cell apoptosis/ proliferation balance and steroid hormone receptor expression. We used Argentine Holstein cattle breed which were synchronized and treated with synthetic ACTH every 12 hours for 7 days. Animals were followed by ultrasonography and rectal examination to find structures consistent with ovarian follicular cysts. Blood was collected for determination of the seric levels of steroid and gonadotropic hormones. Extraction of the ovaries was performed by ovariectomy. The samples were processed according to different techniques to study the proliferation / apoptosis balance by immunohistochemistry (expression of Ki-67, caspase-3, bcl-2 and bax) and RT-PCR (cyclin D1 and E, Bax and Bcl -2), and by immunohistochemistry and immunoblotting to study the protein expression of estrogen receptors (α and β) and progesterone receptors. Additionally samples from ovaries consistent with COD were collected in slaughterhouse to allow a comparison between spontaneously and the experimentally induced disease. By ultrasonography, rectal examination and analysis of hormones in serum was found that the induction of the cysts was successful. Cystic follicles, both induced and spontaneous, presented decreased levels of proliferation and apoptosis compared to healthy follicles of different categories in the three follicular layers. In addition, differences in the protein expression of estrogen receptors and progesterone were observed. Estrogen receptors had a disturbed relationship between subtypes with respect to the ovaries of normal animals with an increased expression of RE α in tertiary follicles of both groups and induced cysts. All categories of follicles of animals with induced COD presented lower levels of ER β compared to the same categories in control animals. However, the levels of this receptor subtype were kept similar to those of tertiary follicles of control animals. There were differences in the expression of PR isoforms, as well as total quantitated by

immunohistochemistry. The cysts showed lower expression levels of total RP. The RP-A2 was found increased in the control follicles and showed a declining trend in the PR-B in spontaneous cysts. There were differences with regard to that found in animals from slaughterhouse, where a significant increase in levels and decreased RE α in RE β cysts in relation to other categories studied was found.

The results in this thesis and its discussion with input from other authors, allow us to draw the following conclusions: 1 - The proliferation / apoptosis balance was altered in the ovaries of animals affected by the disease, they found lower proliferation in the cell layers of tertiary follicles and cysts of these animals, with a concomitant low rate of apoptosis. This suggests that although these follicles do not continue to grow, they are not destined for atresia, at least so early; 2 - The expression of ER showed differences between normal growing follicles in the ovaries of control over them in the ovaries of animals with COD. This indicates changes in the relationship RE α / RE β in the ovaries of animals with the disease, and considering that both receptors have different affinity for the 17- β -estradiol, mediating different responses, this could be a cause of abnormal cell observed in the ovaries of animals with the disease; 3 - It is evidence a change in the ratio of PR isoforms expressed in the treated animals, probably associated with alterations in cell proliferation and differentiation, 4 - Differences between the observed cystic follicles in the experimental model obtained from slaughterhouse and may be due to the high heterogeneity in them and the lack of data on the animal's reproductive status, previous treatments, pregnancy, age of animals, etc. These findings highlight the importance of working with experimental models in which can be controlled some issues such as age of animals, reproductive state and time of follicular persistence.

I- INTRODUCCIÓN

1.1. Histofisiología Ovárica

El ovario es considerado una glándula mixta encargada de la producción cíclica de células sexuales fecundables (glándula exócrina) y de la producción de una proporción balanceada de hormonas esteroides (glándula endócrina) que mantienen el correcto funcionamiento del aparato reproductor, facilitan la migración de las gametas masculinas y del embrión incipiente asegurando su implantación y desarrollo exitosos. Esta glándula varía morfológicamente entre especies, aunque básicamente está constituida por un parénquima en el cual se encuentra una corteza con folículos en distintos estadios de desarrollo, folículos atrésicos, cuerpos lúteos y glándulas intersticiales (en algunas especies), y una médula en la cual se hallan principalmente componentes estromales (tejido conjuntivo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios). La ubicación y presencia de estos componentes depende del estadio del ciclo y además es propia de cada especie (Dellmann y Eurell, 1998).

El ovario de los mamíferos es, por lo tanto, un órgano heterogéneo en cuanto a la población celular presente en un momento dado, y también lo es en el tiempo, a lo largo de la vida del individuo (Figura 1). En el ovario adulto, las gametas no son liberadas continuamente, sino en forma recurrente a intervalos de tiempo que son especie-específicos; por ejemplo, 4-5 días en la rata, 28 días en la mujer, 21 días en la vaca, etc. Las gametas femeninas en el ovario adulto, los ovocitos, se encuentran rodeados por una o más capas de células que cumplen múltiples funciones, como protección, nutrición y sostén, que crecen gradualmente en número y forman eventualmente un folículo esférico lleno de líquido. Los folículos se encuentran en la misma proporción que los ovocitos en el ovario adulto pero el tamaño es muy heterogéneo dependiendo del momento del desarrollo en que se encuentren (Geneser, 2005).

Los mecanismos involucrados en el crecimiento de los folículos en un momento dado, actúan sobre un pequeño grupo de estos. De esta pequeña población que comienza a crecer, sólo uno o unos pocos alcanzarán el tamaño máximo específico de la especie, que permita la ruptura y liberación de la gameta; el resto de los folículos que iniciaron el crecimiento se perderán por mecanismos que los conducen a la atresia (Hsu y Hsueh, 1994; Dellmann y Eurell, 1998).

1.1.1. Desarrollo folicular

El folículo ovárico cumple la función de proveer el sistema de soporte necesario para que el ovocito alcance su máximo potencial y adquiera la capacidad para unirse a una célula germinal masculina, y de este modo producir un embrión capaz de desarrollarse hasta llegar al nacimiento. Las células somáticas del folículo participan de varias maneras para cumplir esta función esencial para la reproducción y la supervivencia de las especies: proveen los requerimientos nutritivos necesarios para el crecimiento del ovocito; controlan la maduración celular de los ovocitos que se encuentran en los folículos destinados a ovular y contribuyen al proceso de atresia y destrucción de los ovocitos en los folículos no seleccionados. Estos efectos directos son mediados por cambios producidos en el microambiente del ovocito, principalmente a través de los productos de secreción de estas células. Además, las células foliculares especializadas (células del cúmulo ovígero), están metabólicamente acopladas a él a través de uniones estrechas, que permiten la entrada de nutrientes y moléculas reguladoras al citoplasma del ovocito (Geneser, 2005).

El desarrollo de los folículos comienza con la formación de los folículos primordiales en la etapa prenatal (en la mayoría de las especies), tras el nacimiento este proceso se interrumpe, y se reanuda en la pubertad (Geneser, 2005).

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

Los folículos primordiales constituyen la reserva de folículos en reposo, los cuales serán progresivamente reclutados para desarrollarse o eliminados durante la vida reproductiva de las hembras. En la mayoría de los mamíferos antes del nacimiento, las ovogonias, son transformadas en ovocitos primarios, los que se caracterizan por tener una profase meiótica prolongada. Estos son rodeados por una capa única de células somáticas aplanadas denominadas células foliculares. En esta fase, la superficie del ovocito está en estrecho contacto con la de las células foliculares y carece de células de la teca y tejido conectivo. La capa de células foliculares apoya sobre una membrana basal que forma el límite con el tejido conectivo estromal (Dellmann y Eurell, 1998).

Los folículos primordiales continuamente abandonan el reservorio para convertirse en folículos primarios. Esta transición implica ciertas modificaciones citológicas en el ovocito, en las células foliculares y en el tejido conjuntivo adyacente. A medida que el ovocito aumenta de tamaño, la capa de células foliculares aplanadas se convierte en una capa de células cúbicas o cilíndricas pero continúa siendo una capa simple. Los ovocitos primarios continúan en estado de diploteno de la primera profase meiótica en donde permanecerán hasta el momento de la ovulación en la mayoría de las especies (Figura 1) (Dellmann y Eurell, 1998).

La transformación del folículo primario a secundario implica diversos cambios en las células foliculares que rodean al ovocito entre las que se destacan la intensa división mitótica y consiguiente estratificación paulatina del epitelio que originalmente era simple. En este momento las células pasan a denominarse granulosa. Las uniones estrechas permiten el acople metabólico del epitelio, asegurando la nutrición de las capas más internas. Por fuera de la lámina basal que separa las células de la granulosa del estroma, se diferencia una teca incipiente. Además, en esta etapa se completa la maduración de la zona pelúcida. La zona pelúcida madura posee glicoproteínas, las cuales poseen propiedades funcionales durante la fecundación, mucopolisacáridos, ácido siálico y ácido hialurónico. La adquisición de la zona pelúcida es una característica del folículo secundario. A medida que los folículos aumentan de tamaño, van desplazándose gradualmente hacia el interior de la corteza. Al final de esta fase denominada preantral, el ovocito detiene su crecimiento y se vuelve competente para recomenzar la meiosis. A medida que el desarrollo del folículo continúa, se forman pequeñas fisuras llenas de líquido entre las células de la granulosa. Este líquido aumenta a medida que crece el folículo y los espacios que se forman entre las células de la granulosa confluyen formando amplias lagunas (Figura 1) (Dellmann y Eurell, 1998).

La coalescencia de las lagunas llenas de líquido que se encuentran entre las células de la granulosa lleva a la formación de una cavidad denominada cavidad antral. La aparición de ésta caracteriza al folículo terciario o antral. En el folículo terciario, las células de la teca se diferencian en dos capas: una interior, glandular y vascularizada, llamada teca interna, y otra exterior, formada por tejido conectivo y, en algunos casos, células musculares lisas, denominada teca externa. La membrana basal que limita la

capa de células de la granulosa de la teca interna se encuentra muy desarrollada en este estadio y está compuesta por moléculas de colágeno tipo IV, laminina y fibronectina. El folículo antral está tapizado por un epitelio estratificado de células de la granulosa que presentan un engrosamiento localizado en uno de sus lados llamado cúmulo ovígeno, estas células mantienen una estrecha relación con el ovocito. En los grandes folículos terciarios las células de la granulosa que rodean íntimamente al ovocito se vuelven cilíndricas y se disponen radialmente formando la corona radiada que nutre al ovocito. Estas células permanecen junto al ovocito incluso después de la ovulación en la mayoría de las especies (Dellmann y Eurell, 1998).

Aquellos folículos terciarios que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración y han adquirido la habilidad para ovular ante los adecuados niveles de hormona luteinizante (LH) se denominan folículos preovulatorios. Las células de la granulosa se agrandan y adquieren inclusiones lipídicas, mientras que en las células de la teca aparecen vacuolas y aumenta la vascularización (Figura 1). Estos folículos se caracterizan por una baja tasa mitótica de las células foliculares y una alta relación estrógenos/andrógenos y estrógenos/progesterona en el líquido folicular (contrario a lo que se observa en los folículos atrésicos asociado a pérdida de capacidad de aromatización por parte de las células de la granulosa). Además, las células de la granulosa presentan receptores de LH que están ausentes ó no funcionales en los folículos atrésicos, alta producción de inhibina y alto flujo sanguíneo comparado a los atrésicos (Dellmann y Eurell, 1998).

Finalmente y debido a un ascenso de los estrógenos, seguido de un pico de LH y de hormona foliculoestimulante (FSH) ocurre la ruptura del folículo preovulatorio y la liberación del ovocito (que en este punto reanudó la meiosis) hacia la trompa uterina. Luego del pico preovulatorio se observa un incremento en el flujo sanguíneo y por otro lado, las células de la granulosa cercanas a la lámina basal, comienzan a soltarse debido a la desaparición de las uniones estrechas que las mantenían unidas. El único sitio donde estas uniones no se ven alteradas es en aquellas células que están formando parte de la corona radiada (Dellmann y Eurell, 1998).

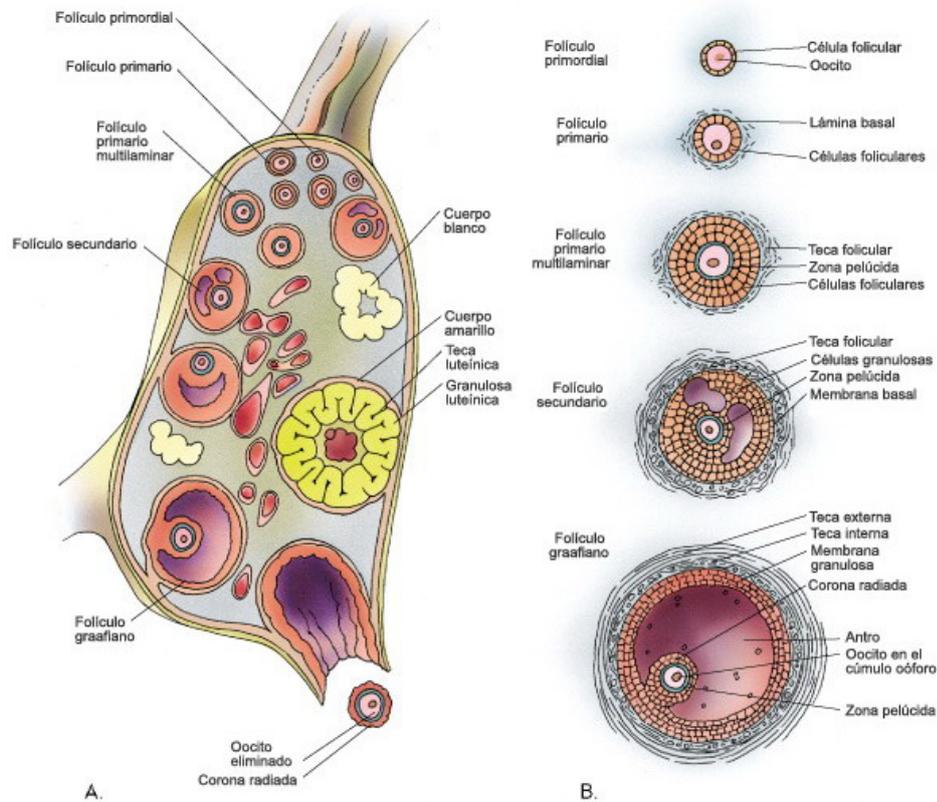


Figura 1. A- En este esquema se muestra un corte longitudinal de un ovario humano adulto en el cual se observan las distintas categorías de folículos en crecimiento, la ovulación, cuerpo lúteo y cuerpo blanco. B- Se muestran las principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento con sus componentes. (Gartner y Hiatt 1997.)

Luego de la ovulación, las capas foliculares se reorganizan para convertirse en el cuerpo hemorrágico en un principio y luego en el cuerpo lúteo. Los capilares y los fibroblastos del estroma circundante proliferan y penetran la membrana basal. El cuerpo lúteo es una glándula endocrina transitoria formada por las células foliculares remanentes del folículo que ha sido ovulado. Su principal función es la de secretar progesterona, la cual tiene numerosas funciones, entre ellas, 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).

1.1.2. Atresia folicular

Como consecuencia de que únicamente un pequeño porcentaje de los ovocitos potenciales son liberados por el ovario en cada ovulación, la mayoría de los folículos

experimentan regresión en algún momento de su desarrollo. Esta regresión recibe el nombre de atresia. Todos los folículos independientemente del momento del desarrollo en que se encuentren pueden experimentar atresia folicular (Hsueh y col., 1994; Quirk y col., 2004). Cuando la atresia afecta a un folículo primordial o primario, el contorno del ovocito se hace irregular y las células foliculares disminuyen de volumen separándose unas de otras. El ovocito y las células granulosas entran en autólisis y son reemplazadas gradualmente por tejido conjuntivo. En los folículos secundarios y terciarios el proceso es similar, observándose una mayor resistencia a la degeneración en la zona pelúcida y de este modo, las células que componen la pared folicular son degradadas antes de que el ovocito desaparezca por completo (Hsueh y col., 1994). En los folículos más desarrollados la gran cantidad de material en degeneración lleva a la aparición de macrófagos que van a fagocitar gran parte de los restos celulares. Las células del tejido conjuntivo invaden la zona y comienzan a producir matriz del tejido conectivo que va a reemplazar completamente al folículo en degeneración. Las células de la teca interna en muchas especies (roedores, caninos, humanos) se hipertrofian y pasan a formar parte del parénquima ovárico como glándulas intersticiales capaces de secretar hormonas esteroides, principalmente andrógenos (Quirk y col., 2004), no ocurre esto en los rumiantes.

Las alteraciones que sufren las células de granulosa a medida que avanza la atresia poseen todas las características de la muerte celular programada o apoptosis, la cual se detalla más adelante (Greenwald y Roy, 1994).

1.1.3. Regulación de la Foliculogénesis

El sistema hipotálamo- hipofisario coordina el proceso que destina a un folículo a ovular mediante el control del ciclo estral en los animales. La hormona que regula la función reproductiva es un decapeptido, hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), y el área del cerebro responsable de su secreción, es el núcleo arcuato que se localiza en el hipotálamo medio basal. La liberación de esta hormona se encuentra influenciada por neuronas ubicadas en otras regiones cuyas terminales nerviosas contactan con el núcleo arcuato. Este recibe factores estimuladores como epinefrina y norepinefrina (que aumentan su secreción) o factores inhibidores como dopamina, serotonina y opioides

endógenos (que disminuyen su secreción). La GnRH actúa sobre las células gonadotrofas de la hipófisis anterior, que son las encargadas de sintetizar las gonadotrofinas, y, tras su unión a receptores de alta afinidad expuestos en la membrana, estimula su liberación. La respuesta inducida por GnRH, es dependiente de la activación de proteína kinasa C y requiere calcio. Además es indispensable que su secreción se dé en forma pulsátil, para la secreción normal de gonadotrofinas hipofisarias (Hillier, 2001).

La FSH y la LH comparten características estructurales y químicas similares. La biosíntesis y la secreción de las gonadotrofinas están estrictamente reguladas a través del ciclo reproductivo. La expresión se encuentra regulada por factores hipotalámicos (GnRH), factores intrahipofisarios (principalmente los péptidos, las activina y la follistatina) y la retroalimentación gonadal (tanto de esteroides como de péptidos). Además la expresión de estas hormonas puede ser modulada en muchos niveles que incluyen alteraciones en las tasas de transcripción, estabilización del mensajero, modificaciones postraduccionales y cambios en el número de gonadotrofos. La FSH y la LH son liberadas de forma coordinada y regulan el desarrollo folicular, la ovulación y el mantenimiento del cuerpo lúteo (Hillier, 2001; Geneser, 2005).

Además de requerir la pulsatilidad de GnRH, existe una regulación de parte de hormonas ováricas en la hipófisis como en el hipotálamo. A todo este sistema de regulación que comprende el factor liberador de gonadotrofinas, gonadotrofinas liberadas por la hipófisis y síntesis y secreción de hormonas ováricas, se lo denomina eje hipotálamo-hipofisario-ovárico y se muestra de manera esquemática en la figura 2 (Hillier, 2001).

El folículo ovárico en desarrollo sintetiza andrógenos y estrógenos. Estas hormonas actúan a nivel hipotálamo-hipofisario estimulando la secreción de gonadotrofinas de manera basal, al comienzo del desarrollo folicular y la liberación de un pico de estas hormonas en el momento de máximo desarrollo folicular, que conduce al/los folículo/s preovulatorio/s a la ovulación. A continuación, la secreción de progesterona por parte del/los cuerpo/s lúteo/s produce una inhibición de la secreción de gonadotrofinas a nivel hipotálamo-hipofisario. La FSH estimula el crecimiento de los folículos ováricos y la síntesis de estrógenos a través de receptores presentes en la

membrana de las células de la teca y de la granulosa. La LH promueve la diferenciación de las células de la granulosa, la expulsión del ovocito y la consecuente formación del cuerpo lúteo luego de la ovulación (Geneser, 2005).

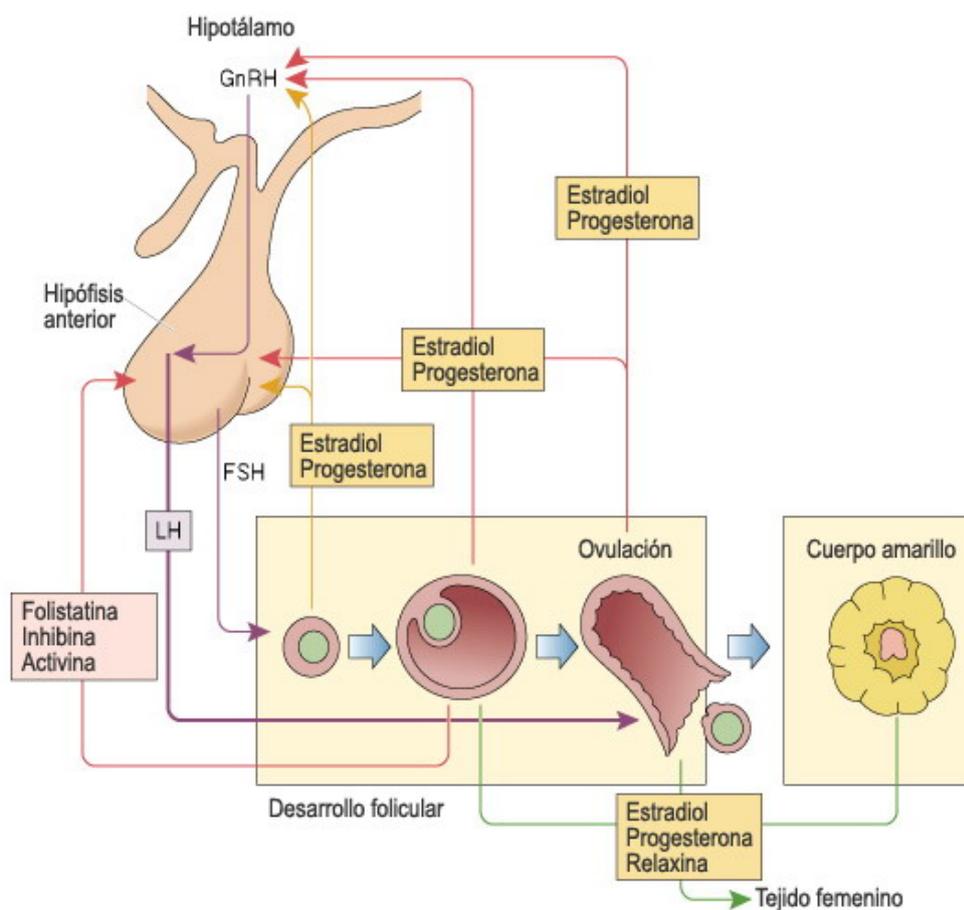


Figura 2. Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipofisario y el ovario. (Gartner y Hiatt, 1997).

Los eventos de foliculogénesis, ovulación y formación del cuerpo lúteo son procesos complejos que envuelven muchos cambios en la función, organización y diferenciación de las células de la granulosa, de la teca y del estroma ovárico. Estos cambios son secuenciales y responden a la acción de las hormonas gonadotróficas, esteroides y algunos factores de crecimiento de manera que la regulación es sumamente estrecha (Pederson, 1970; Richards, 1978; Hirshfield, 1991; Richards y col., 2000).

1.1.4. Factores involucrados en la foliculogénesis

Existen dos eventos importantes durante la foliculogénesis, el reclutamiento inicial y el reclutamiento cíclico. El reclutamiento inicial se da de una forma continua y empieza en el preciso momento en que se han formado los folículos, mucho antes de la pubertad y es el responsable de que los folículos primordiales salgan de su estado de reposo y comiencen una etapa de crecimiento. Durante el reclutamiento inicial, factores intraováricos u otros factores desconocidos, estimulan a un grupo de folículos primordiales a iniciar el crecimiento, mientras el resto permanece senescente durante meses o años. Este proceso podría deberse a la liberación de estímulos inhibitorios que hasta ese momento mantenían a los folículos en reposo (McGee y Hsueh, 2000).

El reclutamiento cíclico, en cambio, comienza después de la llegada a la pubertad como resultado de un aumento en los niveles de FSH circulante durante los ciclos reproductivos. Esto permite que una cohorte de folículos en crecimiento sea rescatada del proceso de atresia. En este momento, los folículos han completado su crecimiento, adquirido la zona pelúcida y se encuentran competentes para reasumir la meiosis. De este modo, sólo un número de folículos sobrevivirá, mientras que el resto entrará en atresia (McGee y Hsueh, 2000).

1.1.4.1. Ondas Foliculares

El ovario bovino presenta folículos antrales con diámetros comprendidos en el rango de 0.1 a 20 mm. Generalmente se acepta que la formación del antro es un evento influenciado por las gonadotropinas y que la FSH es la principal hormona responsable. La ultrasonografía proporcionó la evidencia definitiva de que esta última fase del desarrollo folicular se produce en forma de ondas a lo largo de todo el ciclo estral. Una onda de desarrollo folicular se puede definir como el desarrollo armónico y simultáneo de entre 8 y 41 folículos antrales pequeños de aproximadamente 3-4 mm de diámetro funcionando a través de estadios integrados de reclutamiento, selección y dominancia folicular (Adams y col., 2008). Cabe aclarar que esos 3-4 mm de diámetro de los folículos están arbitrariamente definidos y esto responde a los límites de resolución de los equipos ultrasonográficos convencionales, ya que no existen diferencias en la respuesta a estímulos o expresión de receptores hormonales entre folículos antrales

pequeños de menos de 4 mm o mayores de esta medida (Jaiswal y col. 2004). Jaiswal y col. (2004) encontraron que folículos antrales pequeños de 1 mm de diámetro ya presentan un patrón de crecimiento compatible con las ondas foliculares.

Originalmente se pensó que el reclutamiento inicial era un proceso independiente de gonadotrofinas. Actualmente se sabe que si bien ocurre desarrollo folicular temprano en ausencia de FSH, es esta hormona la que estimula, junto a otros factores, el desarrollo folicular en etapas iniciales (Bao y Garverick, 1998). A medida que los estudios moleculares fueron avanzando, han permitido determinar que los folículos secundarios ya expresan receptores para FSH y requieren de su estimulación para formar la cavidad antral. Aún no se ha podido establecer cual o cuales son los mecanismos que determinan el momento preciso en que un grupo de folículos primordiales comienzan a diferenciarse y a crecer. Durlinger y col. (2002) observaron que la reserva ovárica de folículos primordiales en ratones Knock Out (KO) para el gen que codifica la hormona anti-mulleriana (AMH), se agota más rápidamente que en ratones normales. Estos resultados junto con otros trabajos que evaluaron la activación de folículos preantrales en bovinos y ratones sugieren que la AMH secretada por las células foliculares de folículos primarios, tendría como función inhibir la activación de folículos primordiales (Gigli y col., 2005). Actualmente, la hipótesis más aceptada sugiere que la regulación de la activación folicular está dada por la interacción de factores inhibidores (por ejemplo AMH) y factores activadores (BMP15 (Galloway y col., 2002), GDF-9, (Wang y Roy, 2004), y Kit ligand (Driancourt y col., 2000)). Cuando predominan estos últimos, un grupo de folículos primordiales abandona el grupo de folículos inactivos y comienza el proceso de diferenciación. Los folículos preantrales pueden quedar retenidos en su crecimiento por largos períodos hasta que ocurre la segunda activación denominada reclutamiento cíclico. Esta segunda fase de activación tiene características muy diferentes a la primera ya que requiere niveles elevados de FSH. Esta activación en el caso particular de las especies fotoperiódicas ocurre solamente en la temporada de transición y reproductiva. Los primeros estudios de la foliculogénesis fueron realizados mediante seguimientos ultrasonográficos y es por eso que sólo describen el patrón de comportamiento de los folículos terciarios (antrales). A partir de este tipo de estudios se definió a la onda folicular como la

activación y crecimiento simultáneo de un grupo de folículos terciarios que en un punto divergen continuando uno de ellos su crecimiento y diferenciación (folículo dominante) mientras que los otros (folículos subordinados) se atresian. A fin de describir mejor la dinámica de los folículos antrales, el proceso se divide en tres sucesos diferentes (Figura 3, Adams et al., 2008):

- 1- **Reclutamiento:** activación de un grupo de folículos terciarios antrales
- 2- **Selección:** un folículo se selecciona sobre los otros,
- 3- **Dominancia:** el folículo seleccionado, ahora dominante, continua creciendo mientras los subordinados regresan y se atresian.

Una vez que los folículos primordiales comienzan a diferenciarse, es decir abandonan la población de folículos de reserva tienen dos caminos posibles a seguir: ovular o atresiarse en algún punto de su diferenciación. Alrededor del 99% de los folículos que comienzan la activación se atresian sin llegar nunca a ovular (Figura 3).

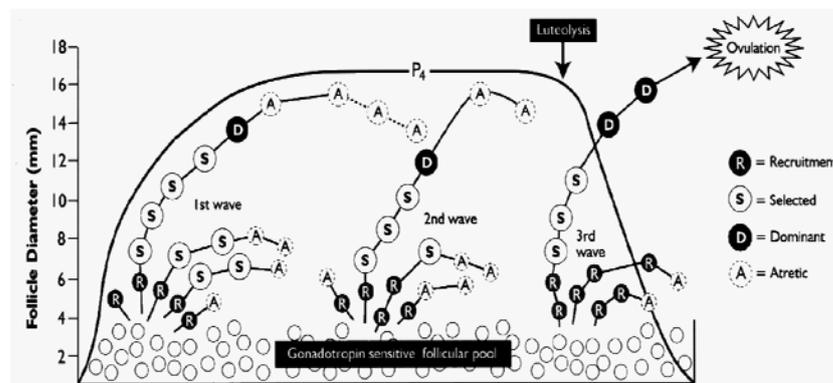


Figura 3. Esquema que ilustra las ondas foliculares a través del ciclo estral del bovino.

Adaptado de Adams y col., 2008

Los cambios moleculares que llevan a la desviación folicular pueden ocurrir en cualquier folículo terciario, es decir que todos los folículos pertenecientes a una misma onda tienen la capacidad de ser dominantes. Esto se comprueba al remover quirúrgicamente el folículo dominante una vez producida la selección. El folículo subordinado que le sigue en tamaño de la misma onda pasará a dominar sobre los otros (Adams y col., 2008). El avance de las técnicas moleculares ha producido un cambio en

la biología de la reproducción. Por muchos años se consideró que el mecanismo de selección folicular estaba regulado únicamente por factores endocrinos, hoy se sabe que antes que los cambios en las concentraciones hormonales se hagan evidentes y mucho antes de que los cambios de tamaño sean visibles ultrasonográficamente, el mecanismo de selección está determinado por mecanismos intraováricos. Es posible que la LH esté involucrada en el proceso de selección, ya que los sucesos de desviación de tamaño y aumento de LH ocurren simultáneamente (Adams y col., 2008). Además el folículo dominante expresa más receptores para LH que los subordinados. El folículo dominante a comparación de los subordinados, presenta concentraciones mayores de estradiol en el líquido folicular (Ginther y col., 1996; Adams y col., 2008), factor análogo a insulina 1 (IGF-1) libre (debido a la disminución de las proteínas ligadoras de IGF), activina-A e inhibina-A antes del desvío folicular, es decir, antes que la dominancia se haga evidente ecográficamente. En cambio, la concentración de progesterona intrafolicular recién es mayor en el dominante luego de producido el desvío folicular, deduciéndose que la progesterona no participa en el proceso de desviación folicular ya que es similar en subordinados y dominantes en el momento en que los folículos divergen. Por otro lado, Donadeu y Ginther (2002) demostraron que la concentración de androstenediona es similar en los subordinados y en el dominante, lo que lleva a suponer que la disminución de estrógenos en los folículos subordinados no es por falta de andrógenos. La mayor concentración de 17- β -estradiol que se observa en el folículo dominante podría deberse a un mecanismo intrafolicular que amplifica el estímulo de la FSH regulado por IGF (Rivera y Fortune, 2003). El folículo dominante tiene a su vez un sistema de retroalimentación positivo de auto-amplificación establecido por un mecanismo compuesto por el 17- β -estradiol y el factor de crecimiento transformante- β (TGF β , sintetizado por la teca interna) que interactúa con la FSH, para aumentar el número de células de la granulosa y acrecentar la actividad de la aromatasa (Gigli y col., 2006). Por otra parte, la alta producción de inhibina producida por el folículo dominante actúa localmente (acción paracrina) inhibiendo el desarrollo de los folículos subordinados y en forma endocrina, por un mecanismo de retroalimentación negativo inhibiendo la liberación de FSH a nivel de la hipófisis (Gigli y col., 2006). Esta disminución de la FSH no afecta al folículo dominante por poseer el sistema de amplificación mencionado previamente. Además el folículo dominante es más eficiente

en la obtención de nutrientes y factores de crecimiento por contar con mayor desarrollo de vasos sanguíneos (Redmer y Reynolds, 1996; Aerts y Bols, 2008b).

Las gonadotrofinas tienen la acción fisiológica de regular la proliferación, diferenciación y esteroidogénesis de las células que componen la pared folicular, actuando los factores de crecimiento, especialmente el sistema IGF y el 17- β -estradiol, como potenciadores y amplificadores de la acción de la FSH (Aerts y Bols, 2008ab; Silva y col., 2009).

1.1.5. Características de la dinámica ovárica en el ciclo reproductivo en la hembra bovina

La hembra bovina es un animal poliéstrico anual con ciclos de 21 \pm 4 días y con celo de 6 a 18 horas de duración. La ovulación tiene lugar 24 a 30 horas después de comenzado el estro, en la etapa de metaestro.

En el momento del nacimiento las únicas células germinales que se encuentran en el ovario de la hembra bovina son los ovocitos primarios, es decir células germinales cuya meiosis iniciada en el período prenatal se encuentra detenida en la profase de la primera división meiótica. Al nacimiento las terneras poseen una dotación de entre 42.000 y 325.000 folículos primordiales, la cual se reduce a 1.000-5.000 a los 10-15 años de edad (Gigli y col., 2006). Por ultrasonografía se demostró que las ondas de crecimiento folicular comienzan ya a las dos semanas de vida en las hembras bovinas (Evans y col., 1994), es decir que es posible observar el crecimiento folicular independiente de gonadotrofinas en hembras pre-púberes. La sucesión recurrente de ondas foliculares se produce a lo largo del tiempo, en diferentes estadios fisiológicos desde el período pre-puberal, ciclo sexual puberal y adulto, preñez y el período posparto. Las ondas se desarrollan al azar en los dos ovarios, excepto en la preñez y el posparto temprano en donde la presencia del cuerpo lúteo de preñez determina el reclutamiento solamente en el ovario contralateral. Cada onda folicular recluta entre 8 a 41 folículos antrales que han adquirido competencia meiótica por un pico secundario de FSH relativo a los niveles normales de concentración de esta hormona que es variable entre animales. En este momento se inicia la expresión y actividad de aromatasa, inhibinas, activinas y P450-Scc en células de la granulosa. La “ventana de

reclutamiento” o sea el momento de la emergencia folicular, es de 2 días en el bovino (Gigli y col., 2006). Los folículos antrales pequeños en el bovino, que presentan un tamaño de 0,1-0,2 mm, tienen una primera etapa de crecimiento hasta los 4 mm, con proliferación de las células de la granulosa regulada por FSH (no dependiente) y por factores de crecimiento (regulación paracrina); una segunda etapa en la cual crecen de 4 a 9 mm y que es dependiente de FSH y factores de crecimiento (en estos se inicia la expresión y actividad de la 3- β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3- β -HSD) y la 17- α -hidroxilasa en células de la granulosa y teca interna) y una tercera etapa de 9 mm a tamaño preovulatorio (10–20 mm) dependiente de la LH, factores de crecimiento y concentraciones basales de FSH (Evans, 2003). Los folículos mayores de 10 mm son capaces de ovular (folículo estrógeno-activo) en presencia de niveles basales de progesterona. Los folículos antrales pequeños de 0,2 mm requieren 40 días para llegar al estado preovulatorio. Las hembras *Bos taurus* y *Bos indicus* presentan generalmente dos a tres ondas de crecimiento folicular en su ciclo sexual. La proporción de hembras *Bos taurus* y *Bos indicus* con dos o tres ondas de crecimiento folicular es muy variable, no teniendo relación con la raza, edad y con el nivel de fertilidad de las mismas (Evans 2003; Gigli y col., 2006). El número de ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral está determinado por la longitud de la fase luteal; si la progesterona declina mientras el folículo dominante de la segunda onda está en la fase de crecimiento pos-desviación o en su fase estática temprana (3–4 días después de su desarrollo máximo) este folículo ovulará; sino sufrirá atresia y se originará una nueva onda (Lucy y col., 1992; Lucy, 2007). En los ciclos estrales de 2 o 3 ondas, la emergencia de la primera onda folicular, ocurre generalmente alrededor del día de la ovulación. La emergencia de la segunda onda ocurre en el día 9-10 para los ciclos de 2 ondas y el día 8-9 para los de 3 ondas. En los ciclos de 3 ondas, la tercera onda emerge en el día 15-16. Curiosamente, esta dinámica folicular se mantiene al menos durante los 2-3 primeros meses de gestación, habiéndose observado en vacas gestantes la presencia de ondas periódicas que surgen cada 9-10 días (Adams y col., 2008). Lógicamente, estos folículos nunca llegan a ovular debido al efecto inhibitor de la progesterona producida por el cuerpo lúteo de gestación. En las ondas foliculares anovulatorias, los folículos regresan sin ovular. El folículo dominante presente en el inicio de la luteolisis será el folículo dominante ovulatorio y la emergencia de la próxima onda (primera del nuevo ciclo) se

demorará hasta el momento de la ovulación. En las ondas foliculares no ovulatorias las concentraciones de estradiol circulante se mantienen bajas lo cual indica que, a pesar de que el tamaño preovulatorio puede ser alcanzado, el folículo dominante no alcanza las características funcionales preovulatorias tales como la producción de 17- β -estradiol (Ginther y col., 2003). El folículo dominante (folículo estrógeno-activo) de la última onda continúa su crecimiento y la biosíntesis de estradiol, hasta que se alcanza el nivel suficiente de estradiol circulante, para producir el feed back positivo sobre el área de control cíclico del hipotálamo que aumenta los pulsos de GnRH/ LH/ FSH, e inducen el pico preovulatorio de LH y FSH y por lo tanto el proceso de la ovulación. Después del pico de LH este feedback se interrumpe y las células de la granulosa sintetizan progesterona y se luteinizan. Por eso el mecanismo que regula la dinámica folicular está basado en las respuestas diferenciales a la FSH y LH.

1.2. Balance Proliferación/Apoptosis

1.2.1. Proliferación celular en el ovario

Uno de los muchos cambios que ocurren en la función de las células de la granulosa es el súbito pasaje de una fase de intensa proliferación que caracteriza a los folículos preovulatorios hacia una fase no proliferativa y de diferenciación terminal de las células luteales (Robker y Richards, 1998).

En los folículos primordiales, el ovocito está rodeado por una capa de células foliculares que no se dividen y que está detenida en la fase G₀ del ciclo celular. Los folículos primarios dejan ese estado quiescente e inician una fase de lento desarrollo en el cual las células de la granulosa entran de lleno en el ciclo celular aunque la proliferación es muy lenta al comienzo (Hirshfield, 1991). Ya en este momento comienzan a agruparse alrededor de estos folículos, elementos del estroma compuestos por fibroblastos, células indiferenciadas y algunas fibras las cuales posteriormente constituirán las tecas foliculares. Sin embargo, cuando las células de la granulosa poco proliferativas de los folículos preantrales adquieren una mayor sensibilidad a la FSH y a la LH, y empiezan a producir estrógenos, la exposición a estas hormonas produce un estallido rápido de la proliferación que resulta finalmente en la formación de los grandes folículos preovulatorios (Rao y col., 1978; El-Hefnawy y Zeleznik, 2001). Las células

de la granulosa de estos folículos en rápido crecimiento no solo se dividen de manera vertiginosa sino que también se van diferenciando al adquirir receptores para gonadotrofinas, principalmente para LH (Uilenbroek y Richards, 1979). Por fuera de la membrana basal las células de la teca también proliferan en respuesta a los estímulos de factores de crecimiento secretados por las células de la granulosa y a las gonadotrofinas y van diferenciándose en teca interna y teca externa (Duleba y col., 1997). La diferenciación de las células de la teca interna es completamente dependiente de LH y de algunos factores de crecimiento como IGF-I (Duleba y col., 1997). La onda preovulatoria de LH induce entonces cambios importantes tanto en la estructura como en la función de estos folículos en crecimiento. La LH termina el desarrollo folicular causando que las células de la granulosa salgan del ciclo celular (Rao y col., 1978; Hirshfield, 1991) e inicien un programa de diferenciación terminal (luteinización) (Richards y col., 1986; Richards, 1994). Este evento ocurre dentro de las 4 horas posteriores al pico de LH en la rata y se relaciona con ciertos cambios en las moléculas reguladoras específicas de la progresión del ciclo celular (Robker y Richards, 1998; El-Hefnawy y Zeleznik, 2001). Luego de la ovulación, las células de la granulosa llegan al grado de máxima diferenciación cuando se luteinizan para forman un cuerpo lúteo maduro.

La hipofisectomía en ratas adultas lleva a una alteración en este patrón de proliferación/diferenciación normal, ocurriendo un desarrollo folicular lento que solo llega hasta la fase preantral (Robker y Richards, 1998). Lo mismo ocurre en ratones hipogonadales carentes de gonadotrofinas (Mason y col., 1986a,b) o de FSH (Kumar y col., 1997). Si se administran las hormonas de las que carecen estos animales de manera secuencial, los procesos de foliculogénesis, ovulación y formación de cuerpo lúteo se reanudan como sucede en los animales normales. Estos modelos ilustran que, si bien el desarrollo folicular temprano y la lenta proliferación de las células granulosas en este momento ocurren en ausencia de gonadotrofinas y hormonas esteroides, estas hormonas y sus receptores son indispensables para el desarrollo normal, especialmente en los estadios finales de crecimiento rápido que conducen a la formación del folículo preovulatorio y posteriormente del cuerpo lúteo (Hirshfield y col., 1991)

1.2.1.1. Mecanismos de control del ciclo celular en el ovario.

La regulación del ciclo celular dentro de cualquier célula es compleja y envuelve el balance de muchas moléculas reguladoras, y puede ser alterado por numerosas señales externas que actúan en múltiples pasos del ciclo. En el ovario, el estradiol, FSH y LH son señales esenciales para el crecimiento de los folículos preovulatorios y la subsiguiente diferenciación como cuerpos lúteos. Cada hormona actúa a través de receptores específicos y por vía de señales intracelulares. Adicionalmente la FSH y la LH actúan controlando distintos niveles de AMPc y su activación mediante la vía de la kinasa A (Jonassen y Richards, 1980; Richards y Kirchick, 1984). Las principales familias de proteínas reguladoras que juegan un rol importante en la progresión del ciclo celular son: las ciclinas, las kinasas dependientes de ciclinas (cdk), sus proteínas sustrato, los inhibidores de cdk (p27, p21, p16, p18), y las proteínas p53 y pRB. Estas familias tienen la maquinaria reguladora básica responsable de catalizar la transición del ciclo celular y atravesar los puntos de control (Golias y col., 2004). Dentro del contexto hormonal que regula la proliferación de las células ováricas, hay que tener en cuenta no solo las hormonas que actúan sino también en qué concentraciones se encuentran estas hormonas. El AMPc y la proteína kinasa A juegan un importante rol en la aceleración de la proliferación de las células de la granulosa así como también en terminar el desarrollo folicular e iniciar la diferenciación terminal. De este modo, los niveles bajos de AMPc generados en respuesta a la FSH inducen niveles elevados de ciclina D2 y también incrementa la ciclina E (Robker y Richards, 1998). En contraste, el pico de LH y los niveles elevados de AMPc rápidamente disipan la expresión de ciclina D2 y seguidamente la de ciclina E incrementando los niveles de p27 y p21.

Por otra parte, los estrógenos son conocidos por ser potentes mitógenos. En el útero, el estradiol induce la expresión de las ciclinas D1, D3, E y A. En el ovario, esta hormona induce la expresión de la ciclina D2 y E en las células de la granulosa con una reducción concurrente en los niveles de p27. La regulación negativa de los inhibidores de cdk y la estimulación simultánea de las ciclinas toman cuenta de que el estradiol es un agente mitogénico muy potente comparado con la FSH en estas células (Robker y Richards, 1998). Ciertos estudios han demostrado que la ciclina D1 puede unirse directamente al receptor de estrógenos e intensificar la transcripción de genes

específicos (Zwijssen y col., 1997). Finalmente, existen muchas hormonas adicionales que actúan en el ovario afectando la proliferación y diferenciación celular como por ejemplo la activina, que es producida en niveles elevados por las células de la granulosa de los folículos preovulatorios y estimula la síntesis de ADN (Miro y Hillier, 1996) y el IGF-I que probablemente juegue un rol mas importante en la diferenciación celular que en la proliferación (Baker y col., 1996).

1.2.1.2. Marcadores de proliferación celular

La fracción de crecimiento de un tejido está definida como el cociente entre las células que se están dividiendo y el número total de células de ese tejido. Muchas metodologías han sido utilizadas para determinar el índice de proliferación celular, entre las que se encuentran el conteo de figuras mitóticas, citometría de flujo, incorporación de nucleótidos modificados en el ADN sintetizado de novo (timidina tritiada y bromodeoxyuridina (BrdU)) y la identificación de antígenos asociados al ciclo de división celular (PCNA y Ki-67) entre otros (Woosley, 1991; Baravalle y col., 2007).

1.2.2. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un evento que se caracteriza por la formación de fragmentos celulares sellados, cuerpos apoptóticos, en ausencia de un proceso inflamatorio lo cual evita la liberación descontrolada del contenido intracelular con el consiguiente daño a los tejidos vecinos, tal como ocurre en la necrosis. Como consecuencia del complejo mecanismo bioquímico involucrado en la apoptosis, se producen alteraciones estructurales específicas, tales como, formación de ampollas (“blebbing”) en la superficie celular, retracción celular, condensación de cromatina, con persistencia de la integridad de la membrana plasmática. Este último hecho diferencia claramente a la apoptosis de la necrosis. Además de estos cambios morfológicos a nivel celular, ocurren cambios bioquímicos a nivel nuclear. La característica principal es la fragmentación del ADN como consecuencia de la activación de señales intracelulares que concluyen en la activación de una endonucleasa Ca^{2+}/Mg^{2+} dependiente produciendo clivajes en el ADN de forma regular entre las unidades nucleosomales. Como resultado de la activación de esta enzima se generan fragmentos de múltiplos de

200 pares de bases, que se visualiza como un patrón característico de bandas en geles de agarosa (Hsueh y col., 1994). La apoptosis es un proceso altamente regulado que puede ser inducido, estimulado e inhibido en diferentes etapas. La cascada de apoptosis puede ser dividida en tres etapas secuenciales: iniciación, ejecución y muerte.

- La etapa de iniciación incluye a la inducción de la cascada apoptótica, que puede ser provocada, por ejemplo, por interacciones entre ligandos y receptores (TNF- α ; Fas y Fas-L) que llevan a los primeros eventos proteolíticos por activación de caspasas iniciadoras. Las caspasas son una familia de cisteína-proteasas (sitio activo, la cisteína) intracelulares que clivan a moléculas diana cuyos sitios específicos se encuentran situados a continuación de un residuo de ácido aspártico. El nombre deriva del inglés “cysteine aspartases”. Las caspasas se encuentran en las células en forma inactiva, llamada procaspasas (zimógeno). La activación requiere su clivaje, el cual puede ocurrir en forma autocatalítica o bien ser inducido por otras caspasas activas.

- La etapa de ejecución comienza con la activación de las caspasas ejecutoras. Dentro de esta etapa ocurre la activación de la caspasa-3. Su activación es llamada «punto de no retorno», ya que una vez activadas estas proteasas ejecutoras degradan una variedad de proteínas que ocasionan daños irreversibles en la célula.

- La etapa de la muerte apoptótica, es el resultado de una cascada de eventos muy compleja que finalmente lleva al colapso del núcleo celular y de la célula misma. Aún en la etapa final, la célula no libera componentes intracelulares, evitando de esta manera la reacción inflamatoria (Greenwald y Roy, 1994).

1.3. Hormonas esteroides y sus receptores

1.3.1. Características generales

En los mamíferos, las gónadas y la glándula adrenal producen cinco grupos principales de hormonas esteroides: estrógenos, progestágenos, andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides. Todas estas hormonas regulan un gran número de procesos fisiológicos en las células blanco equipadas con los correspondientes receptores (Beato y Klug, 2000).

Los esteroides sexuales juegan un papel importante en el desarrollo y diferenciación de los órganos reproductivos y en el mantenimiento de la fertilidad. Los progestágenos, andrógenos y estrógenos son sintetizados por el ovario de manera secuencial con cada uno sirviendo de substrato para el esteroide subsiguiente en el camino. Las hormonas esteroides, a través de los receptores nucleares, regulan eventos transcripcionales (Beato y Klug, 2000).

Estos receptores forman parte de la superfamilia de los receptores nucleares los cuales comparten ciertos elementos estructurales (Figura 4). Estos incluyen el Dominio de Unión al ADN (DNA Binding Domain: DBD) que es una zona altamente conservada; el Dominio de unión al Ligando (Ligand Binding Domain: LBD) que está moderadamente conservada; y dos dominios de transactivación: AF1, localizado en el dominio A/B y AF2, localizado en el dominio E/F (Beato y Klug, 2000; Drummond y col., 2002).

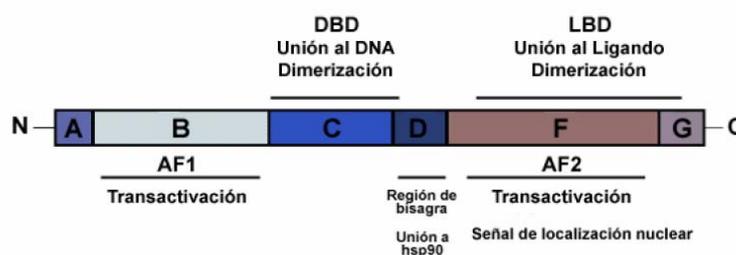


Figura 4. Estructura de los receptores hormonales nucleares. (Drummond y col., 2002)

1.3.1.1. Progesterona

La progesterona, mediante sus receptores, juega un rol crucial en la ovulación, implantación y mantenimiento de la preñez (Graham y Clark, 1997; Ogle y col., 1998). Los receptores de progesterona (RP) comprenden al menos tres isoformas que se originan del mismo gen. RP-A es una forma truncada de RP-B originada de un sitio de comienzo de transcripción diferente, a la cual le faltan 164 secuencias aminoacídicas de la región de transactivación NH2 terminal de RP-B (Kastner y col., 1990). En general, RP-B es un potente transactivador y RP-A es un inhibidor dominante de RP-B y de otros receptores nucleares (Tung y col., 1993; Vegeto y col., 1993). RP-C es otro producto NH2 terminal truncado, pero es mucho más pequeño que RP-A (Wei y Miner,

1994). Tiene un sitio de unión a la hormona pero solo posee el segundo dedo de zinc del dominio de unión al ADN, y por lo tanto no interactúa directamente con el ADN. De este modo RP-C puede actuar como un supresor selectivo de la acción de la progesterona mediante la unión de la hormona en la fracción citosólica reduciendo la unión de esta a los receptores activos (Wei y Miner, 1994). En resumen, las isoformas RP-A y RP-C pueden tener una influencia inhibitoria sobre la actividad transcripcional de RP-B. La expresión de las distintas isoformas se solapa espacial y temporalmente en los órganos reproductivos de las hembras (Conneely, 2001; Gava y col., 2004). La expresión de los receptores de progesterona es inducida por los estrógenos en la mayoría de los tejidos blanco y declinan en respuesta a la progesterona. En los folículos preovulatorios maduros, la LH induce la expresión de RP en las células de la granulosa. La importancia de los RP en la fertilidad de la hembra esta subrayada por la infertilidad en los ratones KnockOut (KO) para RP (Lydon y col., 1995). Si bien los ratones muestran histológicamente ovarios normales, estos fallan en ovular aún luego de una estimulación exógena, como lo indica la presencia de folículos preovulatorios intactos en el ovario y la ausencia de ovocitos en el oviducto y cuernos uterinos (Lydon y col., 1995; Gava y col., 2004).

1.3.1.2. Estrógenos

Los estrógenos son hormonas esteroides que regulan el desarrollo, diferenciación y función en una gran variedad de tejidos en los animales. El tipo de estrógeno presente varía de acuerdo a las especies siendo generalmente el 17- β -estradiol el dominante. Los efectos biológicos de los estrógenos están mediados por los receptores de estrógenos (RE) α y β . Estos receptores actúan como factores de transcripción activados por ligando. El mecanismo clásico de acción de RE envuelve la unión de los estrógenos a los receptores en el núcleo, luego de lo cual los receptores dimerizan y se unen a elementos de respuesta específicos conocidos como elementos de respuesta a estrógenos (ERE) localizados en los promotores de los genes blanco (Nilsson y col., 2001; Björnström y Sjöberg, 2005).

Ambos subtipos de RE unen el 17- β -estradiol con alta afinidad y especificidad. Si bien RE β comparte muchas características funcionales con RE α , los mecanismos

moleculares que regulan su actividad transcripcional y la localización tisular son distintos para ambos (Kuiper y col., 1996; Wang y col., 2000). Es sabido que RE α juega un papel crucial en los procesos fisiológicos del tracto reproductor de la hembra: oviducto, útero y vagina. Se ha demostrado que el patrón de expresión de ambos subtipos en los distintos compartimientos uterinos son similares, sin embargo los niveles tanto de ARNm y proteína de RE β son mucho menores que los de RE α (Saunders y col., 1997; Matsuzaki y col., 1999; Wang y col., 1999, 2000).

En los mamíferos, la actividad de RE α en el útero y oviducto esta regulada por los niveles de hormonas circulantes (Brenner y col., 1979). Los estrógenos tienen efectos positivos mientras que la progesterona tiene efectos negativos sobre la expresión de RE α en los compartimientos epitelial y estromal del útero de la rata (Wang y col., 1999). La expresión de este subtipo en particular en el ovario es casi exclusivo a las células de la teca interna, glándulas intersticiales, epitelio germinal y células del estroma; habiendo diferencias importantes entre los autores con respecto a su expresión en las células de la granulosa, en las diferentes especies e inclusive dentro de la misma especie (Wang y col., 1999, 2000; Pelletier y col., 2000; Rosenfeld y col., 2001; Van Den Broeck y col., 2002a).

En el ovario, RE β es el subtipo de receptor predominante y los niveles de proteína de este receptor son variables en el ovario durante el ciclo estral (Hiroi y col., 1999; Rosenfeld y col., 1999). Este subtipo de RE se expresa principalmente en las células de la granulosa de los folículos ováricos. En el ovario, el ARNm de RE β se expresa más en los pequeños folículos en desarrollo y menos en los grandes folículos debido a la habilidad de las gonadotropinas de regular hacia abajo la expresión génica de RE β (Kuiper y col., 1996; Byers y col., 1997).

En algunas especies, el gen RE α se expresa en las células de la granulosa cuando se aplica sobre ellas un estímulo inductor de diferenciación (Yang y col., 2002). Si bien las células de la granulosa son sitios primarios de la expresión de RE β , la coexpresión de este con una relativamente alta expresión de RE α en las células de la teca e intersticiales sugieren que ambos subtipos deben ser necesarios para el normal funcionamiento ovárico (Yang y col., 2002).

En respuesta al advenimiento del pico de LH se ha observado que la expresión de los RE α aumenta y la de los RE β disminuye (Fitzpatrick y col., 1999; Sharma y col., 1999). Fitzpatrick y col., (1999) también documentaron que la expresión de RE β disminuyó marcadamente luego de la administración de gonadotrofina coriónica humana (hCG). Los patrones de expresión temporales únicos para ambos receptores durante el ciclo estral con referencia a los niveles de estrógenos y progesterona sugieren que los esteroides ováricos tienen un rol regulador dominante sobre la expresión de los receptores de estrógenos con respecto a las gonadotrofinas hipofisarias (Roy y Kole, 1995).

Al menos parte de la expresión de RE inducida por FSH podría estar mediada por los estrógenos; sin embargo, la progesterona influiría negativamente sobre la expresión de estos receptores. El efecto inhibitorio de la progesterona sobre la expresión de RE puede verse por los bajos niveles de ambos receptores en el momento en que la progesterona incrementa significativamente sus niveles (Roy y Kole, 1995). A la luz de los efectos inhibitorios de la progesterona sobre la expresión de proteínas y ARNm de los RE, la diferencia entre la expresión de RE β y RE α puede explicarse por una mayor sensibilidad del gen que codifica RE α a la presencia de progesterona ya que este no se comienza a expresar en tanto los niveles de esta hormona no bajan hasta niveles basales (Roy y Kole, 1995). Por el contrario, el gen RE α puede ser menos sensible a los efectos estimulantes de los estrógenos, ya que no se inicia la transcripción hasta que los niveles de esta hormona son elevados. Por otro lado, el gen que codifica RE β es más sensible a los efectos de los estrógenos ya que los efectos de la progesterona son revertidos ni bien comienzan a aumentar los niveles de estrógenos.

Si bien ambos receptores tienen aparentemente la misma afinidad por los estrógenos, considerando los patrones de expresión espacio-temporales diferentes de estos dos subtipos de receptores de estrógenos en las células foliculares y no-foliculares, es probable que haya una regulación diferencial de los estrógenos sobre la función celular (Enmark y col., 1997).

Además, RE β y RE α pueden formar heterodímeros en las células blanco. La transcripción génica mediada por RE envuelve la unión del homodímero-receptor-ligando con el ERE, sin embargo, los RE también median la transcripción a través del

elemento mejorador de respuesta AP1 que depende de la unión con un ligando, así como también de factores de transactivación de AP1, tales como Fos y Jun (Gaub y col., 1990; Umayahara y col., 1994). Paech y col., (1997) han demostrado que sin bien la unión del complejo estrógenos-RE α tanto al sitio ERE como al AP1 estimula la transcripción, la unión del complejo estrógenos-RE β al sitio ERE estimula pero la unión al sitio AP1 inhibe la transcripción.

Cabe destacar que para ambos subtipos de receptores existen varias isoformas de ARNm obtenidos por splicing alternativo, muchas de las cuales han sido detectadas solo en condiciones patológicas (Okada y col., 2005).

En resumen, el nivel relativo de expresión y los distintos modos de señalización de los dos subtipos de receptores en las células foliculares durante la foliculogénesis pueden ser un modulador importante de la respuesta celular a los estrógenos.

1.4. Enfermedad Quística Ovárica.

La enfermedad quística ovárica (cystic ovarian disease: COD) es uno de los trastornos reproductivos más comunes en vacas lecheras y afecta entre el 6 y el 19% de las hembras vacunas en producción (Eyestone y Ax, 1984; Garverick, 1997; Silvia y col., 2002). El impacto económico de esta enfermedad está en directa relación con el intervalo parto concepción y los costos asociados, estimándose que cada evento de la enfermedad agrega entre 22 y 64 días a este intervalo. El costo aproximado de esto se calcula U\$S 137 por vaca distribuidos en disminución de la producción de leche y gastos veterinarios (Silvia y col., 2002). McNutt (1927) fue uno de los primeros en utilizar el término “quístico” en referencia a estructuras foliculares persistentes mayores a 20 mm de diámetro. Entre los años 1940 y 1950 se publicaron numerosos reportes acerca de la morfología ovárica, las observaciones clínicas y la epidemiología de esta enfermedad (Casida y col., 1944; Garm, 1949; Casida y Chapman, 1951; Wiltbank y col., 1953). La mayoría de esos investigadores especulaban acerca de un “desbalance endocrino” como causa de la formación de quistes foliculares ováricos. Esto llevó a la aparición de gran cantidad de tratamientos basados en la administración de hormonas, incluyendo esteroides (Johnson y Ulberg, 1967), gonadotrofinas (Casida y col., 1944;

Nakao y col., 1978), y, más recientemente GnRH (Kesler y Garverick, 1982; Nanda y col., 1988). Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos no poseían un sustento teórico adecuado (Silvia y col., 2002).

Si bien, la COD ha sido ampliamente estudiada en relación a su diagnóstico y tratamiento (Nanda y col., 1991; Opsomer y col., 1996; Christopher y Devanathan, 1997; Agarwal y Shankar, 1998; Sharma, 1998; Calder y col., 1999; Douthwaite y Dobson, 2000), en la actualidad se conoce relativamente poco acerca de los mecanismos que causan su desarrollo y de los cambios que ocurren a nivel del eje hipotálamico-hipofisario-ovárico (Kesler y Garverick, 1982; Yoshioka y col., 1998; Heuer y col., 1999; Ribadu y col., 1999,2000).

1.4.1. Definición.

La COD bovina 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 diámetro ovulatorio para la raza), con una persistencia de mas de 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., 2005). Sin embargo, esta definición clásica debe ser complementada con el concepto de que los quistes pueden regresar y ser reemplazados por otros; pueden atresarse o luteinizarse e inclusive puede producirse la ovulación en presencia de estas estructuras por lo cual se establece que esta es una enfermedad altamente dinámica (Hamilton y col., 1995; Rutter & Russo, 2000; Silvia y col., 2002; Bartolomé y col., 2005). La presencia de más de una estructura quística no es rara, en un estudio realizado por Silvia y col. (2002), el 47% de las vacas con quistes ováricos tuvieron 2 o más quistes en el momento de la detección, por lo que ellos consideraron que la condición poliquística es más frecuente en las vacas con quistes incluso que la aparición de ovulaciones múltiples en vacas normales.

1.4.2. Incidencia y prevalencia.

La incidencia de COD en vacas lecheras varía entre el 5% y el 10%, habiéndose hallado proporciones aún mayores (30%) dependiendo del país, el establecimiento y el manejo de los animales (Casida y Chapman, 1951; Kesler y Garverick, 1982; Laporte y col., 1994; Fleischer y col., 2001). No obstante, otros estudios han fallado en establecer la incidencia y/o prevalencia de la enfermedad (López-Díaz y Bosu, 1992). Teniendo en cuenta las definiciones de “incidencia” y “prevalencia”; la prevalencia no es un parámetro muy utilizado debido a que no es relevante determinar el número de casos de COD en cierto día de la lactancia. Esto se muestra claramente en un estudio de Heuer y col. (1999) donde se observó que el rango intercuartil (10-90 %) de la ocurrencia de COD posparto fue entre 33 y 148 días (n : 1152). Otros autores observaron que el 24 % de los quistes que aparecen en los primeros 39 días posparto regresan espontáneamente (Arbeiter y col., 1990). Youngquist y Braun (1986) plantearon que la recuperación espontánea podría alcanzar el 60 % si la condición se presenta antes de los 30 días posparto. Así, la incidencia real resulta difícil de estimar y se encuentra influenciada por el momento de la realización del primer examen posparto, dependiendo del protocolo de estudio de la fertilidad utilizado (Opsomer y col., 1996).

Por otra parte, la incidencia de COD varía de acuerdo a la cantidad de partos. En estudios hechos por Hackett y Batra (1985; n = 1830) y Fleischer y col. (2001; n = 2197), la incidencia de COD en el periodo lactacional fue de 5,7 % y 7,4 % respectivamente en vaquillonas, y 18 % y 13,7 % en vacas multíparas (Hooijer, 2003).

1.4.3. Factores predisponentes en la formación de quistes ováricos.

Existen diversos factores que contribuyen al desarrollo de quistes ováricos en rodeos lecheros. Estos pueden clasificarse en factores generales y factores específicos.

1.4.3.1. Factores Generales

Dentro de este grupo se encuentran factores tales como la herencia, la producción de leche, la edad, momento reproductivo, condición corporal y la estación del año. Existen evidencias del rol de la herencia en la formación de quistes ováricos. Se

sabe que la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en algunas líneas de sangre de ganado, aunque este fenómeno de herencia es bajo. La alta producción láctea se correlaciona positivamente con el desarrollo de quistes, pero se considera una consecuencia más que una causa (Nanda y col., 1989).

La tasa de quistes ováricos aumenta con la edad y tiene una distribución variable según la estación del año (Garverick, 1997). Si bien no se ha demostrado que el fotoperíodo se relacione con el desarrollo de COD podría actuar como un factor predisponente, dado los antecedentes en bovinos y en otras especies (Salveti y col., 2004; Palomar y col., 2007). La mayor frecuencia de la enfermedad en el puerperio es una expresión evidente de la disfunción endocrina característica de esta fase delicada de la vida reproductiva en la hembra bovina.

La condición corporal de los animales es un factor predisponente importante: las vacas con una condición corporal mayor a 4 (escala de 0 a 5) tienen una frecuencia de 2,5 veces superior de presentación de quistes con respecto a las que poseen una condición corporal menor o igual a 3.

Además, otros factores que contribuyen en la patogénesis de la COD son la involución uterina retardada, los problemas del posparto temprano tales como la fiebre de leche y la retención de placenta (Bosu y Peter, 1987).

1.4.3.2. Factores Específicos

Alimentación: 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. Esta enfermedad es muy común en hembras de alta producción y durante la lactancia temprana. En ese momento, la mayor parte de la energía del animal es destinada hacia la producción de leche y requerimientos de mantenimiento, provocando una mayor vulnerabilidad de la vaca a disturbios endocrinos. Con respecto a los desbalances metabólicos, se ha sugerido que la resistencia insulínica y la hiperinsulinemia no son factores relacionados a COD en vacas, teniendo en cuenta que sí están altamente relacionados con el Síndrome Poliquístico Ovárico (PCOS) que se presenta en la mujer (Opsomer y col., 1999). Por otro lado, el rol de los fitoestrógenos aún no ha sido establecido, sin embargo, muchos

investigadores han sugerido que el forraje con alto contenido de componentes estrogénicos podría estar asociado con la presentación de la enfermedad (Roberts, 1986).

Infecciones uterinas: Durante el período posparto, las hembras bovinas lecheras son susceptibles a una alta variedad de procesos patológicos, incluyendo retención de placenta, endometritis, metritis, hipocalcemia, y anestro posparto. Todas estas condiciones han sido correlacionadas positivamente con la COD (Kesler y col., 1980; Garverick 1997). Se sabe que el eje hipotálamo-hipofisario es menos sensible a los estrógenos en el período posparto y como resultado de esto hay un bloqueo de los ciclos ováricos. El funcionamiento normal de la retroalimentación positiva de los estrógenos es restaurado alrededor de dos semanas posparto en hembras bovinas lecheras. Es a partir de los trabajos de Bosu y Peter (1987) que se demuestra en forma evidente que las infecciones uterinas posparto causadas por bacterias Gram (-), capaces de sintetizar y liberar endotoxinas, estimulan la liberación de cortisol adrenal suprimiendo de este modo el pico preovulatorio de la LH y consecuentemente conducen a la formación de quistes ováricos foliculares. Las endotoxinas y sus mediadores, tales como las interleuquinas, son responsables de la mayoría de los efectos patógenos. Por otra parte, las interleuquinas son capaces de inducir la liberación de hormona liberadora de corticotrofina (CRH) del hipotálamo y consecuentemente la adrenocorticotrofina (ACTH) de la hipófisis, lo cual estimula a la glándula adrenal a incrementar la producción de corticoesteroides, e inhibe la formación de receptores de LH en células de la granulosa. Todas estas acciones resultan en un aumento del cortisol, y la supresión del pico preovulatorio de LH. De este modo el efecto de las endotoxinas y sus mediadores puede ser considerado un ejemplo particular de respuesta al estrés (Nakao y Grünert, 1990).

Estrés: Cualquier factor considerado provocador de estrés estimula al eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, el cual a su vez modula al eje hipotálamo-hipofisario-gonadal modificando la secreción de gonadotrofinas. El pico preovulatorio de LH es especialmente sensible al efecto inhibitorio de la ACTH y glucocorticoides exógenos en la vaca (Stoebel y Moberg, 1982; Moberg, 1991; Ribadu y col., 2000). Experimentalmente, la inhibición del pico preovulatorio de LH mediante el tratamiento

con ACTH resultó en el desarrollo de quistes ováricos en bovinos (Refsal y col., 1987; Dobson y col., 2000) y ovinos (Cooke y Benhaj, 1989). Los glucocorticoides son factores claves que afectan al eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, y otras hormonas como la ACTH y la CRH juegan un papel secundario (Moberg, 1991). Además de la CRH y los derivados de la proopiomelanocortina (POMC), como la beta endorfina, tienen receptores presentes en la glándula adrenal y las gónadas, y podrían actuar como señales autócrinas y parácrinas en la regulación de la secreción de gonadotropinas. Se cree que los péptidos opioides endógenos (producidos por la hipófisis y el cerebro) bloquean la onda preovulatoria de LH inducida por los estrógenos y la liberación de GnRH (Malven, 1986).

La inhibición de la secreción de la LH hipofisaria, consecuencia de la acción fisiológica de los glucocorticoides, podría ser causada por la modificación en la retroalimentación de los esteroides gonadales, dado que los corticoides reducen el efecto estimulante de los estrógenos sobre la secreción de la LH.

1.4.4. Etiología y patogenia.

La patogenia de la COD es compleja y puede tomarse como 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). Debido a la gran cantidad de factores involucrados en la formación de quistes ováricos, la causa primaria de la enfermedad no ha sido establecida claramente aún. En el momento en que se diagnostica (anatómica, histológica y clínicamente) se desconocen los procesos que condujeron a su formación y futura regresión-recambio de los quistes.

La hipótesis más aceptada en la actualidad es que el desarrollo de los quistes está asociado a un desequilibrio neuroendocrino a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, el cual controla todas las funciones reproductivas incluyendo el crecimiento y desarrollo folicular, la ovulación, mantenimiento de la preñez, y comportamiento reproductivo en los vertebrados.

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 causa

probable podría ser la inhibición que ejercen los estrógenos sobre la secreción de FSH cuando están en niveles más elevados que lo normal. Luego de tres a cinco días la hembra aparentemente se adapta a la concentración elevada de estrógenos y la concentración de FSH aumenta, estimulando el crecimiento de otros folículos, algunos de los cuales llegarían a alcanzar e incluso superar el tamaño ovulatorio. Esto puede ocurrir en condiciones en que un único quiste está presente y una nueva onda folicular comienza y un/múltiples folículo/s dominante/s se desarrolla/n.

Existe acuerdo sobre la importancia de la alteración en el pico preovulatorio de LH que desencadena la ovulación del folículo dominante de la última onda folicular, como causa final de la formación del quiste. En general se considera que las hembras bovinas con quistes foliculares tienen una secreción basal elevada de LH durante el crecimiento folicular, seguida de una supresión del pico preovulatorio de LH en el momento de la maduración (Hamilton y col., 1995).

Sobre la base de los conocimientos actuales del mecanismo de la ovulación y la respuesta a distintas terapéuticas hormonales, se puede afirmar que cualquier obstáculo en el proceso ovulatorio puede determinar la formación de quistes. En este sentido, las alteraciones en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal serían fundamentales en la etiopatogenia de la enfermedad, por lo tanto, es de vital importancia la comprensión de los posibles mecanismos involucrados:

1.4.4.1. Disfunción Hipotálamo-Hipofisaria.

La hipótesis más aceptada en cuanto a la formación de los quistes incluye la teoría de una disfunción del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Liptrap y McNally, 1976; Kesler y Garverick, 1982; Eyestone y Ax, 1984; Bosu y Peter, 1987; López-Díaz y Bosu, 1992; Hamilton y col., 1995; Garverick, 1997; Zulu y Penny, 1998; Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000; Peter, 2004; Vanholder y col., 2006).

La naturaleza pulsátil de la secreción de GnRH, que resulta en secreciones pulsátiles de LH, es la señal individual de mayor importancia en el control del sistema reproductivo (Thiéry y Martin, 1991). En la hipótesis que involucra al eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, la causa principal de la formación de quistes es una deficiencia en la onda preovulatoria de LH o un patrón de liberación aberrante de esta hormona. Se

sabe que no todos los pulsos de GnRH son seguidos por pulsos subsiguientes de LH, y un aumento en la frecuencia de los pulsos de GnRH conduce a una disminución en la amplitud de los pulsos de LH (Clarke y Cummins, 1985). En primates no humanos se ha postulado que la liberación de formas fisiológicamente inactivas de gonadotrofinas liberadas por la hipófisis desarrolla un antagonismo competitivo con formas biológicamente activas para prevenir la ovulación. Una alteración en el proceso de retroalimentación positiva de los estrógenos resulta en una falla o en una inadecuada liberación de GnRH desde el hipotálamo. La respuesta hipofisaria para este evento es una liberación inadecuada o excesiva de LH o la liberación en un momento inapropiado.

Si bien no se conoce el rol exacto de la LH en la patogenia de la enfermedad, recientemente se ha sugerido que una reducción en los pulsos de LH podrían relacionarse con la no ovulación en estos animales (Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000). Las vacas con COD y con niveles elevados de estrógenos endógenos fallan en generar un pico de LH en respuesta a una dosis de estradiol exógeno, indicando que se ha perdido la capacidad de responder a la retroalimentación positiva del estradiol sobre el eje hipotálamo-hipofisario (Zaied y col., 1981; Refsal y col., 1988; de Silva y Reeves, 1988). Esto podría deberse a cambios en la expresión de los receptores hormonales tanto esteroides (RE, RP y RA) como proteicos (LHr, FSHr) a nivel hipotálamo-hipofisario (Odoe y col., 1999).

En un estudio realizado por Hamilton y col. (1995) se detectó una concentración promedio mayor tanto de LH como de 17- β -estradiol circulantes en las vacas con quistes, si se las comparaba con vacas con ciclos normales o con recuperación espontánea, no registrándose un pico preovulatorio de LH en las hembras con COD. La secreción aumentada de LH en las hembras bovinas con quistes podría estimular un incremento en el 17- β -estradiol y este incremento podría causar un aumento en la secreción de LH, creando así un efecto cascada que afectaría la respuesta ovárica a la secreción de LH. Además, la secreción basal aumentada de LH en vacas con COD puede estar asociada con el contenido elevado de GnRH en el tallo hipofisario-eminencia media, el sitio de liberación de GnRH. La falta del pico preovulatorio de LH en estas vacas podría estar relacionado con el menor contenido de GnRH en el área preóptica-supraquiasmática, y más elevado en el tallo hipofisario-eminencia media, así

como una respuesta alterada a la retroalimentación positiva del 17- β -estradiol, ya sea a nivel del hipotálamo o de la hipófisis. Por lo tanto, un incremento anormal en la liberación de LH durante la fase folicular (como resultado del aumento de GnRH en la eminencia media) y la ausencia del pico preovulatorio de LH (disminución de GnRH en el área preóptica-supraquiasmática) podría conducir a la formación de quistes (Vanholder y col., 2006).

Por otro lado, los niveles subluteales de progesterona en animales con la enfermedad sugieren que la demora en reanudar la ciclicidad normal podría deberse a la inhibición que ocurre a nivel del eje hipotálamo-hipofisario por la presencia de esta hormona (Hatler y col., 2003).

1.4.4.2. Disfunción ovárica.

Aunque muchos estudios han caracterizado la dinámica del crecimiento folicular, la comprensión de los cambios celulares y moleculares que ocurren dentro del folículo ovárico previo al proceso de anovulación es aún escasa. Los cambios celulares pueden presentarse como una producción aberrante de factores de crecimiento por las células de la granulosa (Ortega y col., 2007b, 2008; Rey y col., 2009), alteraciones en las proteínas que componen el citoesqueleto celular, ya sea en cantidad o tipo de proteínas (Salveti y col., 2003; Ortega y col., 2007a) o por la secreción inapropiada de proteínas de la matriz extracelular (Salveti y col., 2003). Entre las proteínas de la matriz extracelular, la vitronectina y la fibronectina podrían tener un rol importante y su producción parecería estar influenciada por el tamaño del folículo (Perrone y col., 1995; Meter, 2004). Estudios previos llevaron a suponer que las alteraciones en la expresión y cantidad de receptores, tanto de hormonas hipotálamo-hipofisarias como de hormonas esteroides, podrían ser un factor relacionado con el proceso de anovulación. La caracterización de estos cambios luego de la formación de los quistes puede dificultar la comprensión del mecanismo de la enfermedad, por lo tanto deberían documentarse durante el desarrollo de los quistes. Estudios realizados por varios autores sugieren que la alteración en la expresión de receptores de esteroides, particularmente los de progesterona y estrógenos, podrían estar involucrados en el proceso de anovulación (Odore y col., 1999; Salvetti y col., 2007,2009a). Un evento importante en las células

que componen el folículo quístico es la expresión de los genes responsables de la proliferación, apoptosis y diferenciación celular, los cuales probablemente estén involucrados en la anovulación y en el proceso de formación y mantenimiento de los quistes (Salveti y col., 2004; Isobe y Yoshimura, 2007; Peter y Dhanasekaran, 2003; Ortega y col., 2007c; Salvetti y col., 2009b). Otras hipótesis involucrarían el mecanismo del estrés, mediante el cual el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal podría afectar la función ovárica (Ribadu y col., 2000; Baravalle y col., 2006). Se ha demostrado que los corticoides tienen la capacidad de alterar la síntesis de esteroides ováricos *in vivo* e *in vitro* y además se han localizado receptores de corticoides en el tejido ovárico (Schreiber y col., 1982). Se sabe que en células de la granulosa en cultivo, la dexametasona inhibe la actividad aromatasa inducida por la FSH, y recíprocamente los corticoides incrementan la síntesis de progesterona estimulada por la FSH, por la estimulación de la actividad de la 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3 β -HSD) (Hsueh y Erickson, 1978; Adashi y col., 1981; Moberg, 1991). En el macho los corticoides reducen los receptores de LH en las células de Leydig. Se cree que el cortisol liberado en situaciones de estrés podría ser almacenado en el líquido folicular e inducir las alteraciones de la esteroidogénesis y la concentración de receptores de LH, a nivel de la pared folicular lo que contribuiría al desarrollo de los quistes ováricos (Moberg, 1991).

1.4.5. Dinámica folicular en la COD: Interacciones y perfiles hormonales.

Las vacas con COD pueden exhibir ondas de crecimiento folicular a intervalos más prolongados e irregulares con respecto a las vacas con ciclos normales. Dado que los quistes pueden inhibir el desarrollo de otros folículos, generalmente sólo folículos de 5 mm o menos pueden existir durante el período de dominancia del quiste. La regresión funcional del quiste probablemente se produzca cuando el periodo con niveles bajos de LH sea superior que el necesario para la regresión de un folículo dominante. y esto puede resultar en una demora en la iniciación de una onda nueva de crecimiento folicular. Los intervalos desde la detección de una onda foliculo/quística son más extensos y variables (6 a 26 días), comparados a los intervalos de emergencia de las ondas de crecimiento folicular, en vacas con ciclos estrales normales (6 a 14 días) (Hamilton y col., 1995; Yoshioka y col., 1998; Rutter y Russo, 2000).

Tanto en vacas normales como en vacas con quistes, la concentración de FSH aumenta de 1 a 2 días antes de la emergencia de la nueva onda folicular (Adams y col., 1992; Hamilton y col., 1995). Por el contrario, la concentración basal promedio, y la frecuencia pulsátil de LH es más elevada en vacas con quistes que en vacas normales, y este aumento en la frecuencia pulsátil de LH puede promover la esteroidogénesis folicular, y ser responsable de la concentración mayor de 17- β -estradiol en vacas afectadas.

Como principio general, la concentración plasmática de progesterona es baja en sangre y leche en vacas con quistes foliculares, y elevada en vacas con quistes luteales. Las hembras con quistes foliculares pueden sufrir varios grados de luteinización, y aumentar los niveles de progesterona, pero éstos, generalmente, permanecen por debajo de los niveles luteales de las vacas normales (Hatler y col., 2003). La concentración plasmática de testosterona en hembras con COD, no registra variaciones con respecto a los niveles durante el ciclo estral normal, a diferencia de lo que ocurre en otras especies (Abbott y col., 2002).

1.4.6. Clasificación de los quistes ováricos.

De acuerdo a las características histológicas y la actividad de 15 enzimas en la pared folicular, Nakama (1976, citado por Rutter y Russo, 2000) realizó una clasificación muy completa de los quistes ováricos en vacas y cerdas, e identificó cuatro categorías (López-Díaz y Bosu, 1992; Rutter y Russo, 2000):

Tipo 1: con presencia de las capas de la teca y la granulosa.

Tipo 2: con la teca presente y la capa de células de la granulosa reducida, atrésica o ausente.

Tipo 3: sólo las células de la teca presentes. En la teca interna sólo se observa una capa delgada de la teca externa yuxtapuesta.

Tipo 4: sólo capas de las células de la teca presentes y luteinizadas.

Los autores mencionados determinaron la actividad de varias enzimas dentro de las cuales estaban la fosfatasa alcalina, la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, y la 3 β -HSD. La 3 β -HSD es responsable de la conversión de pregnenolona a progesterona, y de

la 17-dehidroepiandrostenediona a androstenediona, y su actividad es baja en los Tipos 1 y 2, pero aumenta progresivamente en los tipos 3 y 4, y además es responsable del grado de luteinización de la pared del quiste. En base a estos resultados, dichos autores sugirieron que los quistes se transforman del tipo 1 al 4 y que la proporción de quistes con luteinización era mayor cuando estaban ausentes las capas de células de la granulosa.

Los quistes con células de la granulosa sin alteración, mostraban actividad de aromatasas elevada, y una concentración elevada de estrógenos en el líquido folicular. Por el contrario, los quistes sin capa de la granulosa eran aromatasas negativas, y contenían gran cantidad de progesterona. Los quistes de tipo 1 presentaron concentraciones altas de 17 β -hidroxiprogesterona, andrógenos y estrógenos, pero niveles bajos de progesterona. El tipo 4, similar al cuerpo lúteo, podría no tener actividad de 17 α -hidroxilasa, la cual es responsable de la transformación de la progesterona en 17 α -hidroxiprogesterona y posteriormente en androstenediona.

Por lo tanto, el tipo 1 tiene capas de células de la granulosa, actividad aromatasas elevada y es una estructura que produce estrógenos. El tipo 4 no posee capas de células de la granulosa, tiene actividad de 3 β -HSD elevada, ausencia de actividad de aromatasas y posible bloqueo de la 17 α -hidroxilasa, y es una estructura que produce progesterona.

Por otra parte, las estructuras quísticas con capas de células de la granulosa (Tipo 1), pueden no constituir una categoría quística única, sino un grupo heterogéneo con diferente capacidad estrogénica y grados diversos de vascularización a nivel del aparato genital (folículos, ovarios, útero.).

Según el tipo histológico de quiste (tipo 1 al 4) existe una relación clara en el contenido de esteroides del fluido folicular. Sin embargo, no existe correlación entre la concentración de esteroides del plasma y del fluido folicular. Sólo el quiste luteinizado, que es rico en progesterona de origen folicular, muestra correlación entre el nivel de progesterona plasmática y en el fluido folicular.

Además, la concentración plasmática de 17 β -estradiol es elevada durante la etapa de crecimiento de un quiste y relativamente baja cuando este disminuye de tamaño y es reemplazado por otro/s quiste/s o por folículos dominantes ovulatorios (recuperación espontánea) (Yoshioka y col., 1998).

2- OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2. 1. Objetivo general:

Comparar un modelo experimental con casos espontáneos de COD en bovinos, integrando varios métodos de estudio, para contribuir a una mejor comprensión de esta enfermedad en especies de interés zootécnico.

Proponemos examinar la regulación de la expresión relativa de los receptores hormonales y su relación con el balance proliferación celular/apoptosis en los diferentes componentes tisulares ováricos de animales con COD.

La hipótesis es que los patrones alterados en la secreción de hormonas, tanto ováricas como hipotálamo-hipofisarias, producirían modificaciones en la expresión de receptores hormonales así como en los mecanismos de proliferación y apoptosis en las estructuras foliculares, y serían parte de la patogenia de quistes en los ovarios.

2. 2. Objetivos específicos:

1. Inducir experimentalmente quistes ováricos en vaquillonas utilizando un método de inducción hormonal.

2. Monitorear por ultrasonografía la dinámica ovárica, determinando el momento de aparición y las características de las estructuras quísticas así como la persistencia de las mismas.

3. Realizar una valoración cualitativa y semicuantitativa de la expresión de receptores de estrógenos y progesterona en las distintas estructuras ováricas, caracterizando sus variantes e isoformas.

4. Evaluar la proliferación celular en las diferentes estructuras ováricas en los animales con COD, analizando la expresión de marcadores de proliferación celular.

5. Valorar la apoptosis en los distintos compartimientos celulares de los folículos y quistes foliculares, a través de la detección de bcl-2, bax, caspasa-3 y la detección *in situ* (TUNEL).
6. Identificar qué tipos celulares de los que integran el folículo ovárico sufren modificaciones en la expresión de los marcadores estudiados durante el transcurso de la enfermedad
7. Analizar los niveles de hormonas tanto en suero sanguíneo como en líquido folicular.
8. Determinar similitudes y diferencias entre los hallazgos efectuados en el modelo experimental, con aquellos realizados en ovarios quísticos espontáneos, provenientes de bovinos sacrificados en frigoríficos.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Procedimientos realizados con animales:

3.1.1. Modelo Experimental:

Los quistes ováricos han sido inducidos en los bovinos por una variedad de tratamientos aplicados en el diestro tardío o en el proestro. Tales tratamientos incluyen: administración de estrógenos; combinación de progesterona y estradiol (Cook y col., 1990); antisuero contra LH bovina; testosterona (Fathala y col., 1978) o ACTH exógena (Liptrap y Mc Nally, 1976; Ribadu y col., 2000; Dobson y col., 2000; Ortega y col., 2007c).

Desde el punto de vista reproductivo, la ACTH causa una supresión de los valores de LH basal durante la fase folicular del ciclo estral. Dobson y Smith (2000) han mostrado que la administración de ACTH durante la fase folicular resulta en una disminución en los pulsos de LH. Por consiguiente, podría suponerse que la ACTH podría inducir quistes ováricos por una alteración de la frecuencia de pulso de la LH. Este modelo resulta en la generación de quistes foliculares en un alto porcentaje de los animales tratados por lo cual fue elegido para el desarrollo del presente trabajo.

3.1.2. Animales:

Los procedimientos efectuados con animales experimentales se realizaron de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. Federation of Animal Science Societies, 1a. Ed. 1999. USA). Además el protocolo fue enviado al Comité de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL) quien lo evaluó y aprobó.

Se utilizaron 10 vaquillonas de la raza Holando Argentino puros por cruza, de entre 18 y 24 meses de edad, con un peso promedio de 400 kg., examinadas por tacto rectal y ultrasonografía antes del comienzo de la experiencia para comprobar la normalidad en su tracto reproductor; y la normalidad y regularidad de sus ciclos estrales. Los animales fueron alojados en corrales descubiertos; la alimentación se basó en alimento balanceado comercial, heno de alfalfa y agua ad libitum.

Todas las vaquillonas fueron sometidas a la sincronización de sus ciclos estrales mediante el protocolo Ovsynch (Pursley y col., 1995) de la siguiente manera: 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 para detectar el inicio del celo 24 horas luego del segundo tratamiento con GnRH y luego cada 12 horas. La primer detección de comportamiento de estro fue designado como día cero del ciclo y confirmado por ultrasonografía (Sirois y Fortune, 1998). Durante este período, los animales no recibieron ningún otro tratamiento.

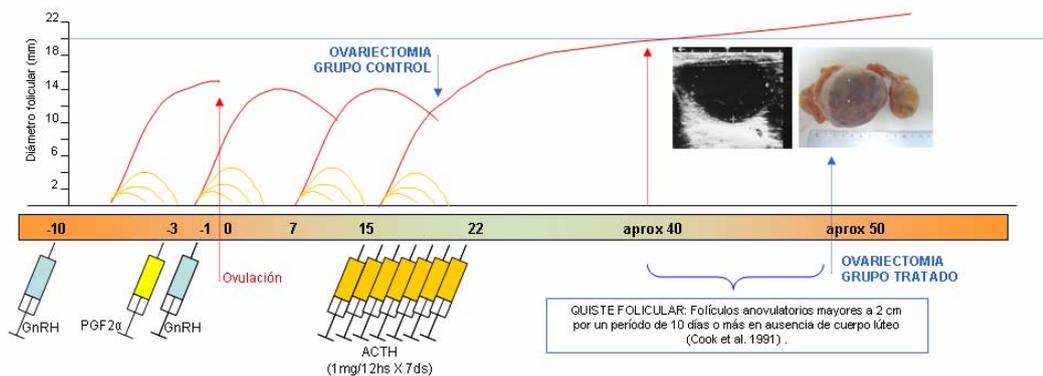


Figura 5. Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes ováricos foliculares mediante de ACTH.

3.1.3. Grupos experimentales:

Los animales fueron distribuidos en 2 grupos. Cada grupo fue alojado en un corral individual.

Grupo I (n=6): luego de la sincronización de celo, estas vaquillonas fueron tratadas con 100 UI de ACTH (1mg/ml de Tetracosactido [corticotropina], Synacthen depot, laboratorio Novartis), cada 12 horas por un periodo de 7 días seguidos a partir del día 15 del ciclo estral (figura 5). 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 ACTH exógena (Liptrap y McNally, 1976; Dobson y col., 2000; Ortega y col., 2008).

Grupo II (n=4): luego de la sincronización de celo este grupo de hembras fue mantenido en condiciones ambientales normales, y sin tratamiento; como grupo control.

3.1.4. Ultrasonografía:

Para monitorear los cambios en el ciclo estral se realizaron exámenes diarios mediante tacto rectal y ultrasonografía a las vaquillonas de ambos grupos hasta la obtención de las muestras. Se utilizó un equipo de ultrasonografía Pie Medical 485 Anser Vet (Holanda), equipado con sonda transdutora transrectal en doble frecuencia de onda (5.0-7.5 MHz.). El seguimiento se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Sirois y Fortune (1988) y las imágenes se almacenaron para efectuar las mediciones de las estructuras foliculares ováricas.

Se tomaron como parámetros normales: un diámetro medio de los folículos ovulatorios de 13-15 mm, una duración media del ciclo estral de 20-21 días, y la presentación del comportamiento de celo el día 19-20 del ciclo estral.

Se consideraron estructuras quísticas todos aquellos folículos con un diámetro mayor de 20 mm y que persistieron por 10 días sin que se produzca la ovulación o la formación de un cuerpo lúteo (Silvia y col. 2002). El primer día de formación del quiste fue el día en que la formación folicular alcanzó 20 mm.

3.1.5. Toma de las muestras:

Una vez detectada la enfermedad quística ovárica se procedió a la obtención de los ovarios destinados a los estudios histológicos, inmunohistoquímicos y para técnicas de WB. La extracción de las muestras se realizó mediante la castración por el flanco de las hembras. Se realizó el abordaje por el flanco izquierdo, el cual se preparó quirúrgicamente. Se realizó anestesia local infiltrativa y anestesia epidural, con clorhidrato de lidocaína al 2% (Anestésico 2%, Rudavet®). Se procedió a la incisión desde dorso-caudal hacia ventro-craneal de la piel del flanco y los planos musculares, de una longitud suficiente como para que entre la mano del cirujano. Una vez localizados, los ovarios fueron extraídos, (ligando los vasos sanguíneos que lo irrigan),

procediendo luego a la sutura de todos los planos de acuerdo a la técnica quirúrgica (Garnero y Perusia, 2002).

Se procedió a tomar muestras como se detalla a continuación:

a) Muestras de pared folicular, tanto de quistes foliculares como de folículos sanos (en los animales control), las que fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y conservadas en ultrafreezer a -80°C hasta su procesamiento (extracción de proteínas).

b) Muestras de líquido folicular (LF) de los folículos quísticos. Se realizó la extracción del LF mediante aguja en el folículo intacto y estas muestras fueron congeladas a -20°C para posteriormente ser utilizadas para mediciones hormonales.

c) El resto de los ovarios extraídos fueron reducidos y fijados en formol tamponado al 10% durante 8h a 4°C .

d) Previamente a la ovariectomía se obtuvieron diariamente muestras de sangre, desde el inicio del tratamiento con ACTH hasta el día de la castración. La sangre fue procesada para obtener suero, el cual fue conservado a -20°C . Posteriormente fue enviado para determinaciones de cortisol, LH, FSH, estrógenos y progesterona.

3.1.6. Obtención de material en playa de faena:

En playa de faena, se procedió a la recolección de ovarios de bovinos con alteraciones macroscópicas visibles y compatibles con la descripción de quistes foliculares. Antes de la toma de muestras se corroboró la ausencia de preñez. Se tomaron muestras de pared folicular, las que fueron conservadas a -80°C y de líquido folicular ($n=15$). Además se tomaron muestras de ovarios normales (sin alteraciones macroscópicas visibles) de folículos antrales de diferentes diámetros: folículos pequeños menores a 5 mm ($n=10$) y folículos grandes mayores a 10 mm ($n=10$) (Parrott y Skinner, 1998). Estas muestras se procesaron de acuerdo a lo descrito previamente. Se guardaron además muestras de ovarios normales ($n=10$) y con quistes ($n=15$) en formol al 10% para realizar el procesamiento histológico de rutina para la técnica de inmunohistoquímica.

3.1.7. Cuantificación de los niveles hormonales:

3.1.7.1. Cuantificación de Gonadotrofinas

Los niveles de LH y FSH fueron determinados utilizando un Kit provisto por el NIDDK (National Institute for Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Baltimore, USA) siguiendo la metodología previamente descrita (Ortega y col., 2004). Los coeficientes de variación intra e interensayos para LH y FSH fueron menores a 8 y 12% respectivamente. Las concentraciones mínimas detectables fueron de 0,16 ng/ml para LH y 1,18 ng/ml para FSH.

3.1.7.2. Cuantificación de estradiol, progesterona, testosterona y cortisol.

Las concentraciones de estradiol, progesterona, testosterona y cortisol fueron estimadas por kits para EIA (Active Estradiol EIA, DSL-10-4300; Active Progesterona EIA, DSL-10-3900; Active Testosterone EIA, DSL-10-4000; Active Cortisol EIA DSL-10-2000; Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.2. Procesamiento de las muestras para las técnicas histológicas:

Luego de la fijación con formol tamponado las muestras fueron lavadas en buffer fosfato salino (PBS) y procesadas siguiendo protocolos histológicos de rutina para efectuar la inclusión en parafina (Woods y Ellis, 1994). Por último, se efectuaron cortes seriados de 5 µm de espesor con un micrótopo rotativo, los que se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), fueron secados en estufa a 37°C por 24 hs. Para hacer 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 Nomina Histológica (1994).

3.3. Procesamiento de las muestras para WB:

Se tomaron fracciones de aproximadamente 60 mg de pared folicular de los distintos tipos de folículos (folículos antrales pequeños, grandes y quísticos

espontáneos e inducidos) , las que fueron colocadas en buffer RIPA con inhibidores de proteasas y homogeneizadas con un homogeneizador de mano UltraTurrax. El sobrenadante se obtuvo luego de centrifugar las muestras a 14.000g en centrifuga refrigerada durante 20 minutos. Una vez obtenidos los extractos de proteínas se determinó la concentración proteica de cada muestra mediante el método Lowry modificado de Bio-Rad. Este proceso se realizó en microplacas y las lecturas se hicieron en un lector de microplacas a 650-700 nm. Se utilizó un patrón de BSA para realizar las inferencias.

3. 4. Procesamiento de las muestras para RT-PCR:

3. 4. 1. Extracción de ARN total

El ARN total de las muestras de pared folicular fue extraído usando el reactivo Trizol LS (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente: se homogeneizaron muestras de aproximadamente 50 mg en 1 ml de reactivo con un homogeneizador de mano UltraTurrax, posteriormente se incubó durante 5 minutos a 25° C. El sobrenadante fue transferido a un eppendorf estéril y el ARN fue extraído con cloroformo, previa agitación vigorosa, incubando 15 minutos a 4°C. Se realizó una centrifugación a 12000g para separar la fase acuosa de la orgánica. Posteriormente se precipitó el ARN con un volumen equivalente de alcohol isopropílico incubando por 30 minutos a -20°C y se separó por centrifugación a 12000g. El ARN obtenido se lavó con etanol 75% por 10 minutos a 4°C, se resuspendió con agua DEPC precalentada a 60°C y se cuantificó por espectrofotometría a 260nm.

3. 4. 2. Transcripción Reversa

Antes de comenzar la RT-PCR y a los efectos de eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico se realizó un tratamiento con ADNasa (Invitrogen).

La transcripción reversa se realizó mediante la adición de una cantidad constante de ARN a una mezcla con los 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). Las condiciones utilizadas para la transcripción reversa fueron 10 minutos a 25°C para el annealing, 50 minutos a 37°C para la síntesis del ADNc y 15 minutos 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 (TECHNE TC-312, Stone, Reino Unido).

La concentración de ADNc obtenida fue cuantificada por un método fluorimétrico (Qubit, Invitrogen) con el objeto de utilizar luego una cantidad constante para la técnica de amplificación del ADN (PCR).

3.5. Evaluación de la proliferación celular

3.5.1. Inmunohistoquímica

Se evaluó a través de la expresión de Ki-67 que fue revelada por medio de una técnica de inmunohistoquímica indirecta usando un anticuerpo monoclonal específico (Tabla 1).

Las inmunomarcaciones se realizaron sobre cortes de 5 μ m de espesor, siguiendo el protocolo descrito previamente por Ortega y col. (2004), según se detalla a continuación:

- 1- Desparafinización en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 minutos cada uno.
- 2- Hidratación en una serie de alcoholes de graduación decreciente, a partir de alcohol etílico absoluto (dos pasajes de 3 minutos), alcohol etílico 96° (dos pasajes de 3 minutos) y finalmente alcohol etílico 70° (un pasaje de 3 minutos).
- 3- Hidratación en PBS pH 7,2 durante 5 minutos
- 4- Tratamiento de recuperación antigénica. Se realizó en un horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 1000 W). Como solución de recuperación se usó Buffer Citrato 0,01 M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en un Coplin sumergido en un recipiente con agua, y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación: 3 minutos a 100% de potencia, 12 minutos al 40% y 20 minutos dentro del microondas apagado.
- 5- Bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa, sumergiendo las muestras durante 10 minutos 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 minutos.
- 6- Dos lavados en PBS durante 5 minutos.

- 7- Bloqueo de los sitios de unión no-específicos incubando 20 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda con una solución de suero normal de cabra al 5%.
- 8- Incubación con anticuerpo primario: se usó un anticuerpo monoclonal para Ki-67, (tabla 1) diluido 1:30 durante 16 horas a 4°C (toda la noche en heladera). Para los controles de especificidad se substituyó el anticuerpo primario por suero normal de cabra.
- 9- Después de la incubación con el anticuerpo primario la cámara se retiró de la heladera y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos
- 10- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- 11- Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado preabsorbido (cabra anti-ratón) diluido 1:150, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 12- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- 13- Incubación con complejo streptavidina-peroxidasa lista para usar, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 14- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- 15- Revelado de la reacción con diaminobencidina (DAB), utilizando la solución comercial de Dako. Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y de ese modo estandarizarlo.
- 16- Lavados con agua destilada, 2 de 5 minutos 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. Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.

Proteína	Anticuerpo	Dilución	Características especiales de la técnica de IHQ.
Ki-67	Clon BGX-Ki67	1:30	Técnica descrita en la pág. 56.
Bax	Policlonal. E63. Abcam	1:50	Sin recuperación antigénica
Bcl-2	Policlonal. ab 7973. Abcam.	1:30	Sin recuperación antigénica.
Caspasa-3	Policlonal anti-caspase 3 active. AF 835.	1:300	Sin recuperación antigénica.
Receptor de estrógenos α (RE α)	Clon 1D5. Biogenex.	1:40	Técnica descrita en la pág. 56.
Receptor de estrógenos β (RE β)	Policlonal. PU385-UP. Biogenex	1:250	Técnica descrita en la pág. 56.
Receptor de progesterona (RP)	Policlonal. PR130. LETH.	1:80	Técnica descrita en la pág. 56.

La marcación fue siempre nuclear y todas las células inmunomarcadas para Ki-67 se consideraron positivas y fueron contadas. El resultado se expresó como porcentaje de células marcadas sobre el total de células para cada capa folicular en cada categoría estudiada.

3.5.2. Evaluación de la expresión de ARNm de ciclinas D1 y E mediante RT-PCR.

La técnica de PCR se realizó utilizando cebadores específicos. La secuencia de éstos se obtuvo de trabajos publicados previamente (Yamauchi y col., 2003). Las secuencias de los cebadores usados y el tamaño de los productos amplificados de ADNc se muestran en la tabla 2. Se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (GAPDH) como control interno. La PCR se llevó a cabo resuspendiendo cantidades constantes de ADN en una solución madre de agua bidestilada con MgCl₂ (50 mM), cebador sentido (20 µM), cebador antisentido (20 µM), dNTPs (25 mM), buffer Taq 10X (Invitrogen) y Taq polimerasa (5 U/µl, Invitrogen). El número de ciclos, la temperatura de alineamiento y la cantidad de ADN a sembrar debieron ser ajustados para cada par de cebadores. Los amplificados obtenidos de las distintas PCR se corrieron en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed™ (Biotium) de manera conjunta a un marcador de pares de bases (Ladder 100pb, PB-L Productos Biológicos, Buenos Aires, Argentina) con el objetivo de determinar la especificidad del producto.

Tabla 2. Cebadores sentido y antisentido para Bcl-2, Bax, ciclinas D1 y E bovinos y condiciones de la PCR.

Gen	Secuencia de Cebadores	ADNc (pb)	Condiciones de la PCR	Referencia
Ciclina D1	Sentido 5'-TGGAGCCCCTGAAGAAGAGC -3' Antisentido 5'- GGAGGGTGGGTTGAAATGA -3'	332	94, 55,72°C 33 ciclos	Yamauchi y col., 2003
Ciclina E	Sentido 5'-TTCTGGATTGGCTGATGGAG -3' Antisentido 5'-AAGCAGCGAGGCACCATAA-3'	462	94, 52,4,72°C 33 ciclos	Yamauchi y col., 2003
Bcl-2	Sentido 5' ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3' Antisentido 5' CAGACTGAGCAGTGCCTTCA-3'	201	Multiplex Bcl-2 + Bax: (56 °C, 30 s) x 6 ciclos, (58°C, 30 s) x10 ciclos, (60 °C, 30 s) x12 ciclos, [60 °C (-0,5 °C /cycles)] x 6ciclos, (57 °C, 30 s) x6 ciclos, (56 °C, 30 s) x6 ciclos, (55 °C, 30 s) x10 ciclos.	Colitti y col., 2004
Bax	Sentido 5'-TTTGCTTCAGGGTTTCATCC-3' Antisentido 5'-TGGGTGTCCCAAAGTAGGAG-3'	431		
GAPDH	Sentido 5'- CAC CCT CAA GAT TGT CAG CA -3' Sentido 5'- GGT CAT AAG TCC CTC CAC GA -3'	103	94, 52,72°C 31 ciclos	

La bandas obtenidas fueron visualizadas en el gel en un Transiluminador UV (Labnet, Edison, Estados Unidos), se obtuvieron imágenes digitales con una cámara de fotos (Olympus BH-2, Olympus Co., Japan) y se realizó el análisis de las imágenes utilizando el programa Image-Pro Plus 3.0.1 (Media Cybernetics, Maryland, Estados

Unidos). Los niveles de ARNm se expresaron como una relación entre la densidad óptica integrada (DOI) de las bandas de los diferentes mensajeros con su correspondiente GAPDH.

3.6. Evaluación de la apoptosis:

3.6.1. Proteínas relacionadas con la apoptosis evaluadas por inmunohistoquímica.

La apoptosis fue evaluada mediante la detección de proteínas que intervienen en este proceso por inmunohistoquímica. Se evaluaron: caspasa-3, Bcl-2 y Bax. La técnica utilizada es igual a la detallada para Ki-67 con algunas modificaciones, los anticuerpos usados, las concentraciones y particularidades se detallan en la tabla 1. Se digitalizaron imágenes de cada una de las capas de la pared folicular para los folículos: secundarios, terciarios y atrésicos en los dos grupos y quísticos (inducidos y espontáneos). La especificidad de los anticuerpos usados se determinó mediante WB como se detalla más adelante.

3.6.2. TdT-mediated dUTP Nick-End Labelling (TUNEL)

La muerte celular programada de las células que componen el folículo ovárcio fue evaluada mediante la técnica de TUNEL con el kit ApopTag Plus-peroxidasa (Oncor, Gaithersburg, MD) como fue descrito por Slot y col. (2006). Esta técnica utiliza la TdT para catalizar la unión de dATP y dUTP-digoxigenina al extremo 3'OH libre del DNA fragmentado. Los nucleótidos incorporados forman un heteropolímero al azar, que se revela con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa. La reacción fue revelada con DAB. A continuación se realizó una contracoloración con hematoxilina activada. Se digitalizaron imágenes de cada una de las capas de la pared folicular para los siguientes tipos de folículos: secundarios, terciarios y atrésicos en los dos grupos de animales, y quísticos en los animales con COD (inducidos y espontáneos). El protocolo utilizado se detalla a continuación:

- 1- Desparafinización en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 minutos cada uno.
- 2- Hidratación en una serie de alcoholes de graduación decreciente, a partir de alcohol etílico absoluto, alcohol etílico 96° y finalmente alcohol etílico 70° (dos pasajes de 3 minutos cada vez).

- 3- Hidratación en PBS pH 7,2 durante 5 minutos
- 4- Tratamiento de recuperación antigénica con proteinasa K en cámara húmeda, en la estufa de 25°C durante 10 minutos. Luego se realizaron 3 lavados en PBS de 5 minutos cada uno.
- 5- Bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa, sumergiendo las muestras durante 20 minutos en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno 30 volúmenes en metanol absoluto.
- 6- Lavado en PBS durante 5 minutos.
- 7- Escurrir el exceso de solución, colocar en cámara húmeda y cubrir con el buffer de equilibrio durante 10 minutos cubriendo luego el preparado con un folio o plástico.
- 8- Escurrir el exceso de líquido y, sin lavar, colocar la enzima TdT. Incubar a 37°C durante 60 minutos.
- 9- Lavar en Coplins con Stop Wash Buffer. Agitar durante 15 segundos y luego lavar por 10 minutos.
- 10- Tres lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- 11- Escurrir el exceso de líquido, colocar en cámara húmeda y cubrir con anti-Digoxigenina conjugada. Colocar el plástico. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C en estufa)
- 12- Cuatro lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno PBS 4 lavados de 2 minutos cada uno.
- 13- Revelado de la reacción con DAB, utilizando la solución comercial de Dako. Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y de ese modo estandarizarlo en cada caso.
- 14- Lavados con agua destilada, 2 de 5 minutos 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.

3.6.3. Evaluación de la expresión de ARNm para Bax, Bcl-2 y relación Bax/Bcl-2 mediante RT-PCR.

La técnica de PCR se realizó utilizando cebadores específicos. La secuencia de éstos se obtuvo de los trabajos realizados por Colitti y col. (2004). Las secuencias de los cebadores usados y el tamaño de los productos amplificados de ADNc se muestran en la tabla 2. Se utilizó GAPDH como normalizador.

La PCR se llevó a cabo como se describe en el punto 3.5.2 con algunas modificaciones. Se realizó un análisis de PCR Multiplex para determinar los niveles relativos de Bax/Bcl-2 en muestras de quistes ováricos espontáneos y folículos terciarios pequeños y grandes.

3.7. Receptores de Hormonas Esteroides

3.7.1. Inmunohistoquímica

Se utilizó una técnica de inmunohistoquímica indirecta para detectar RE α y β , y RP; tal como se describe para Ki-67, con algunas modificaciones, las cuales se detallan en la tabla 1. Se evaluaron folículos secundarios, terciarios, atrésicos; y folículos quísticos de animales provenientes de matadero tanto controles como con COD espontánea y por otro lado se evaluaron las mismas categorías foliculares en animales controles sincronizados y con COD inducida mediante ACTH. La evaluación de los preparados se realizó con el programa Image ProPlus 3.0 como se detalla mas adelante.

3.7.2. Western Blot

Se llevaron a cabo electroforesis en geles discontinuos con un 10% de acrilamida-bisacrilamida (29:1) en condiciones desnaturizantes para el gel de resolución (Laemmli, 1970). Se utilizaron homogeneizados de pared folicular de folículos antrales pequeños, grandes y quísticos. Las muestras fueron diluidas 1:2 con buffer de muestra para SDS-PAGE, e incubadas en baño termostático a 95°C por 5 minutos. Se utilizó una cuba vertical. Se sembraron los volúmenes adecuados para 40 μ g de proteínas y se realizó una corrida electroforética durante 45 minutos a 25mA para el gel de apilamiento y luego durante 90 minutos a 50 mA para el gel de resolución. Se utilizó el buffer de corrida Tris-Glicina con 0.1 % de SDS pH 8.3. Los marcadores de peso molecular (PM) que se utilizaron se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Estándares de PM para SDS-PAGE, amplio espectro. Kaleidoscope Prestained Standards 161-0324. BIO-RAD.

	Proteína	Peso molecular kDa
	Miosina	195
	b-galactosidasa	131
	Albúmina sérica	85
	Anhidrasa carbónica	40
	Inhibidor de tripsina	31,53
	Lisozima	17,25
	Aprotinina	6,78

Luego de terminada la corrida se procedió a la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa para lo cual se utilizó el buffer de transferencia Towbin modificado compuesto por Tris-Glicina con 20 % de metanol. Se realizó la transferencia en frío a 100 V durante 3 horas. Al término de este periodo se coloreó la membrana con el colorante Rojo Ponceau para ver la efectividad de la transferencia. Con el mismo sentido se coloreó el gel con Coomassie Brilliant Blue 250G. Se procedió a la inmunodetección de las proteínas detalladas en la tabla 4.

En la misma membrana se procedió a la inmunodetección de una proteína constitutiva (β -actina) para asegurar que la cantidad de proteína sembrada fuera constante entre muestras y como normalizador de la técnica (Liao y col., 1999).

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en la técnica de WB.				
Proteína	Anticuerpo	Dilución	Marca	Características
RE α	Anti-Estrogen Receptor α -Clon 1D5	1:50	Biogenex	Monoclonal
RE β	Anti-Estrogen Receptor β - ab 3576	1:500	Abcam	Policlonal
RP	Anti-Progesterone Receptor 130- PR130	1:100	LETH	Policlonal
Actina	Anti-Actin-Clon JLA 20	1:100	DSHB	Monoclonal
Bax	Anti-Bax- E63 (ab32503)	1:500	Abcam	Policlonal
Bcl-2	Anti-Bcl-2 (ab 7973)	1:100	Abcam	Policlonal
Caspasa-3	Anti-caspase 3 active. AF 835.	1:500	R&D Systems	Policlonal

Protocolo para la inmunodetección de las proteínas en las membranas de nitrocelulosa:

1. Enjuagar la membrana de nitrocelulosa con agua destilada y luego con buffer tris salino-Tween (TBS-T) hasta la desaparición del colorante.
2. Bloquear los sitios de unión inespecíficos con TBS-T leche 5 %, 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.
3. Lavados a temperatura ambiente con TBS-T
 - Dos lavados rápidos
 - Un lavado de 15 minutos
 - Dos lavados de 5 minutos
4. Incubar con el anticuerpo primario durante toda la noche en heladera. Para la dilución del anticuerpo primario se utilizó buffer de bloqueo y se realizó mediante la colocación del anticuerpo que cubra la membrana y un folio o nylon sobre la misma para que distribuya el anticuerpo por capilaridad.
5. Lavados a temperatura ambiente con TBS-T
 - Dos lavados rápidos
 - Un lavado de 15 minutos
 - Dos lavados de 5 minutos
6. Incubar con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Para la dilución se utiliza buffer de bloqueo y se procede como en el paso 4.

7. Lavados a temperatura ambiente con TBS-T.
 - Dos lavados rápidos
 - Un lavado de 15 minutos
 - Cuatro lavados de 5 minutos
8. Preparar el reactivo quimioluminiscente (Amersham), colocar la membrana en un recipiente con el reactivo e incubar 5 minutos.
9. Escurrir la membrana y colocarla entre dos hojas de papel celofán.
10. Revelar la membrana en cuarto oscuro con los reactivos de revelado y fijado Kodak; y placas autoradiográficas Amersham.
11. Lavado con agua destilada.
12. Secado de la placa a temperatura ambiente.

3.8. Análisis de los resultados:

Las imágenes generadas con un microscopio Olympus CH2 de los preparados histológicos, fueron digitalizadas mediante una cámara SONY CCD-IRIS conectada a una PC de escritorio. La evaluación de los preparados histológicos, las placas autoradiográficas y los geles de agarosa fue realizada con el analizador digital de imágenes Image Pro-Plus 3.0.

La evaluación de la proliferación celular con Ki-67 y de las células marcadas con TUNEL se efectuó mediante el recuento de células marcadas sobre el total de células para cada capa folicular en las categorías estudiadas. Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas (Salveti y col., 2009b).

La evaluación de caspasa-3, bax y bcl-2 se efectuó mediante un análisis de segmentación de colores en los tonos e intensidades correspondientes a las áreas de reactividad del cromógeno utilizado, concordante con lo observado en los controles positivos. El área inmunohistoquímicamente marcada (IHCSA) se evaluó como un porcentaje del área total evaluada a través de la segmentación de colores, extrayendo los objetos de determinado color (marrón). La coloración marrón fue seleccionada con una sensibilidad de 4 (máximo 5) y luego se aplicó una máscara para la separación permanente de los colores. Se realizó un histograma para determinar el porcentaje del área marcada (Salveti y col., 2004).

Los preparados de inmunohistoquímica para RE y RP se evaluaron de acuerdo a lo descrito por Wang y col., (1999). Brevemente, usando la herramienta de segmentación de colores, se midió el área total positivamente coloreada con DAB

(producto de reacción marrón moderado/intenso (para diferenciarlo del color de fondo)) y se expresó como el porcentaje del área total de núcleos (producto de reacción marrón + color azul de la hematoxilina). Este procedimiento se realizó para cada una de las capas foliculares.

Las placas autoradiográficas fueron escaneadas con un escáner de oficina (HP Officejet J5700) y las imágenes obtenidas fueron guardadas con formato Tiff de alta resolución. El análisis de estas imágenes se realizó mediante la normalización de los valores de densidad óptica integrada (DOI) para cada proteína en particular en relación a la proteína normalizadora (β -actina).

Los geles de agarosa fueron fotografiados con una cámara Olympus BH-2, (Olympus Co., Japan) y se realizó el análisis de las imágenes utilizando el programa Image-Pro Plus 3.0.1 (Media Cybernetics). Los niveles de ARNm se expresaron como una relación entre la DOI de las bandas de los diferentes mensajeros con su correspondiente GAPDH.

3.9. Evaluación Estadística:

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 11.0.1 para Windows. Se realizó un análisis con pruebas paramétricas utilizando el test de ANOVA para muchos grupos con el post-test de Duncan. El nivel de significancia utilizado fue del 95%. Los valores se expresaron como el promedio +/- el desvío estandar (DE).

4- RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de la inducción de la COD

Por ultrasonografía pudo observarse que los animales tratados con ACTH presentaron desarrollo folicular de un folículo dominante en uno de sus ovarios el cual no ovuló y permaneció por más de 10 días en el ovario, momento en el que se produjo la ovariectomía (Figura 6). La dinámica folicular de los animales controles permaneció normal observándose desarrollo de folículos antrales de distinto tamaño con la consiguiente ovulación del folículo dominante preovulatorio y formación del cuerpo lúteo. La totalidad de los animales tratados con ACTH desarrollaron quistes luego del tratamiento.



Figura 6. Ultrasonografía de un animal con un quiste folicular de 30mm en el ovario derecho.



Figura 7. Quiste folicular de más de 30 mm de diámetro obtenido luego de la castración. Q: quiste.

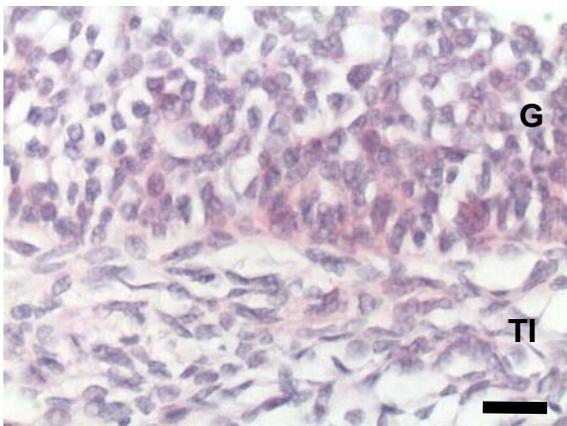


Figura 8. Detalle de la pared folicular de un quiste de tipo 1 de un animal con COD inducida. La barra equivale a 20 μ m. G: granulosa; TI: Teca interna

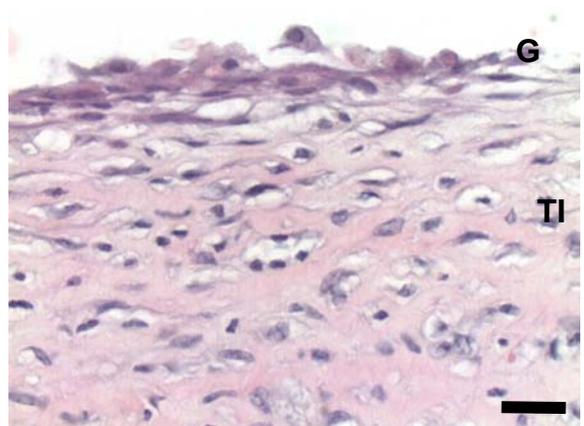


Figura 9. Detalle de la pared folicular de un quiste de tipo 2 de un animal con COD espontánea. La barra equivale a 20 μ m. G: granulosa; TI: Teca interna

Con la coloración de hematoxilina-eosina, pudo observarse que los ovarios de los animales controles exhibían folículos en varios estadios de desarrollo incluyendo folículos primarios, secundarios y terciarios; cuerpos lúteos en regresión y cuerpos blancos así como también folículos con diferente grado de atresia.

En los animales tratados con ACTH, los ovarios no presentaron cuerpo lúteo ni tejido luteal activo, se encontraron además folículos secundarios, terciarios y folículos atrésicos. Pudo observarse un folículo quístico con un diámetro mayor a 20 mm en uno de los ovarios en todos los casos (Figuras 7 y 8). Las capas presentaron células aparentemente sanas, sin procesos degenerativos. De los ovarios obtenidos en playa de faena se obtuvieron quistes foliculares con diferentes características (algunos con capa de granulosa ausente, otros con la teca luteinizada, e incluso se observaron quistes luteales y paraováricos). Solo se evaluaron aquellos quistes foliculares que presentaron todas las capas foliculares sin luteinización (Figura 9).

4.2. Niveles Hormonales

4.2.1. Niveles de hormonas séricas en animales con COD inducida con ACTH.

Los niveles de gonadotrofinas medidas en suero durante el período inducción de la enfermedad con ACTH y hasta 10 días después de la finalización del tratamiento se muestran en las figuras 10 y 11. Los niveles de LH se mostraron constantes a través del período de inducción y 10 días posteriores en los animales con ACTH, mostrando un aumento a partir del día 17 y hasta el día 21 luego de la ovulación en los animales controles mientras que los niveles de FSH no mostraron diferencias entre los grupos observándose en ambos grupos una elevación al inicio del tratamiento (días 15 y 16 del ciclo estral).

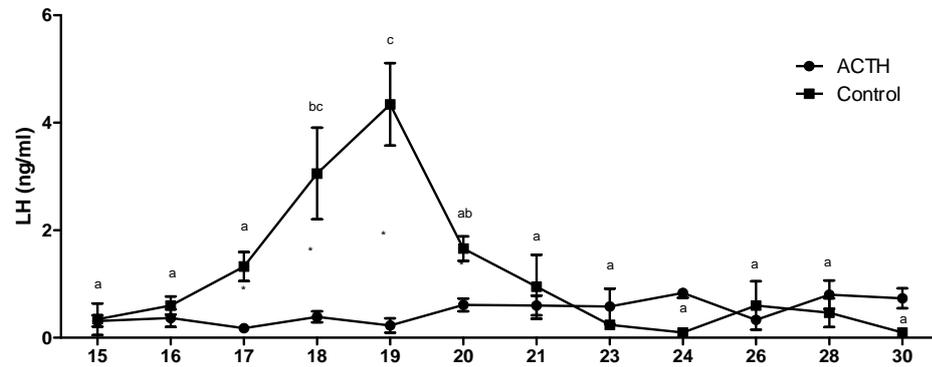


Figura 10. Niveles séricos de LH en animales tratados con ACTH (n=6) y controles sincronizados (n=4) desde el inicio del tratamiento con ACTH (día 15 del ciclo estral) hasta 10 días posteriores a la finalización del mismo (Promedio \pm DE).

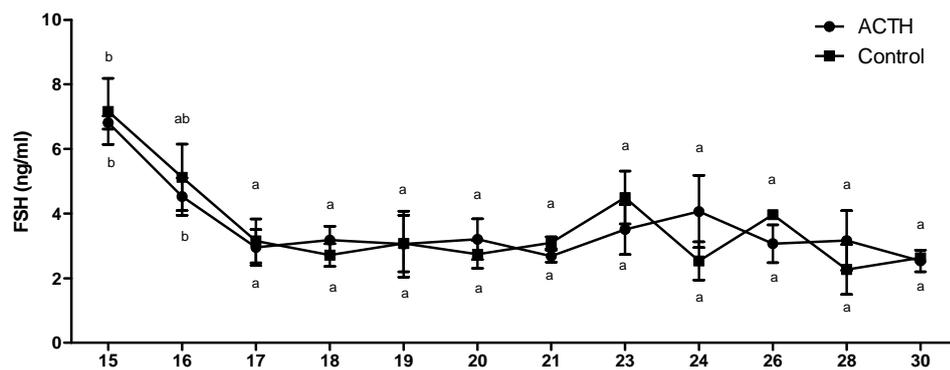


Figura 11. Niveles séricos de FSH en animales tratados con ACTH (n=6) y controles sincronizados (n=4) desde el inicio del tratamiento con ACTH (día 15 del ciclo estral) hasta 10 días posteriores a la finalización del mismo (Promedio \pm DE).

Los niveles de hormonas esteroides séricas durante el período de de inducción de la enfermedad con ACTH hasta 10 días posteriores se muestran en las figuras 12-14. El 17- β -estradiol presentó una elevación significativa en los animales con COD inducida en relación a los controles a partir del día 23 hasta la finalización del experimento (Figura 12). La progesterona presentó una elevación significativa en los animales controles en relación a los COD a partir del día 23 hasta la finalización del experimento (Figura 13). El cortisol se mantuvo elevado desde el inicio en los animales tratados con ACTH hasta el día 23, bajando luego a los mismos niveles de los animales controles (Figura 14).

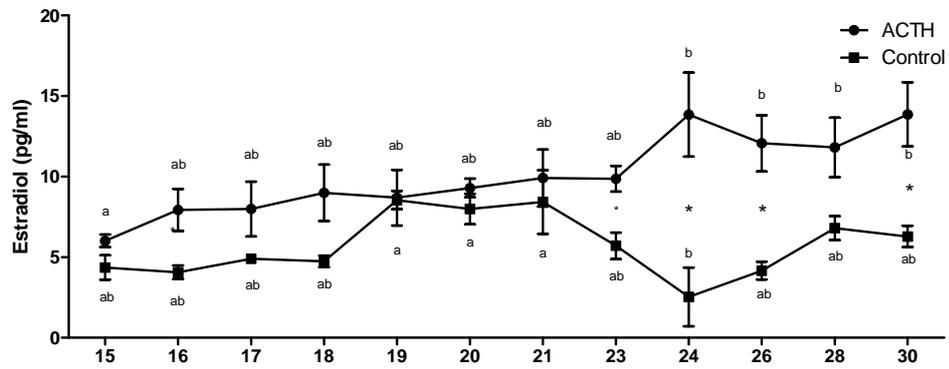


Figura 12. Niveles séricos de Estradiol 17-β en animales tratados con ACTH (n=6) y controles sincronizados (n=4) desde el inicio del tratamiento con ACTH (día 15 del ciclo estral) hasta 10 días posteriores a la finalización del mismo (Promedio ±DE). * muestran diferencias entre los dos grupos, letras diferentes muestran diferencias entre los días dentro de un grupo (p< 0,05)

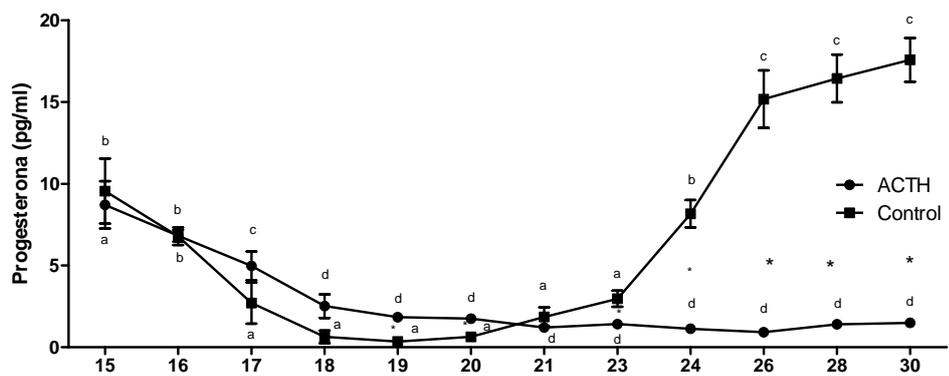


Figura 13. Niveles séricos de Progesterona en animales tratados con ACTH (n=6) y controles sincronizados (n=4) desde el inicio del tratamiento con ACTH (día 15 del ciclo estral) hasta 10 días posteriores a la finalización del mismo (Promedio ±DE). * muestran diferencias entre los dos grupos, letras diferentes muestran diferencias entre los días dentro de un grupo (p< 0,05).

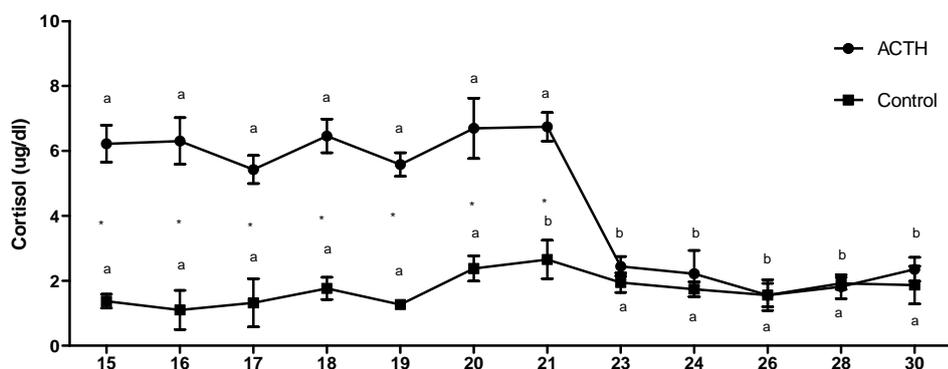


Figura 14. Niveles séricos de Cortisol en animales tratados con ACTH (n=6) y controles sincronizados (n=4) desde el inicio del tratamiento con ACTH (día 15 del ciclo estral) hasta 10 días posteriores a la finalización del mismo (Promedio ±DE).* muestran diferencias entre los dos grupos, letras diferentes muestran diferencias entre los días dentro de un grupo (p< 0,05)

4.2.2. Niveles de hormonas en líquido folicular.

Los niveles de hormonas esteroideas sexuales (estrógenos y progesterona) en líquido folicular de los quistes obtenidos del modelo experimental así como de los folículos quísticos espontáneos se muestran en las figuras 15 a 17. Puede observarse que los niveles de estrógenos no muestran diferencias entre los folículos terciarios grandes y los folículos quísticos tanto espontáneos como inducidos.

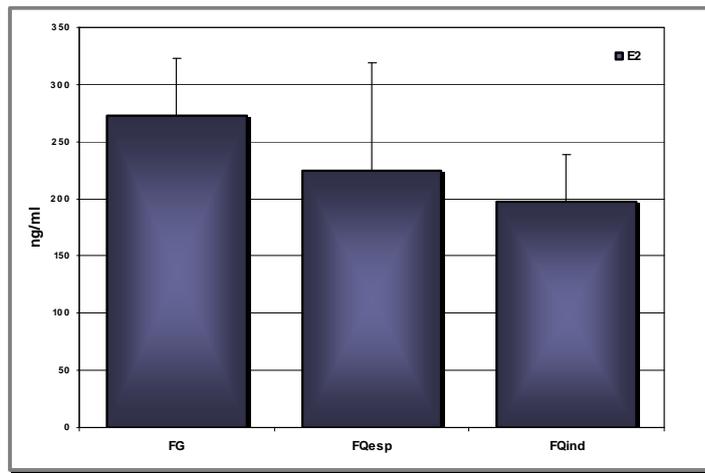


Figura 15. Niveles de 17- β -estradiol (E2) en líquido folicular de Folículos Antrales Grandes (FG, $n=10$): Quísticos inducidos (Qind, $n=6$) y espontáneos (esp, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

Los niveles de progesterona fueron menores en los folículos quísticos en relación a los controles (Figura 16). La relación entre ambas hormonas no mostró diferencias entre los diferentes folículos.

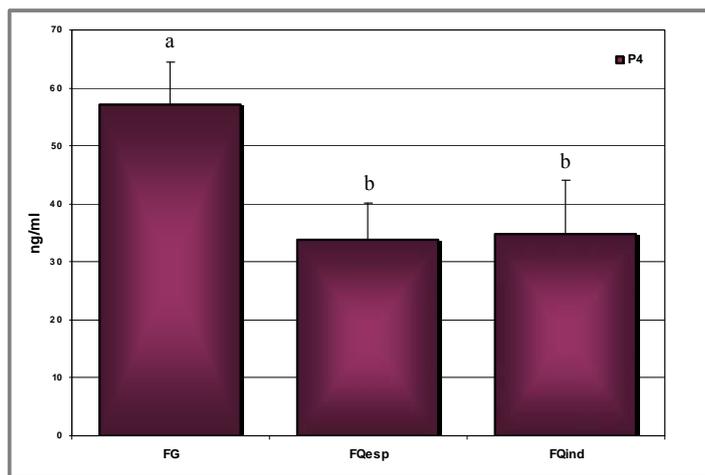


Figura 16. Niveles de Progesterona (P4) en líquido folicular de Folículos Antrales Grandes (FG, $n=10$): Quísticos inducidos (Qind, $n=6$) y espontáneos (esp, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

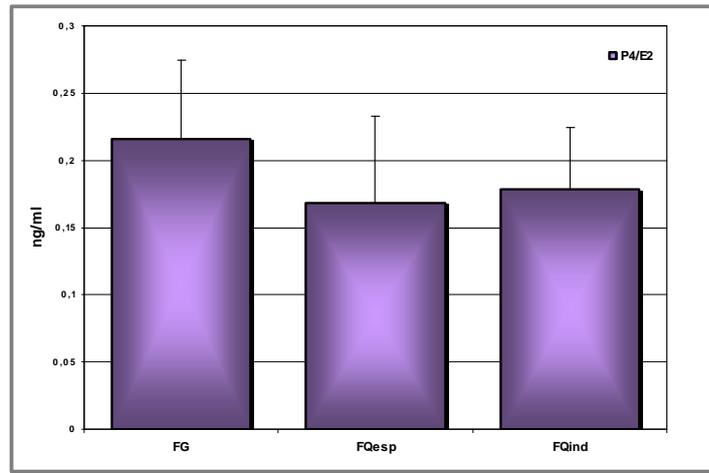


Figura 17. Relación entre los niveles de Progesterona (P4)/17-β-estradiol (E2) en líquido folicular de Folículos Antrales Grandes (FG, $n=10$): Quísticos inducidos (Qind, $n=6$) y espontáneos (esp, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

4.3. Evaluación de la proliferación celular

4.3.1. Expresión de Ki-67 por inmunohistoquímica.

Con el anticuerpo contra ki-67 se marcaron solo núcleos celulares en el ovario. Se observaron células marcadas con ki-67 en todas las capas foliculares en las categorías estudiadas aunque el mayor porcentaje de proliferación estuvo en las células de la granulosa. La mayor expresión para esta proteína estuvo en las células de la granulosa de los folículos terciarios de los ovarios control (Figuras 18 y 21).

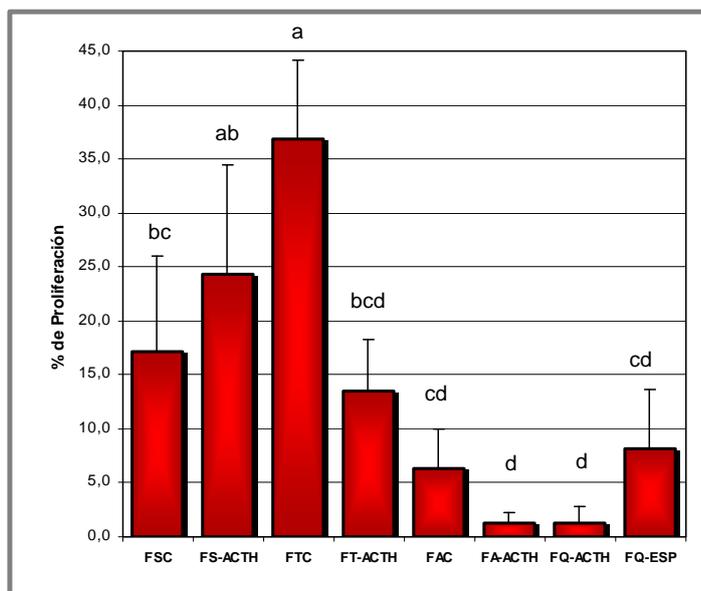


Figura 18. Porcentaje de proliferación para Ki-67 en la granulosa de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$) y quistes espontáneos (ESP, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

Los folículos atrésicos de los animales con COD así como los folículos quísticos (tanto los inducidos como los obtenidos en frigorífico) presentaron los menores niveles de expresión para todas las capas foliculares (Figuras 18-22, 24). En la teca externa los folículos terciarios controles presentaron los niveles mas altos de proliferación con respecto a todas las otras categorías en ambos grupos (Figuras 20 y 21).

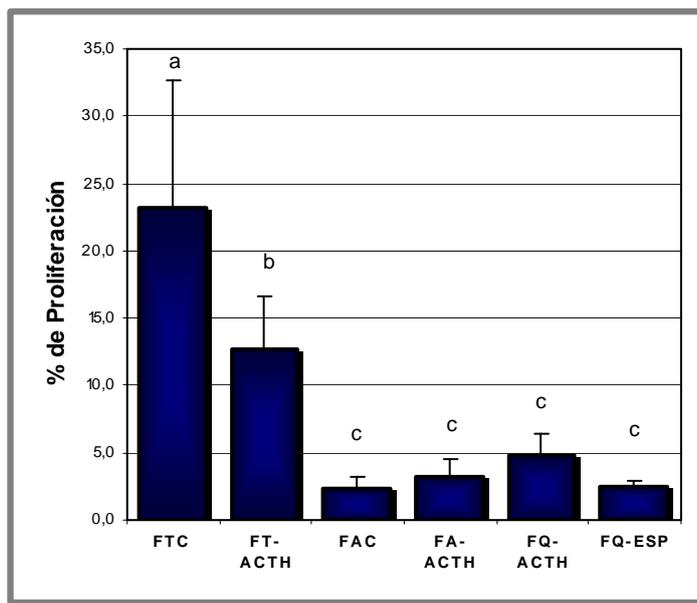


Figura 19. Porcentaje de proliferación para Ki-67 en la teca interna de varios tipos foliculares (F: Folículos, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control (C, n=4) y Tratados con ACTH (ACTH, n=6) y quistes espontáneos (ESP, n=15). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio ± DE; p<0,05).

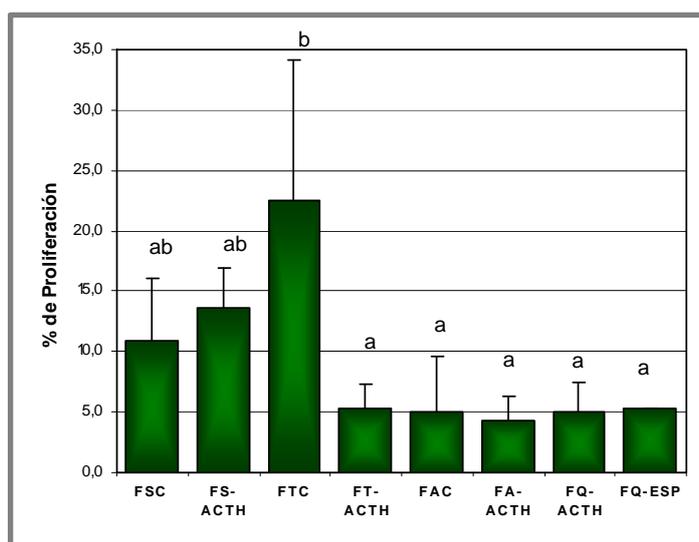


Figura 20. Porcentaje de proliferación para Ki-67 en la teca externa de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control (C, n=4) y Tratados con ACTH (ACTH, n=6) y quistes espontáneos (ESP, n=15). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio ± DE; p<0,05).

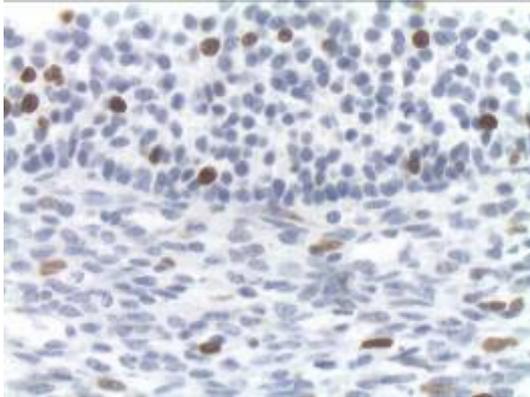


Figura 21. Pared en un folículo terciario de un animal del grupo control inmunomarcado para ki-67. X40.

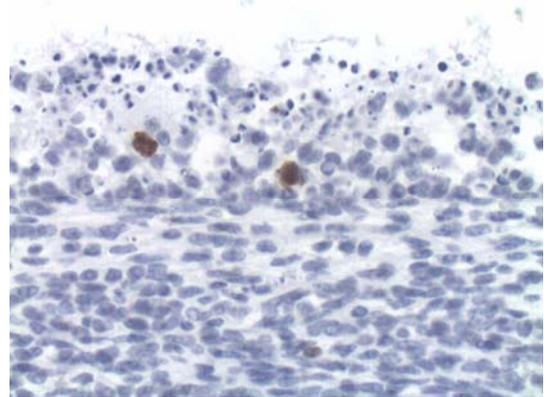


Figura 22. Pared en un folículo atrésico de un animal del grupo control inmunomarcado para ki-67. X40.

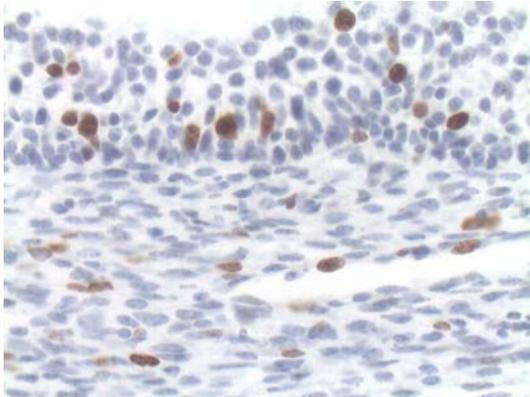


Figura 23. Pared en un folículo terciario de un animal tratado con ACTH inmunomarcado para ki-67. X40

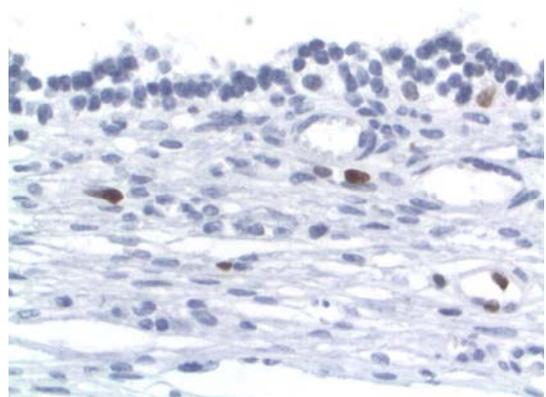


Figura 24. Pared en un folículo quístico de un animal con COD inducida inmunomarcado para ki-67. X40.

4.3.2. Expresión de ARNm de ciclinas.

Mediante RT-PCR para evaluar la expresión del ARNm para las ciclinas D1 y E en folículos terciarios (antrales) grandes y pequeños del grupo control y folículos quísticos pudo comprobarse una elevación en la expresión de mensajero para la ciclina D1 en los folículos terciarios pequeños y grandes en relación a los folículos quísticos (Figura 25). Para ciclina E, en cambio solo pudo observarse una elevación de los niveles relativos en los folículos pequeños manteniéndose iguales para los folículos grandes y quísticos (Figura 26).

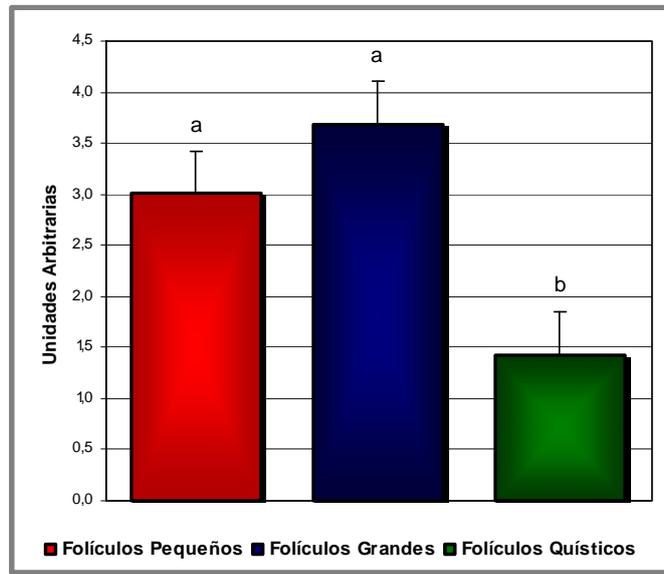


Figura 25. Expresión relativa de ARNm para ciclina D1 en relación al normalizador. (Promedio \pm DE; Letras iguales indican que no hay diferencias significativas). Folículos pequeños, $n=10$; Folículos grandes, $n=10$; Folículos quísticos de Frigorífico, $n=15$.

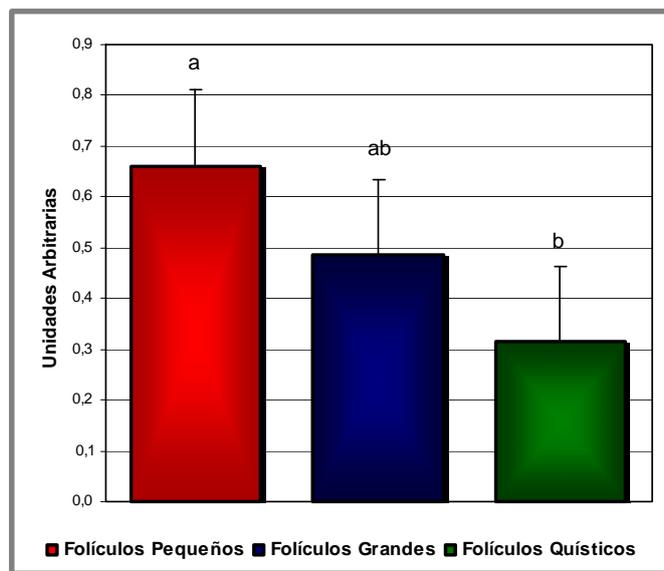


Figura 26. Expresión relativa de ARNm para ciclina E en relación al normalizador. (Promedio \pm DE; Letras iguales indican que no hay diferencias significativas). Folículos pequeños, $n=10$; Folículos grandes, $n=10$; Folículos quísticos de Frigorífico, $n=15$.

4.4. Evaluación de la apoptosis celular

4.4.1. Proteínas relacionadas con la apoptosis detectadas por inmunohistoquímica

4.4.1.1. Bax

Con el anticuerpo dirigido contra la proteína Bax se marcaron las células de la granulosa, de la teca interna y de la teca externa en todas las categorías de folículos estudiadas, sin embargo la mayor expresión se observó en la capa de células de la granulosa y de las tecas de los folículos atresicos de ambos grupos (Figura 27-29). Los

folículos terciarios de ambos grupos y quísticos tanto de los animales con COD inducida como de los provenientes de matadero mostraron una marcación similar a los folículos secundarios y terciarios del grupo control en las células de la granulosa (Figuras 27, 30 y 32). Los folículos atrésicos del grupo control mostraron una marcación más elevada que los del grupo con COD. En la teca interna se encontró una elevada marcación para bax en los folículos atrésicos de ambos grupos en relación a todas las otras categorías estudiadas. En la teca externa se observó mayor área inmunomarcada en los folículos atrésicos del grupo control (Figura 29).

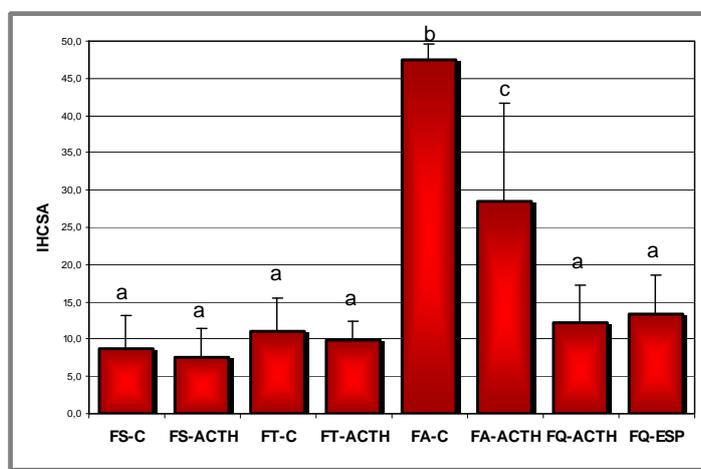


Figura 27. IHCSA para la proteína proapoptótica Bax en la granulosa de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$) y quistes espontáneos (ESP, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

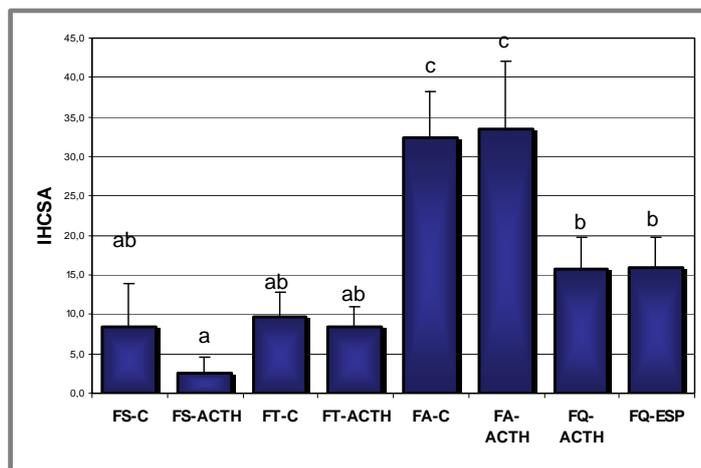


Figura 28. IHCSA para la proteína proapoptótica Bax en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$) y quistes espontáneos (ESP, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

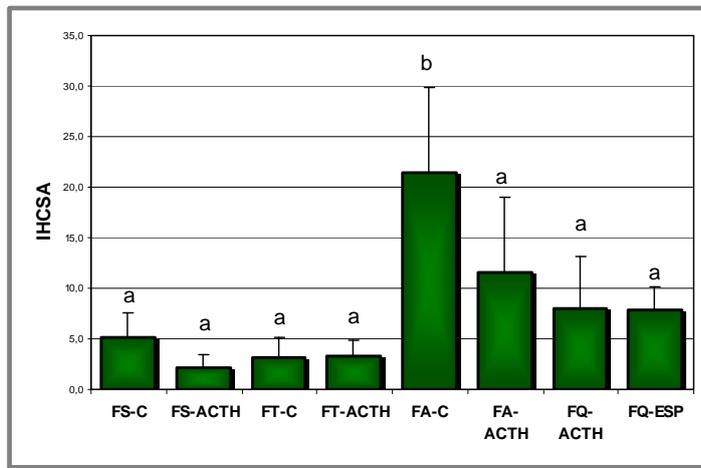


Figura 29. IHCSA para la proteína proapoptótica Bax en la teca externa de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$) y quistes espontáneos (ESP, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p < 0,05$).

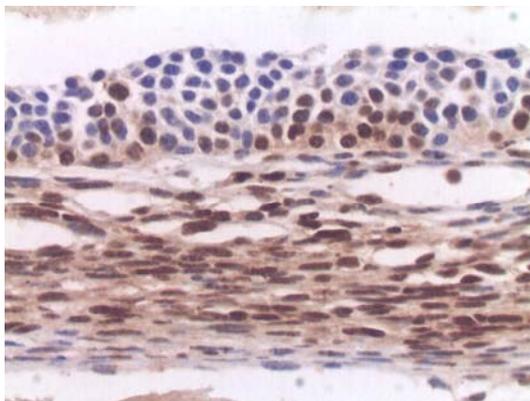


Figura 30. Pared en un folículo terciario de un animal del grupo control inmunomarcado para bax. X40.

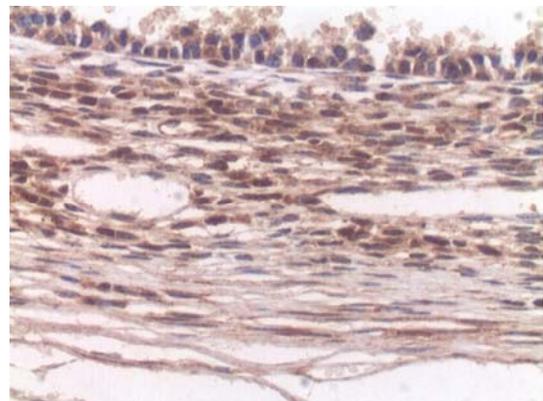


Figura 31. Pared en un folículo atrésico de un animal del grupo control inmunomarcado para bax. X40.

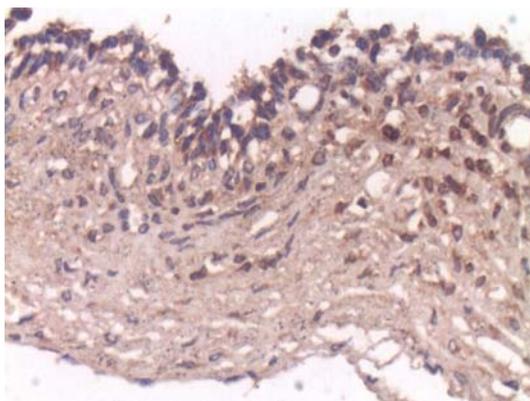


Figura 32. Pared en un folículo quístico de un animal tratado con ACTH inmunomarcado para bax. X40

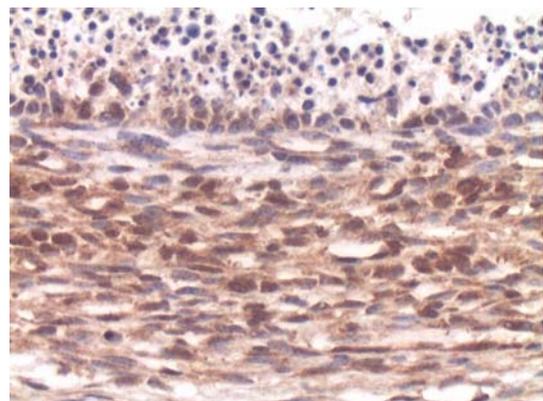


Figura 33. Pared en un folículo atrésico de un animal con quistes ováricos inducidos mediante ACTH inmunomarcado para bax. X40.

4.4.1.2. Bcl-2

Todas las células presentaron marcación para Bcl-2 en las tres capas. Las células de la granulosa de los folículos terciarios y quísticos en ambos grupos presentaron una

elevada marcación con Bcl-2 con respecto a los folículos atrésicos del grupo control, sin embargo no hubo diferencias entre los folículos atrésicos de los animales tratados con los folículos secundarios de los dos grupos (Figuras 34, 37-40).

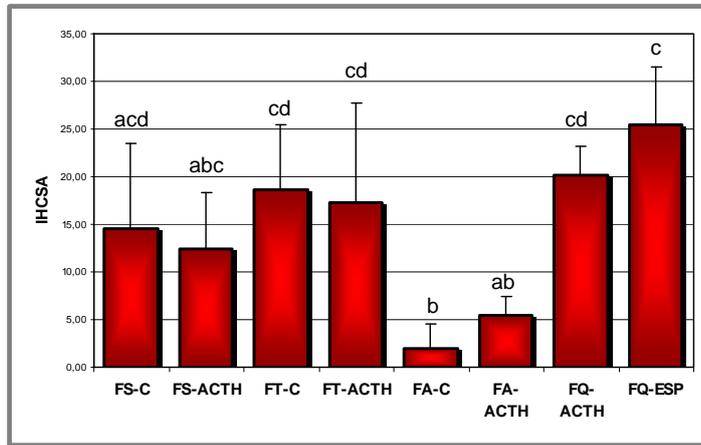


Figura 34. IHCSA para la proteína proapoptótica Bcl-2 en la granulosa de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$) y quistes espontáneos (ESP, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

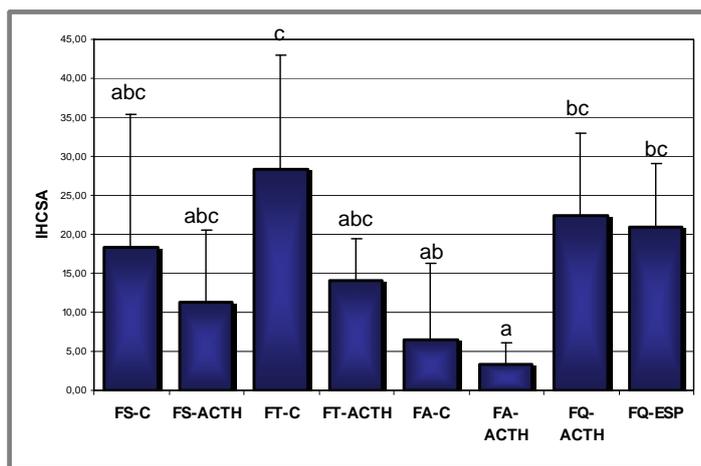


Figura 35. IHCSA para la proteína proapoptótica Bcl-2 en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$) y quistes espontáneos (ESP, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

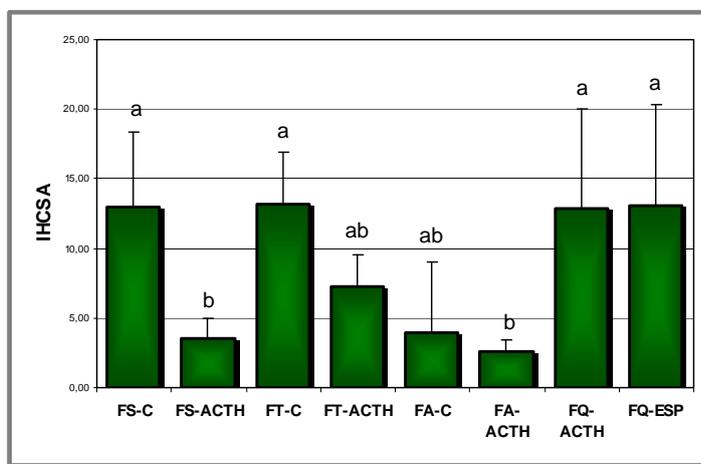


Figura 36. IHCSA para la proteína proapoptótica Bcl-2 en la teca externa de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$) y quistes espontáneos (ESP, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

Con respecto a la teca interna, la menor expresión para Bcl-2 estuvo en los folículos atrésicos de ambos grupos (Figuras 35 y 38). En la teca externa, se encontró una baja expresión en los todos los folículos de los animales tratados excepto en los quistes, tanto espontáneos como de los animales inducidos (Figuras 36-40).

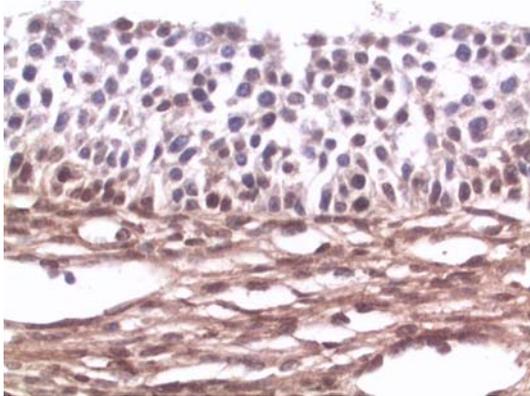


Figura 37. Pared en un folículo terciario de un animal normal inmunomarcado para bcl-2. x 40.

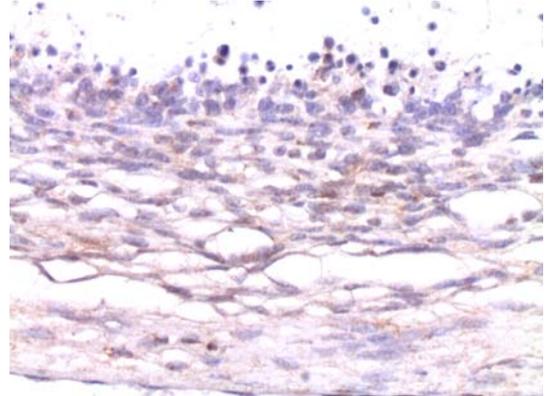


Figura 38. Pared en un folículo atrésico de un animal control inmunomarcado para bcl-2. x 40.

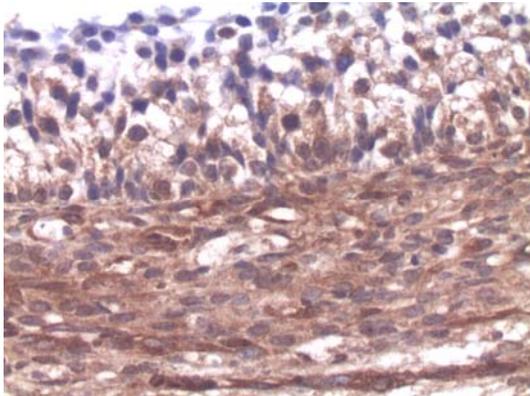


Figura 39. Pared en un folículo quístico de un animal con COD inducida inmunomarcado para bcl-2. x40.

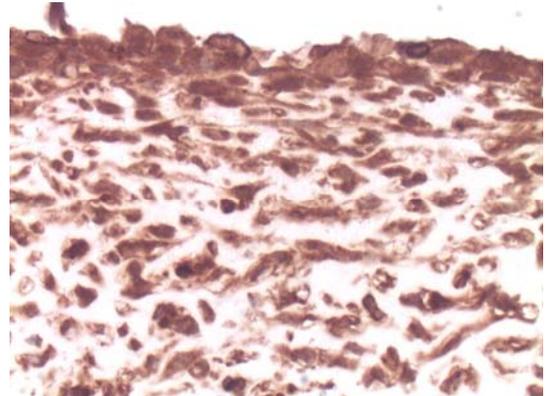


Figura 40. Pared en un folículo quístico de un animal con COD espontánea inmunomarcado para bcl-2. x 40.

4.4.1.3. Caspasa-3

Se observó marcación para caspasa-3 tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células (Figura 44). En las células de la granulosa, la marcación más intensa se encontró en las células de los folículos atrésicos en ambos grupos aunque fue significativamente mayor en los del grupo con COD, siendo la menor expresión la encontrada en los folículos secundarios, terciarios y quísticos de ambos grupos (Figuras 41, 43-46). En la teca interna, se observó una mayor expresión en los folículos atrésicos

en ambos grupos (Figuras 42, 43-46). La marcación en la teca externa fue escasa haciendo imposible su cuantificación.

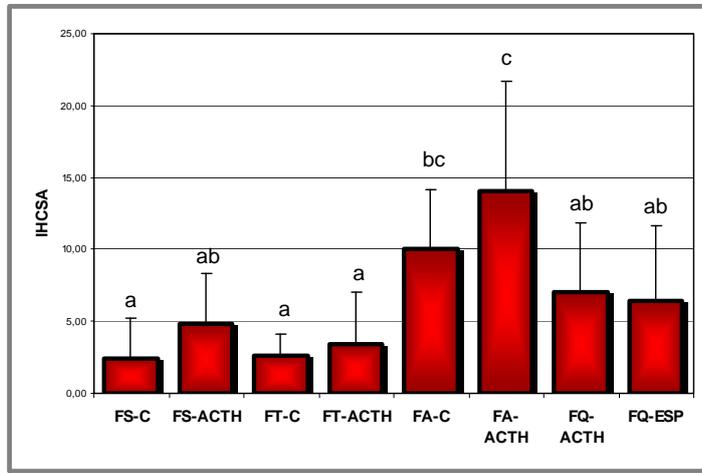


Figura 41. IHCSA con Caspasa-3 en la granulosa de varios tipos foliculares (FS: Foliculos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$) y quistes espontáneos (ESP, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

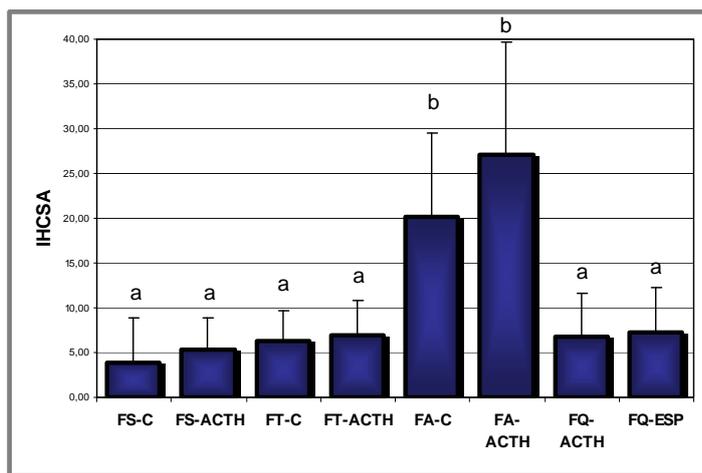


Figura 42. IHCSA con Caspasa-3 en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Foliculos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$) y quistes espontáneos (ESP, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

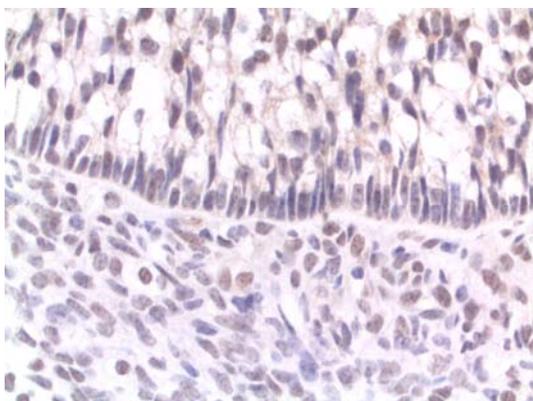


Figura 43. Pared en un folículo terciario de un animal control inmunomarcado para caspasa-3. X40.

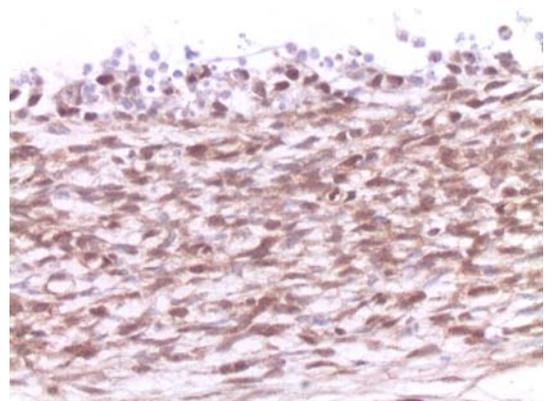


Figura 44. Pared en un folículo atrésico de un animal control inmunomarcado para caspasa-3. X40.

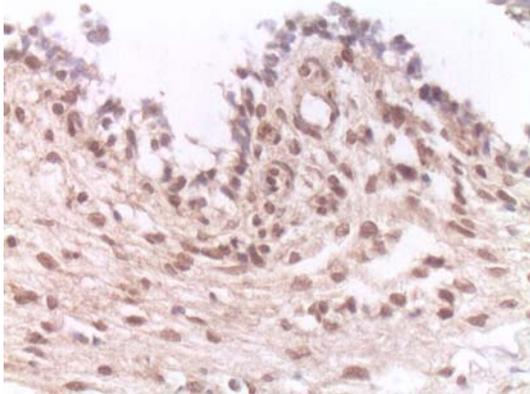


Figura 45. Pared en un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para caspasa-3. X40.

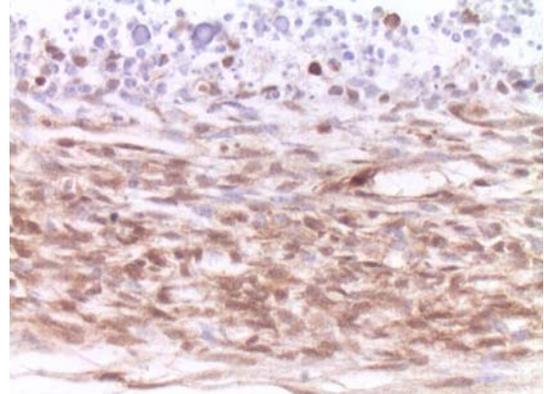


Figura 46. Pared en un folículo atrésico de un animal con COD inmunomarcado para caspasa-3. X40.

4.4.2. Determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados para detectar proteínas relacionadas con apoptosis mediante WB.

Mediante inmunoblot se corroboró que los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica detectaran la proteína de manera específica y sin reacciones cruzadas (Figura 47). Puede observarse en la figura que las proteínas de la familia Bcl-2 se expresan de manera específica con los anticuerpos usados. Para caspasa-3, si bien las especificaciones del fabricante indican que solo identifica la caspasa-3 activa, en el inmunoblot puede identificarse una banda correspondiente a la caspasa-3 clivada (20 kDa) y una banda correspondiente a la Proenzima (32 kDa).

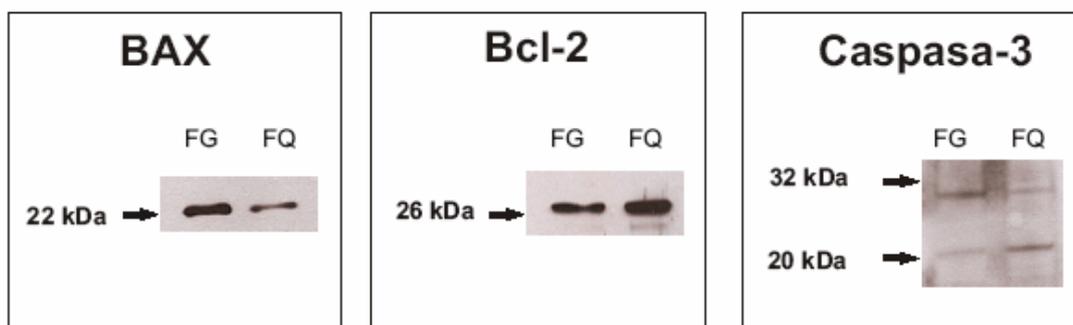


Figura 47. Inmunoblot para identificar la especificidad de anticuerpos para Bax, Bcl-2 y caspasa-3. FG: Folículo Grande; FQ: Folículo Quístico.

4.4.3. Expresión de ARNm de Bax, Bcl-2 y relación entre ambos.

Mediante RT-PCR para evaluar la expresión del ARNm para Bcl-2 y Bax pudo comprobarse una elevada expresión de mensajero para Bcl-2 en los folículos quísticos

en relación a los folículos antrales pequeños y grandes (Figura 48). No hubo diferencias en la expresión de Bax entre las distintas categorías foliculares pero la relación entre Bcl-2 y Bax fue elevada para los folículos quísticos (Figuras 49 y 50).

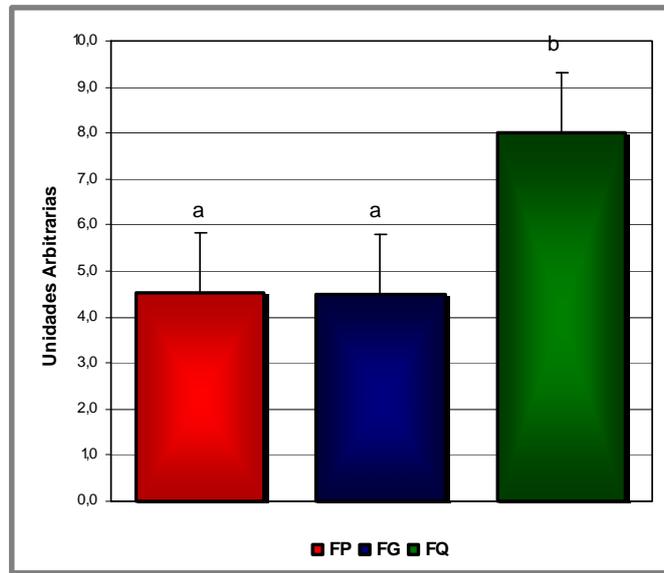


Figura 48. Expresión relativa de ARNm para Bcl-2 en relación al normalizador: GAPDH. (FP: folículos pequeños, FG: Folículos grandes, FQ: Folículos quísticos de frigorífico). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p < 0,05$).

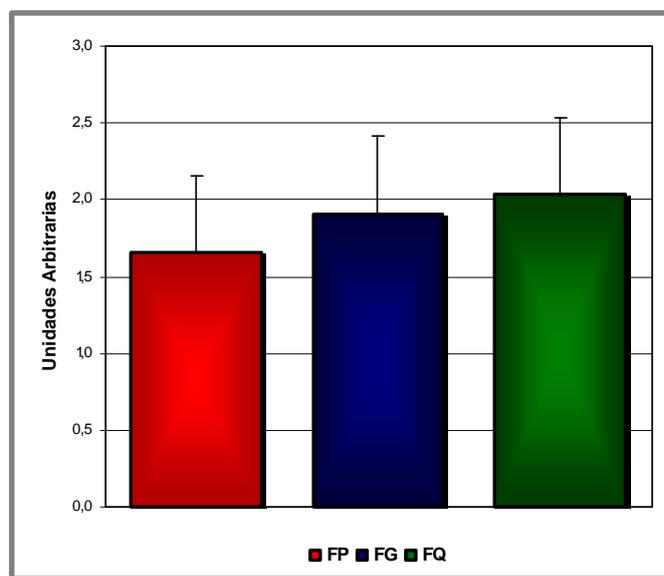


Figura 49. Expresión relativa de ARNm para Bax en relación al normalizador GAPDH. (FP: folículos pequeños, FG: Folículos grandes, FQ: Folículos quísticos). (promedio \pm DE; $p < 0,05$).

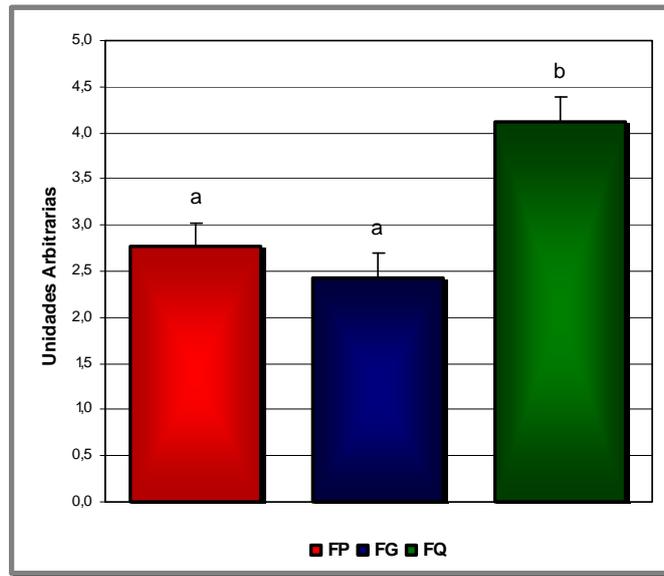


Figura 50. Relación entre ARNm de Bcl-2/Bax. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (FP: folículos pequeños, FG: Folículos grandes, FQ: Folículos quísticos; $p < 0,05$).

4.4.4. Detección de la apoptosis *in situ* (TUNEL).

Se detectaron células apoptóticas en la capa de células de la granulosa y en ambas tecas (Figuras 51-54). Cabe señalar que solo se encontraron niveles detectables en las células de los folículos atrésicos en los animales tratados y con quistes (espontáneos o inducidos) por lo cual no fue posible realizar el análisis estadístico entre las distintas categorías foliculares.

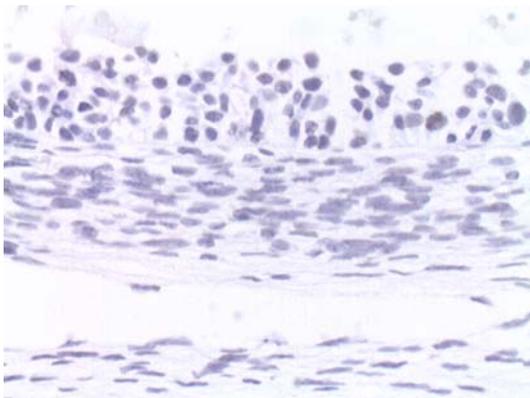


Figura 51. Detección *in situ* de apoptosis en la pared en un folículo terciario de un animal control. X40.

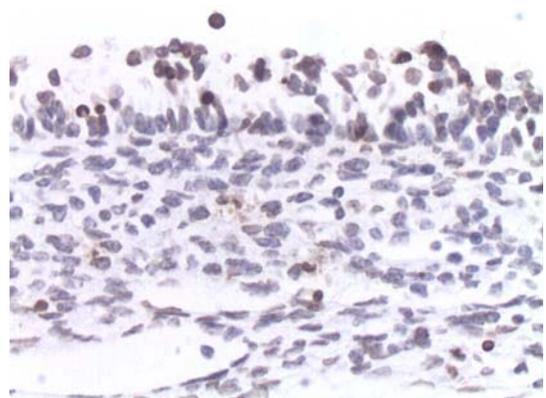


Figura 52. Detección *in situ* de apoptosis en la pared en un folículo atrésico de un animal control. X40.

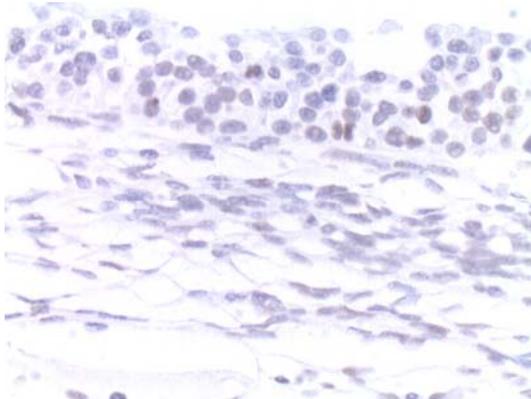


Figura 53. Detección *in situ* de apoptosis en la pared en un folículo terciario de un animal con COD. X40.

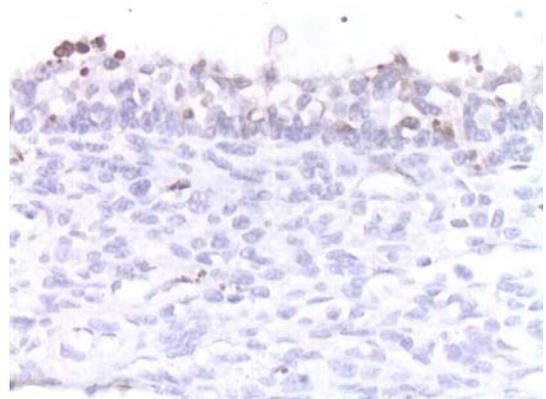


Figura 54. Detección *in situ* de apoptosis en la pared en un folículo atrésico de un animal con COD. X40.

4.5. Expresión de receptores hormonales.

Se evaluaron separadamente ovarios con folículos normales y con COD tanto en animales provenientes de matadero como en el modelo experimental.

4.5.1. Receptores de estrógenos α

4.5.1.1. Inmunohistoquímica.

En los animales provenientes del modelo experimental este subtipo de RE se expresó en las células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías de folículos, en el estroma ovárico, en el epitelio de cubierta del ovario y en las células luteales. Hubo marcación citoplasmática tenue en las células marcadas. Los folículos terciarios de ambos grupos presentaron una marcación elevada en las células de la granulosa similar a lo presentado en los folículos quísticos inducidos (Figuras 55, 59, 61, 62). Los folículos atrésicos y secundarios del grupo control presentaron los niveles más bajos de inmuomarcación en esta capa folicular (Figura 60). Los folículos quísticos presentaron mayor marcación que los folículos secundarios y atrésicos de ambos grupos. Las células de la teca interna presentaron una marcación intensa con diferencias significativas entre los folículos quísticos y atrésicos de los animales con COD (Figuras 56 y 62).

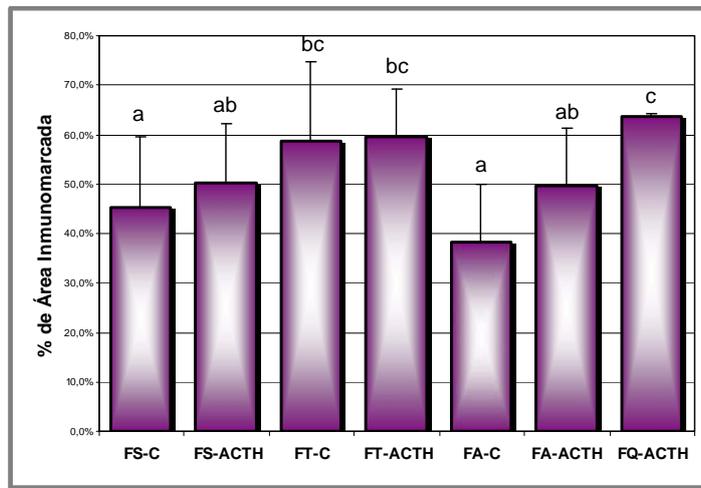


Figura 55. Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE α en la granulosa de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control de animales sincronizados (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

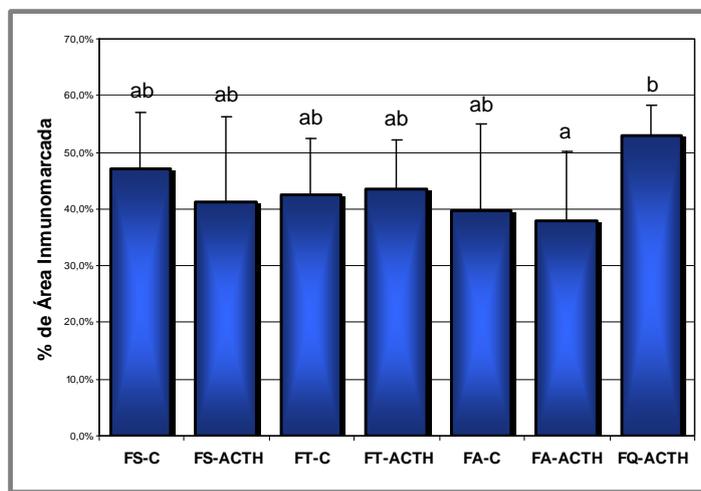


Figura 56. Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE α en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control de animales sincronizados (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

Por otra parte, en los ovarios provenientes de frigorífico pudo observarse un aumento considerable en la expresión de RE α en las dos capas foliculares en los folículos quísticos con respecto a las categorías estudiadas de folículos sanos y atrésicos obtenidos en frigorífico (Figuras 57-58, 63-64).

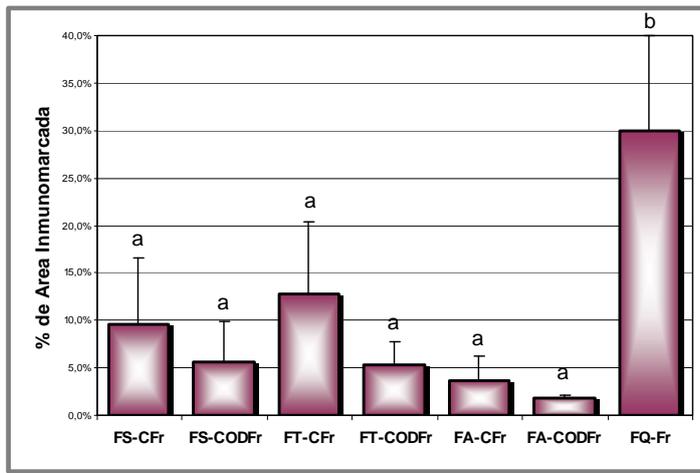


Figura 57. Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE α en la granulosa de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) obtenidos en frigorífico de los grupos control (CFr, $n=10$) y con COD espontánea (CODFr, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE, $p<0,05$).

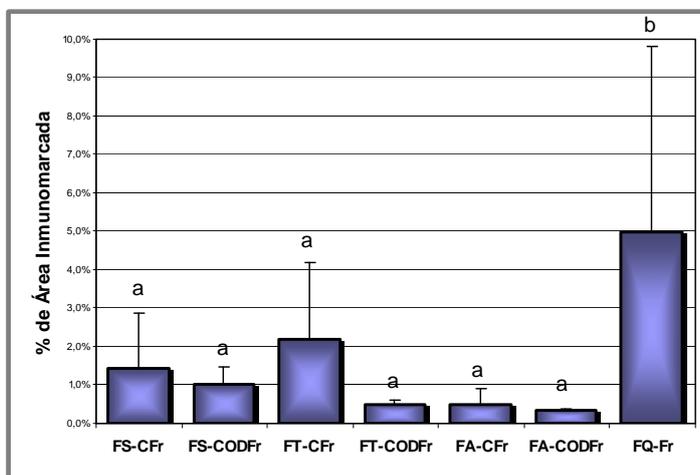


Figura 58. Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE α en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) obtenidos en frigorífico de los grupos control (CFr, $n=10$) y con COD espontánea (CODFr, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE, $p<0,05$).

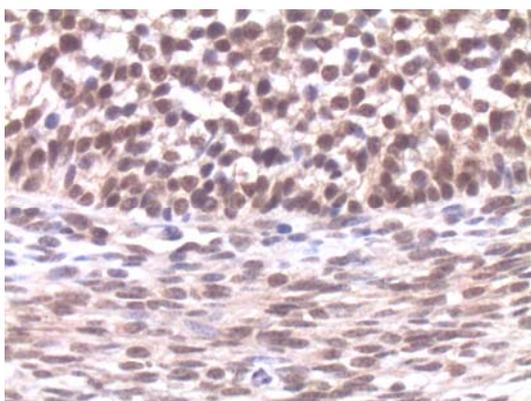


Figura 59. Folículo terciario de un animal control sincronizado inmunomarcado para RE α . X40.

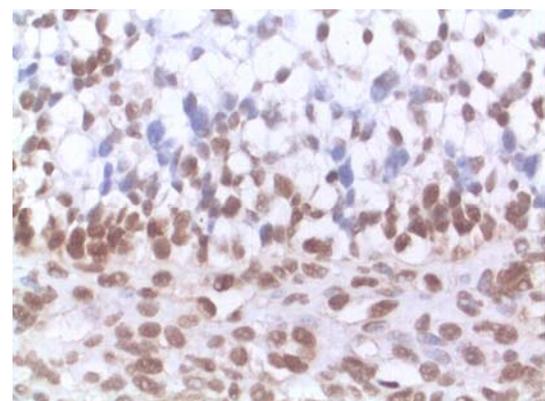


Figura 60. Folículo atrésico de un animal control sincronizado inmunomarcado para RE α . X40.

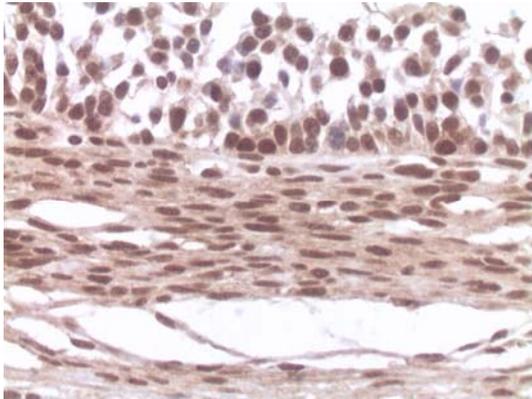


Figura 61. Pared de un folículo terciario de un animal con COD inducida inmunomarcada para RE α . X40.

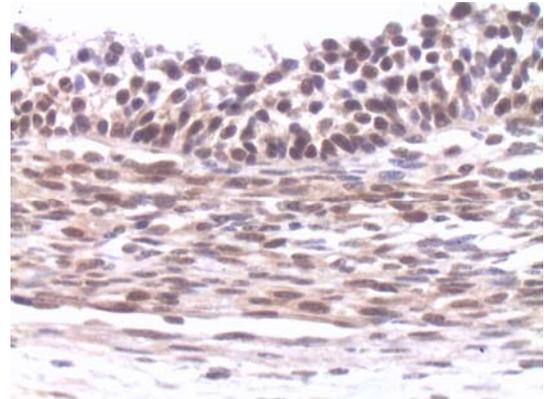


Figura 62. Pared de un folículo quístico de un animal con COD inducida marcada para RE α . X40.

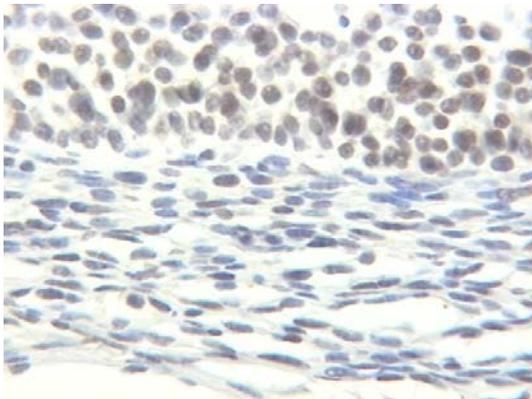


Figura 63. Pared de un folículo terciario de un animal normal (muestras obtenidas en matadero) inmunomarcada para RE α . X40.

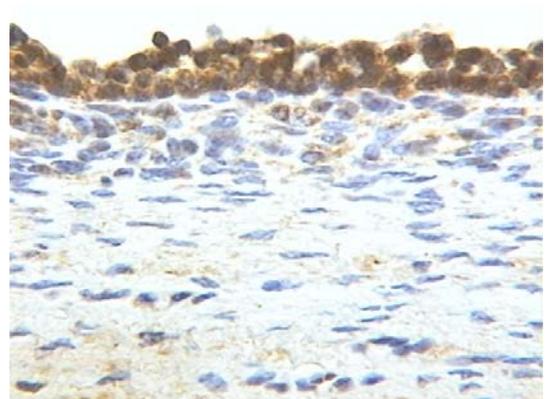


Figura 64. Pared de un folículo quístico de un animal con COD espontánea marcada para RE α . X 40.

4.5.1.2. Western blot

Se evaluaron folículos antrales pequeños y grandes (de frigorífico y sincronizados) en comparación con folículos quísticos provenientes de frigorífico e inducidos. La inmunomarcación de las membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo 1D5 y el revelado de las autoradiografías dió como resultado la identificación de una banda nítida a nivel de las proteínas de 66 kDa de peso. Se realizó la normalización de los valores con β -actina y la comparación entre las categorías dió como resultado solo diferencias significativas entre los folículos quísticos inducidos y los folículos grandes de animales sincronizados (Figuras 65 y 66). No se hallaron diferencias entre los folículos quísticos provenientes de frigorífico con las categorías de folículos terciarios pequeños y grandes obtenidos de frigorífico ni sincronizados (Figuras 65 y 66).

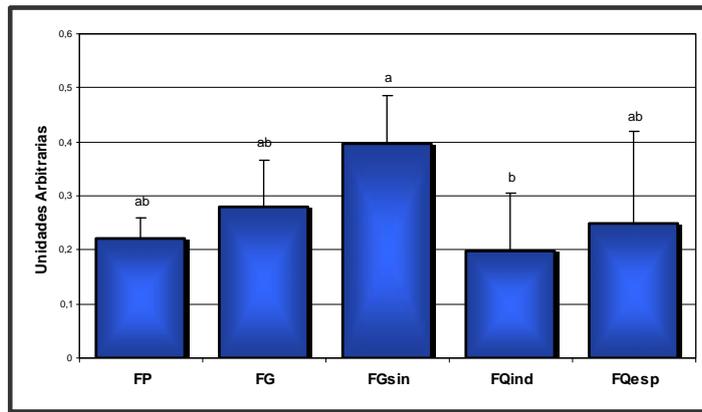


Figura 65. Densidad Óptica Integrada para RE α en relación a β -actina en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Folículos Antrales Pequeños, G: Grandes, sin: animales sincronizados, Q: Quísticos; ind: con quistes inducidos; esp: con quistes espontáneos). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE, $p < 0,05$).

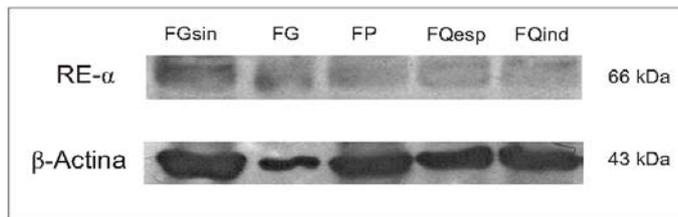


Figura 66. Autorradiografía representativa de un Western Bot que muestra la expresión del Receptor de Estrógenos α en la pared completa de varios tipos foliculares (FP: folículos antrales pequeños, G: grandes, sin: animales sincronizados, Q: quísticos; ind: con quistes inducidos con ACTH; esp: con quistes espontáneos obtenidos en Frigorífico).

4.5.2. Receptores de estrógenos β .

4.5.2.1. Inmunohistoquímica

El RE β fue detectado en los núcleos de las células de la granulosa, teca interna y teca externa de todos los folículos estudiados. Se observó una mayor intensidad en la marcación en las células de la granulosa de los folículos terciarios del grupo control (animales sincronizados) en relación a los folículos secundarios, terciarios y atresicos del grupo tratado con ACTH, sin embargo los quistes foliculares inducidos mostraron una inmunomarcación similar a la de los folículos terciarios controles (Figura 67, 71 y 72). No hubo diferencias en los folículos secundarios de ambos grupos. La menor tinción se encontró en los folículos atresicos del grupo tratado con ACTH. Se observó el mismo patrón en la teca interna (Figuras 68, 71 y 72).

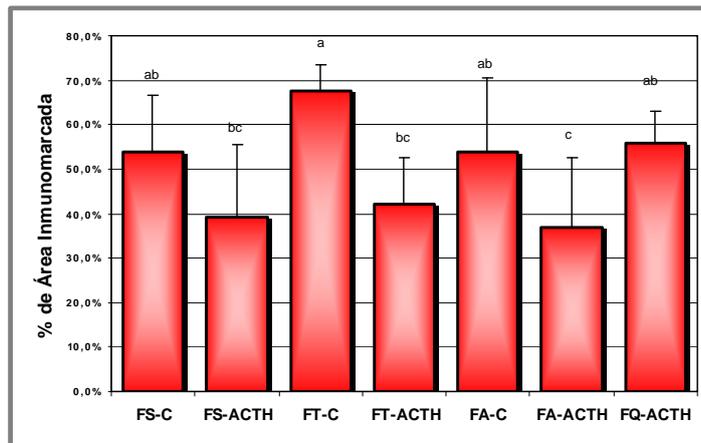


Figura 67. Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE β en la granulosa de varios tipos foliculares (FS: Foliculos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control de animales sincronizados (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

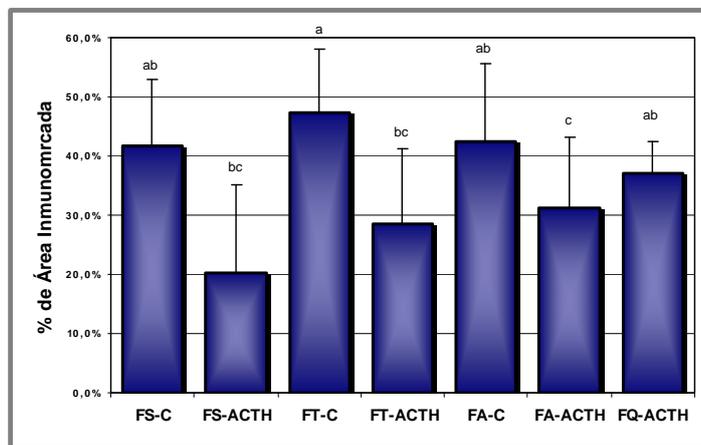


Figura 68. Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE β en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Foliculos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control de animales sincronizados (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p<0,05$).

En las muestras obtenidas de frigorífico, la intensidad fue mayor en las células de la granulosa de los folículos terciarios que en los secundarios y atrésicos del grupo control. En los animales con COD espontánea, la inmunoexpresión de RE β en la granulosa fue inferior en todas las categorías de folículos en crecimiento y en los atrésicos, así como también en los folículos quísticos en relación a los folículos terciarios del grupo control (Figuras 69, 73 y 74). Las células de la teca interna presentaron menor inmunomarcación que las de la granulosa, sin embargo mantuvieron una mayor expresión de esta proteína las células tecaes de los folículos terciarios del grupo control en relación a todas las categorías foliculares estudiadas (Figuras 70, 73 y 74).

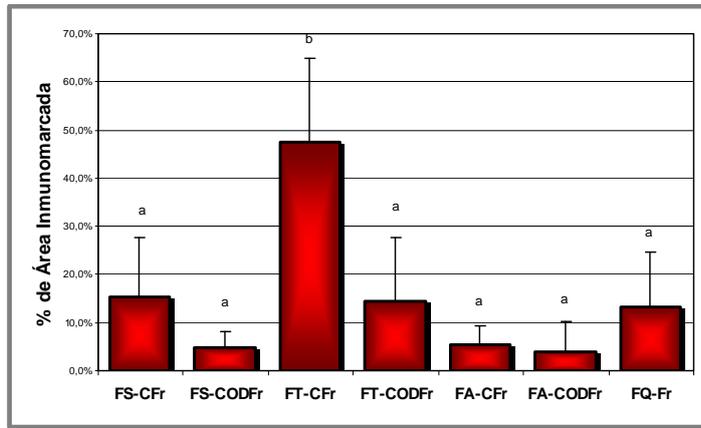


Figura 69. Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE β en la granulosa de varios tipos foliculares (FS: Foliculos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) obtenidos en frigorífico de los grupos control (CFr, $n=10$) y con COD espontánea (CODFr, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE, $p<0,05$).

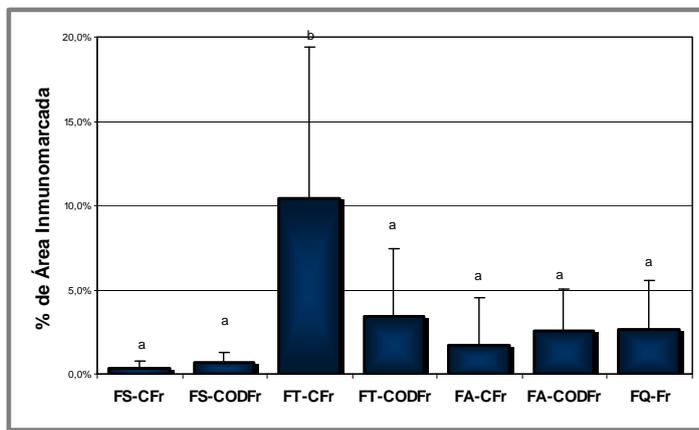


Figura 70. Porcentaje de Área Inmunomarcada para RE β en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Foliculos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) obtenidos en frigorífico de los grupos control (CFr, $n=10$) y con COD espontánea (CODFr, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE, $p<0,05$).

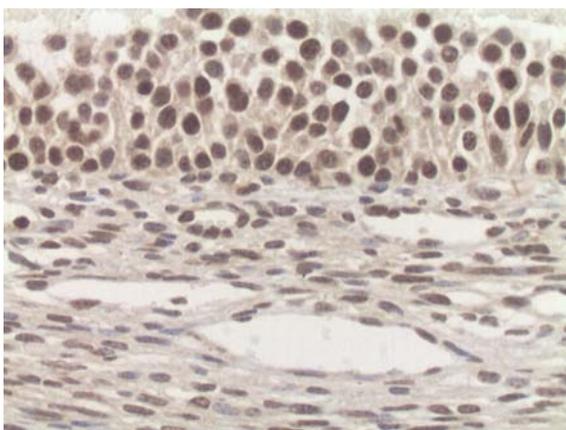


Figura 71. Pared de un folículo terciario de un animal control sincronizado marcado para RE β. X40.

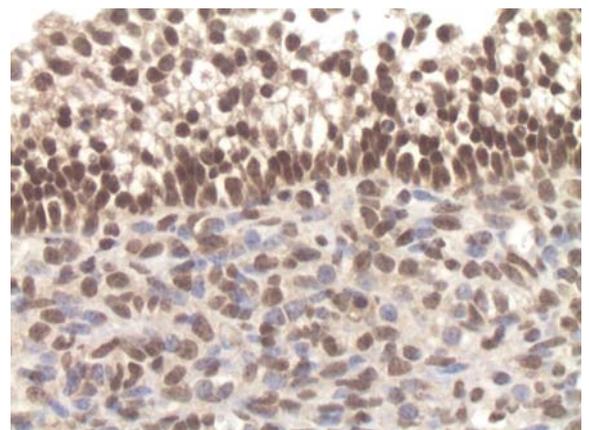


Figura 72. Folículo quístico de un animal con COD inducida mediante ACTH marcado para RE β. X40.

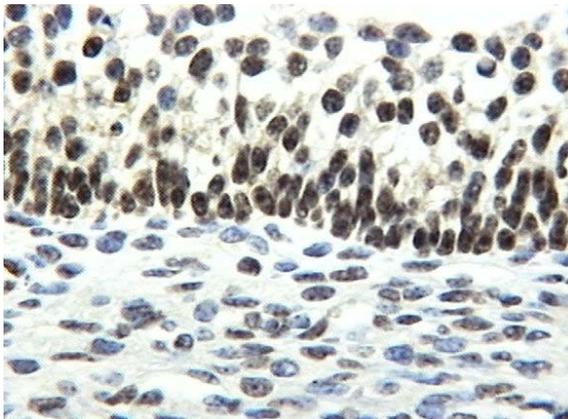


Figura 73. Folículo terciario de un animal control proveniente de frigorífico marcado para RE β . X40.

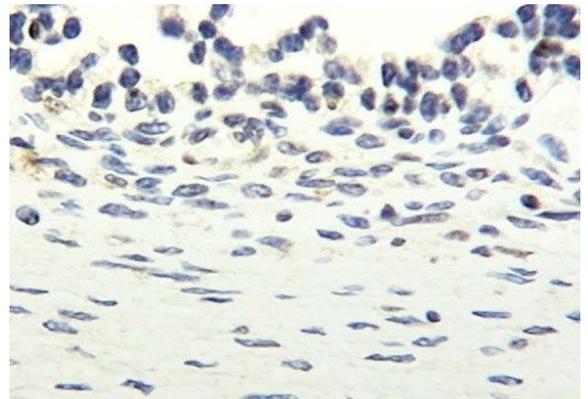


Figura 74. Folículo terciario de un animal con COD espontánea marcado para RE β . X40.

4.5.2.2. Western blot

La inmunomarcación de las membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo anti-RE β mostró una banda a nivel de 56 kDa. Hubo una mayor expresión en los folículos terciarios antrales grandes de animales con su ciclo estral sincronizado con respecto a todas las otras categorías foliculares estudiadas (Figuras 75 y 76).

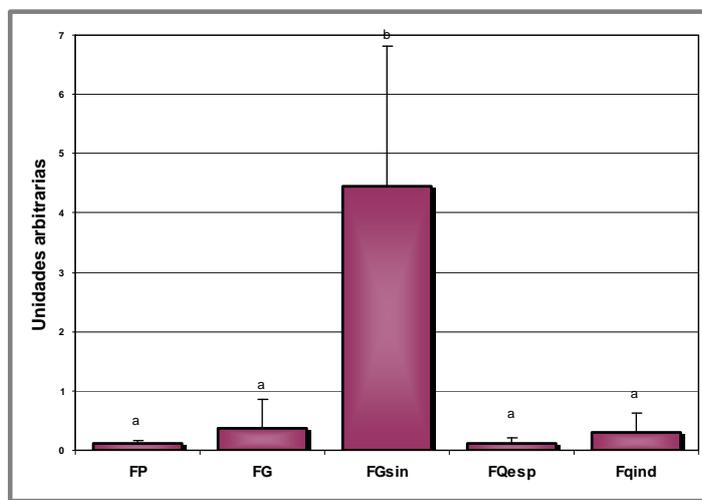


Figura 75. Densidad Óptica Integrada para RE β en relación a β -actina en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Folículos antrales pequeños, G: grandes, sin: animales sincronizados, Q: quísticos; ind: con quistes inducidos; esp: con quistes espontáneos). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE, $p < 0,05$).

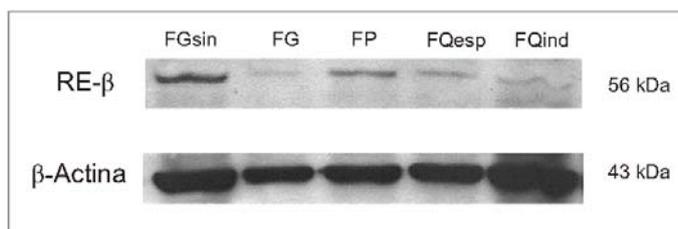


Figura 76. Autoradiografía representativa de un Western Bot que muestra la expresión del Receptor de Estrógenos β en la pared completa de varios tipos foliculares (FP: folículos antrales pequeños, G: grandes, sin: animales sincronizados, Q: quísticos; ind: con quistes inducidos; esp: con quistes espontáneos).

4.5.3. Receptores de progesterona.

4.5.3.1. Inmunohistoquímica

La expresión del RP fue detectada tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células de la granulosa y de las tecas de todos los folículos que integran el ovario. También se marcaron las células del estroma, luteales, y de la cubierta ovárica.

Se observó una elevada expresión del RP en las células de la granulosa de los folículos terciarios del grupo control, sin diferencias con las otras categorías en el mismo grupo o en el grupo COD, solamente se observó menor inmunomarcación en los folículos quísticos inducidos (Figuras 77, 81 y 82). No hubo diferencias entre los grupos ni categorías en las células de la teca interna (Figuras 78, 81 y 89).

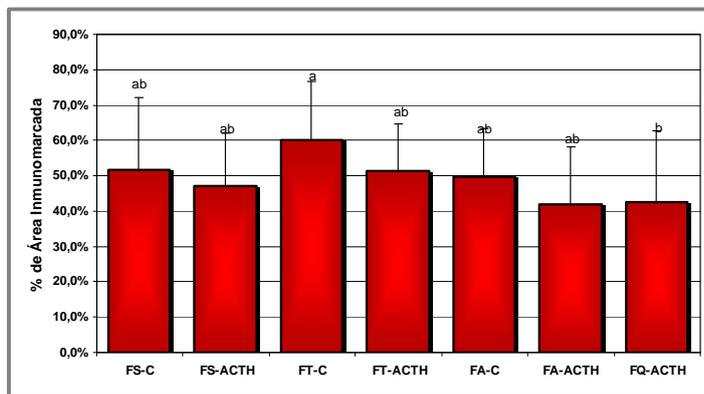


Figura 77. Porcentaje de Área Inmunomarcada para RP en la granulosa de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control de animales sincronizados (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p < 0,05$).

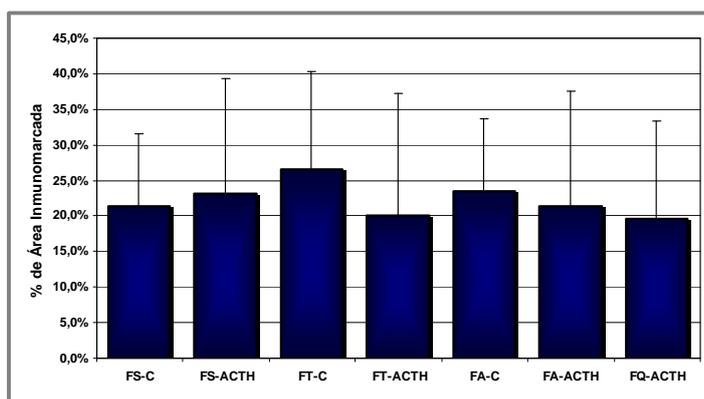


Figura 78. Porcentaje de Área Inmunomarcada para RP en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) de los grupos control de animales sincronizados (C, $n=4$) y Tratados con ACTH (ACTH, $n=6$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE; $p < 0,05$).

La marcación fue homogénea en las células de la granulosa en todas las categorías de folículos del grupo control en las muestras de frigorífico, encontrándose una mayor expresión en los folículos terciarios con respecto a los secundarios y atrésicos de ambos grupos (Figuras 79, 83 y 84). Los folículos quísticos mostraron un nivel de expresión similar a la de los folículos terciarios controles, sin diferencias con

las otras categorías foliculares (Figuras 79, 83 y 84). La teca interna mostró una baja inmunomarcación sin diferencias entre los diferentes tipos de folículos (Figura 80).

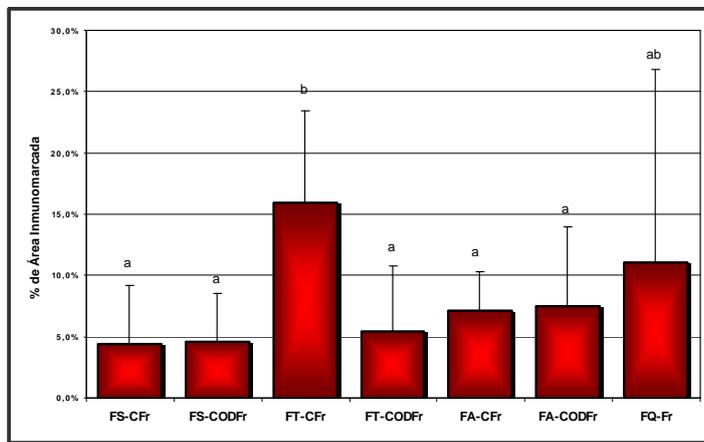


Figura 79. Porcentaje de Área Inmunomarcada para RP en la granulosa de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) obtenidos en frigorífico de los grupos control (CFr, $n=10$) y con COD espontánea (CODFr, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE, $p<0,05$).

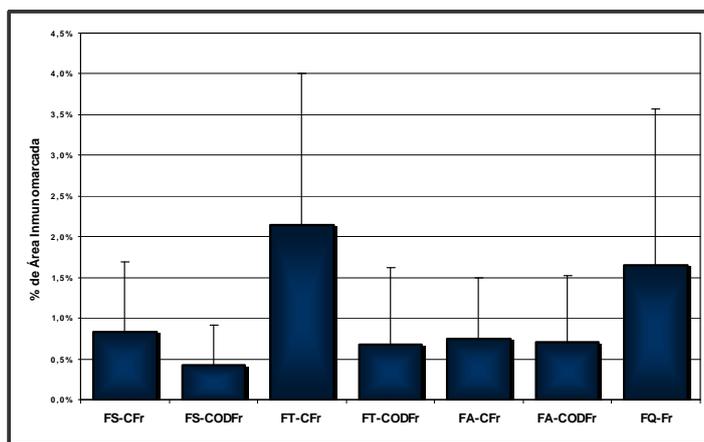


Figura 80. Porcentaje de Área Inmunomarcada para RP en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos, Q: Quísticos) obtenidos en frigorífico de los grupos control (CFr, $n=10$) y con COD espontánea (CODFr, $n=15$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (promedio \pm DE, $p<0,05$).

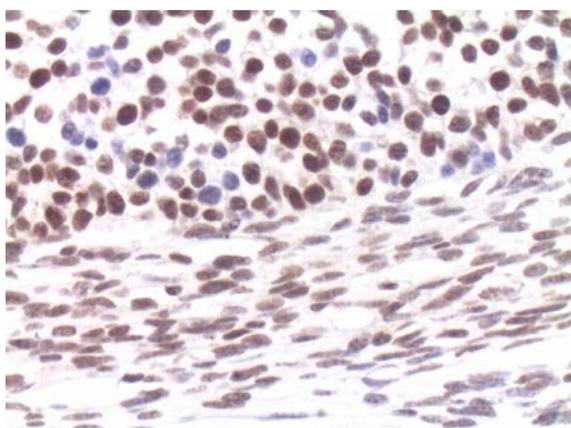


Figura 81. Pared de un folículo terciario de un animal control sincronizado marcado para RP. X 40.

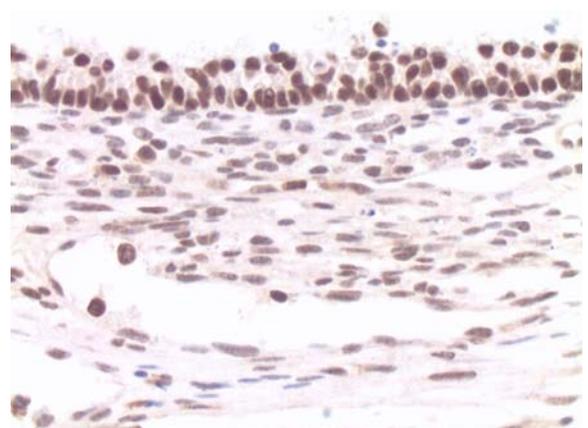


Figura 82. Pared de un folículo quístico de un animal con COD inducida marcado para RP. X 40.

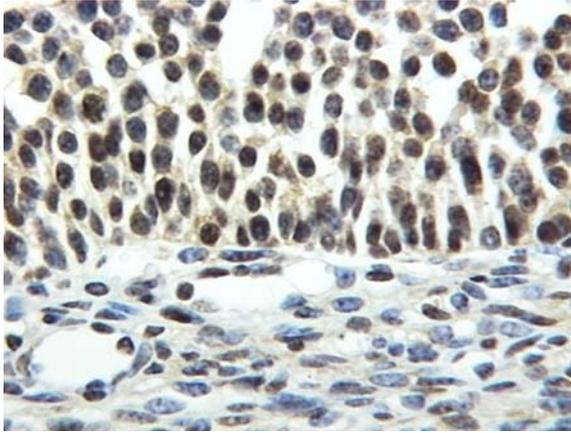


Figura 83. Pared de un folículo terciario de un animal control (frigorífico) marcado para RP. X 40

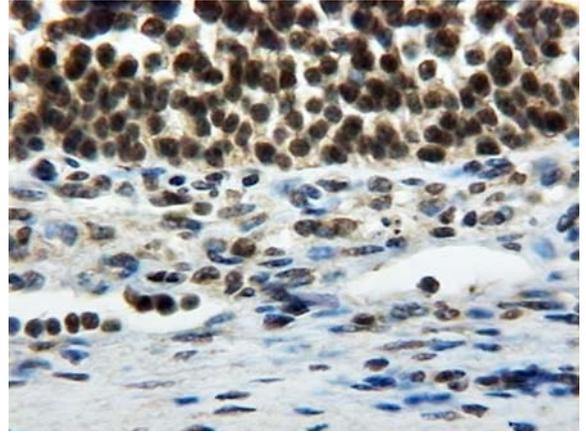


Figura 84. Pared de un folículo quístico de un animal con COD espontánea marcado para RP. X 40.

4.5.3.2. Western blot

En el inmunoblot pudieron observarse las bandas correspondientes a las isoformas B (~110 kDa), A1 (~90 kDa), A2 (~74 kDa) y C (~60 kDa). La mayor expresión se observó en la isoforma C (Figuras 85 y 89). No hubo diferencias en la expresión de las distintas isoformas en las distintas categorías de folículos terciarios y quísticos excepto para la isoforma A2 en donde pudo observarse un incremento en los folículos terciarios (antrales) grandes provenientes de animales sincronizados (Figuras 85-90). Sin embargo hubo una pronunciada tendencia ($p < 0.06$) a la disminución en la expresión de la isoforma B en los folículos quísticos espontáneos (Figura 88).

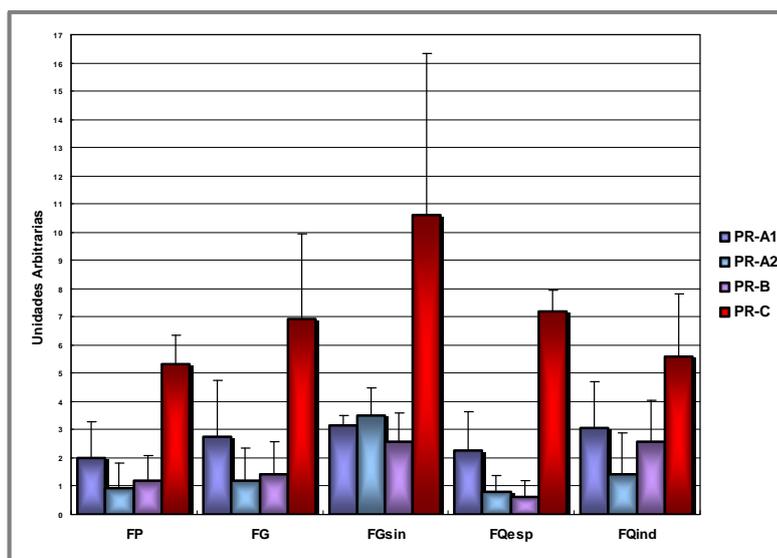


Figura 85. Densidad Óptica Integrada para todas las isoformas de RP en relación a β -actina en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Folículos Antrales Pequeños, G: Grandes, sin: animales sincronizados, Q: Quísticos; ind: con quistes inducidos; esp: con quistes espontáneos).

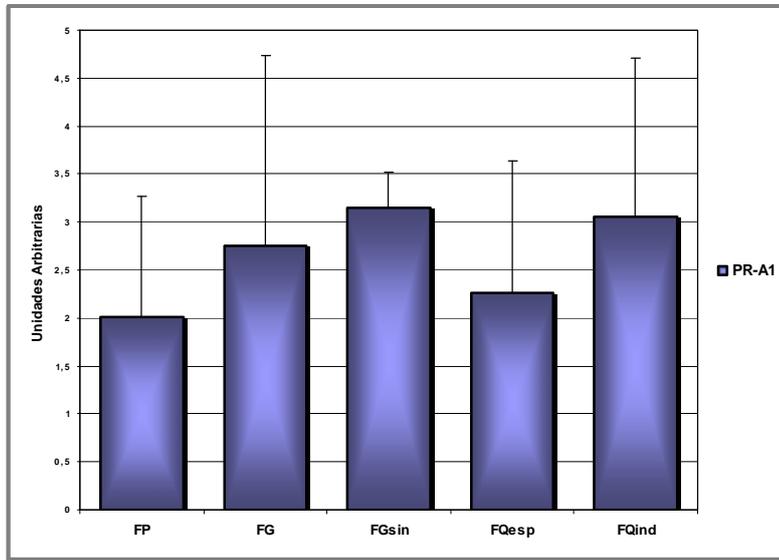


Figura 86. Densidad Óptica Integrada para la isoforma A1 de RP en relación a β -actina en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Folículos Antrales Pequeños, G: Grandes, sin: animales sincronizados, Q: Quísticos; ind: con quistes inducidos; esp: con quistes espontaneos).

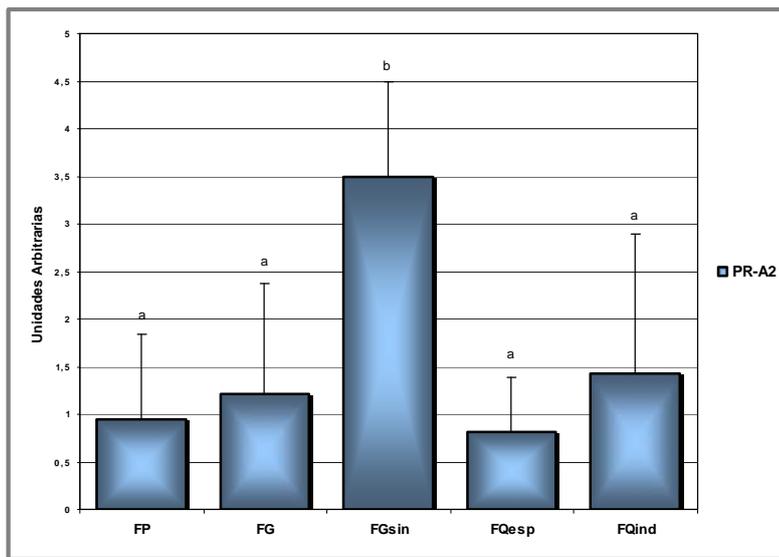


Figura 87. Densidad Óptica Integrada para la isoforma A2 de RP en relación a β -actina en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Folículos Antrales Pequeños, G: Grandes, sin: animales sincronizados, Q: Quísticos; ind: con quistes inducidos; esp: con quistes espontaneos). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$).

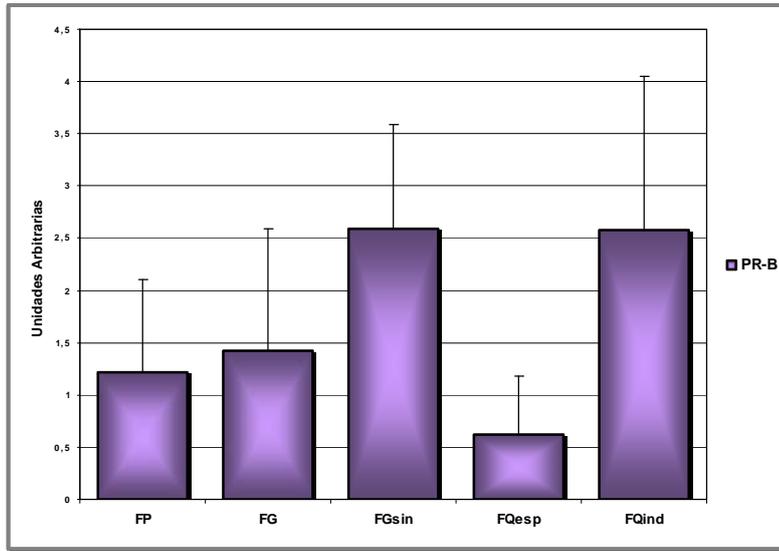


Figura 88. Densidad Óptica Integrada para la isoforma B de RP en relación a β -actina en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Folículos Antrales Pequeños, G: Grandes, sin: animales sincronizados, Q: Quísticos; ind: con quistes inducidos; esp: con quistes espontáneos).

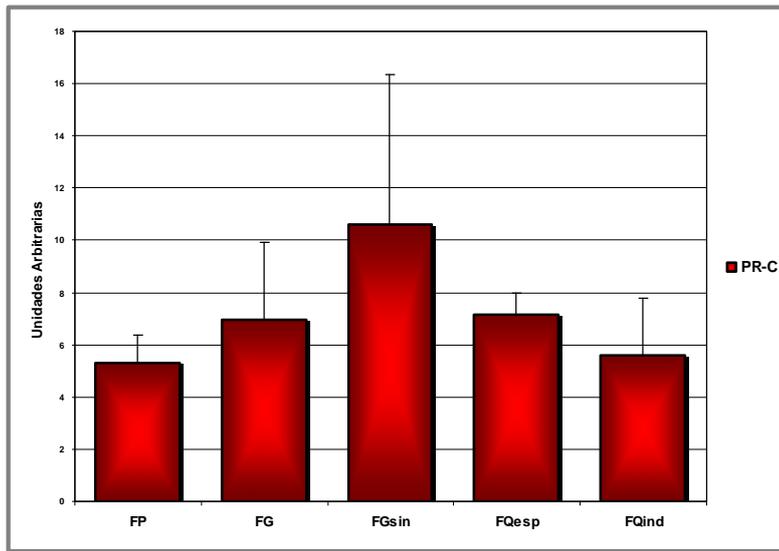


Figura 89. Densidad Óptica Integrada para la isoforma C de RP en relación a β -actina en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Folículos Antrales Pequeños, G: Grandes, sin: animales sincronizados, Q: Quísticos; ind: con quistes inducidos; esp: con quistes espontáneos).

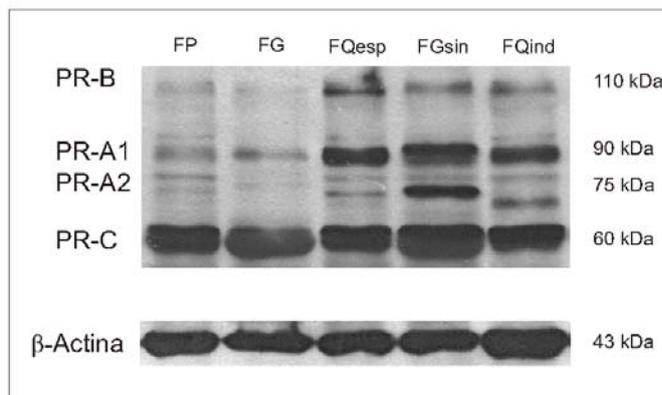


Figura 90. Autorradiografía representativa de un Western Bot que muestra la expresión del Receptor de Progesterona en la pared completa de varios tipos foliculares (FP: folículos antrales pequeños, G: grandes, sin: animales sincronizados, Q: quísticos; ind: con quistes inducidos; esp: con quistes espontáneos).

5- DISCUSIÓN

5- DISCUSIÓN

5.1. Inducción de la enfermedad quística ovárica en bovinos.

La administración de ACTH dos veces diarias durante 7 días a partir del día 15 del ciclo estral bovino fue efectiva para suprimir el pico de LH y producir quistes foliculares en un alto porcentaje de los animales tratados. Este modelo ha sido utilizado por numerosos autores para estudiar diversos aspectos de la enfermedad que se presenta en bovinos (Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000; Calder y col., 2001; Ortega y col., 2008). Los niveles hormonales detectados en los animales con COD inducida fueron similares a los encontrados en la bibliografía. Por otro lado, la caracterización morfológica de los ovarios provenientes del modelo mostraron algunas diferencias con los encontrados en el material de frigorífico ya que estos últimos fueron altamente variables en cuanto a presencia y estado de la capas de la granulosa y teca interna mostrando en muchos casos luteinización de la teca interna o ausencia de la granulosa. Es probable que estos cambios sean debidos al tiempo de permanencia de los quistes en los animales con COD espontánea, desconocido por nosotros al momento de tomar las muestras (Silvia y col., 2002; Johnson, 2004). Muchos estudios han mostrado la importancia de conocer la historia y evolución de la COD ya que debido a la alta variabilidad encontrada es probable que los resultados obtenidos de estudios de materiales provenientes de matadero no reflejen a una población tan heterogénea (Calder y col., 2001; Vanholder y col., 2006).

5.2. Balance proliferación/apoptosis en los folículos ováricos quísticos.

La proliferación celular cuantificada mediante la inmunodetección de Ki-67 fue mayor en las células de la granulosa de los folículos terciarios en los animales control que en los folículos secundarios y atresicos de ambos grupos y terciarios y quísticos de los animales con COD (tanto espontánea como inducida). En ambas tecas, el porcentaje de proliferación fue menor en los quistes (espontáneos e inducidos) que en los folículos terciarios de los dos grupos. Estas diferencias también fueron observadas en bovinos por Isobe y Yoshimura (2000a, 2007) quienes encontraron un bajo índice de proliferación,

medido por la expresión de PCNA, en todas las capas foliculares de quistes bovinos espontáneos. Ellos observaron una intensa proliferación en la zona basal de la capa granulosa de los folículos terciarios normales, y una disminución en los folículos atrésicos y quísticos. Estos resultados coinciden con los hallados en modelos experimentales de COD en otras especies (Baravalle et al., 2006; Salvetti y col., 2009b). Por otra parte, Das y col. (2008) encontraron un aumento en la proliferación celular en los quistes en relación a los folículos dominantes en la enfermedad que se presenta en humanos. Los autores atribuyen este resultado a un aumento en los niveles de andrógenos circulantes. Cabe destacar que en la COD bovina (el presente trabajo) así como también en la COD inducida en ratas mediante la exposición a luz permanente los niveles de andrógenos (testosterona) no están aumentados (datos no publicados) así como tampoco lo están en los animales que presentan la enfermedad de manera espontánea (Isobe, 2007). Monniaux y col., (2008) mostraron que los quistes jóvenes presentaban niveles elevados de testosterona que disminuían en los quistes de más tiempo en los cuales aumentaban los niveles de progesterona. Es importante señalar que los andrógenos producidos por las células de la teca tienen un rol regulador decisivo en la foliculogénesis ya que sirven como precursores para la producción de estrógenos en las células de la granulosa. En contraste, los estrógenos intensifican la respuesta de los folículos ováricos a la estimulación por las gonadotrofinas e incrementan la proliferación en las células de la granulosa. Sin embargo, y como ocurre en la enfermedad que se presenta en humanos, el exceso de andrógenos perjudica la función folicular. Esta hormona inhibe los efectos de los estrógenos sobre el desarrollo folicular y la inducción de receptores para LH en las células de la granulosa mediada por FSH (Farookhi, 1980). En el mismo sentido, observamos una elevada expresión de ARNm para ciclinas E y D1 en los folículos antrales normales en relación a los folículos quísticos espontáneos. En líneas de células tumorales, Zwijsen y col. (1998) mostraron que la ciclina D1 intensifica la acción de los estrógenos a través de su unión al coactivador SRC-1. Robker y Richards (1998) mostraron que las células de la granulosa de ratas expresan de manera normal ciclinas D2 y E mientras que la ciclina D1 y D3 son exclusivas de las células de la teca. Tanto las ciclinas D y E están implicadas en la progresión del ciclo celular desde la fase G1 y su expresión está influenciada por hormonas esteroideas, principalmente los estrógenos, así como también las

gonadotróficas. Se sabe que el $17\text{-}\beta\text{-estradiol}$ es un poderoso mitógeno y que induce la expresión de ciclinas en útero, glándula mamaria y ovario (Robker y Richard, 1998). El-Hefnawy y Zeleznik (2001) reportaron que la FSH aumenta la expresión de ciclina D2 y PCNA en células de la granulosa de ratas. Sin embargo, es sabido que las células de la granulosa comienzan a proliferar incluso antes de que comiencen a influir las hormonas gonadotróficas llegando a altos grados de mitosis en ausencia total de estas hormonas. Esto ha sido demostrado en trabajos en los cuales se midió la proliferación celular en ratas hipofisectomizadas (Robker y Richards, 1998). Sin embargo, el desarrollo final previo a la ovulación es exclusivamente dependiente de gonadotrofinas (Hirshfield, 1985). Existe gran cantidad de reportes que indican que la proliferación celular en la granulosa está regulada por la FSH, los estrógenos, insulina así como algunos factores de crecimiento (familia del IGF-I, FGF-2, EGF, VEGF). Se ha demostrado que el IGF-I se encuentra en concentraciones relativamente altas en los folículos en crecimiento y que tiene acciones directas sobre la estimulación en la proliferación celular de la capa granulosa y en la inducción de receptores para gonadotrofinas en las células foliculares, principalmente LHr. Estudios realizados en quistes ováricos bovinos (espontáneos e inducidos mediante la administración de ACTH) han mostrado una disminución en la concentración de IGF-I tanto en la capa de células de la granulosa como en el líquido folicular, lo que podría estar correlacionado con la baja proliferación encontrada en esta capa celular (Ortega y col., 2008). La presencia de algunas proteínas de unión tales como las cadherinas sería otro indicador de la baja proliferación en las células de la granulosa de los quistes (datos no publicados).

Se sabe que es el balance entre las proteínas que actúan como pro/antiapoptóticas el que determina si una célula se dirige hacia la muerte o supervivencia (Hsueh y col., 1994). Como se detalla previamente, muchas moléculas tienen este tipo de acción en las células ováricas, siendo las más importantes dentro de la familia Bcl-2 las proapoptóticas: bax, bcl-xs, bad y las antiapoptóticas: bcl-2, bcl-w y bcl-xl. La respuesta a la activación de los estímulos inductores de muerte celular es la activación de la cascada de caspasas. Finalmente, la activación de la caspasa-3 conlleva a la célula a una muerte inminente. Los niveles de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 se encontraron más elevados en los folículos en crecimiento de los

animales control y en los folículos en crecimiento y quísticos de los ovarios de los animales con la enfermedad que en los folículos atrésicos de ambos grupos, para todas las capas foliculares. Por el contrario, las moléculas proapoptóticas Bax y Caspasa-3, así como las células apoptóticas detectadas *in situ* se expresaron sobre todo en los folículos atrésicos tanto en la granulosa como en la teca interna. Los folículos quísticos y terciarios sanos no presentaron apoptosis *in situ* detectable para poder realizar la comparación. Isobe y Yoshimura (2000b; 2007), trabajando con quistes foliculares bovinos, encontraron que los folículos quísticos tardíos tenían índices de apoptosis *in situ* más bajos en las células granulosas que en los folículos atrésicos y folículos quísticos tempranos. Sin embargo ellos encontraron que las células de la teca interna de los folículos quísticos tardíos presentaban índices de apoptosis muy bajos, postulando que este es uno de los motivos por los cuales estos folículos tardan en regresar. En un trabajo previo realizado en ratas con COD inducida mediante la exposición a luz permanente, encontramos resultados similares a los observados en bovinos con bajos niveles de proliferación y apoptosis en los quistes (Salveti y col., 2009b). En otro modelo experimental, Anderson y Lee (1997) encontraron, en ratas tratadas con dehidroepiandrosterona (DHEA), que la capa de células de la granulosa presentaba apoptosis *in situ* principalmente en la zona correspondiente al antro folicular, y en menor proporción en la zona correspondiente a la zona basal en los quistes foliculares. En esta última zona, las células permanecieron en el tiempo y cambiaron de fenotipo, pasando de ser células mesenquimales a epiteliales (pasaron de expresar vimentina a citoqueratinas). Por otra parte, Shirwalkar y col., (2007), utilizando otro modelo en ratas en el cual se administró valerato de estradiol para inducir quistes foliculares encontraron un aumento en los niveles de apoptosis en la medida que pasaba el tiempo (máximo: 4 semanas). Hay que destacar que estos modelos en los cuales se utilizan hormonas esteroides (andrógenos y estrógenos) para la inducción de quistes muchas veces presentan alteraciones propias de las hormonas utilizadas y son métodos que no reproducen fielmente lo que ocurre en las enfermedades espontáneas (ya sean en la enfermedad poliquística ovárica (PCOD) que se presenta en humanos como en la COD bovina). Das y col. (2008), trabajando con muestras obtenidas de mujeres con PCOD encontraron una alta expresión de ARNm y proteína para los factores antiapoptóticos IAPc-2 y Bcl-xL y menor expresión para Bax y caspasa-3 en las células de la granulosa

de quistes ováricos, valores similares a los mostrados por los folículos sanos. Muchas investigaciones han demostrado un importante rol de diversas hormonas y factores de crecimiento como elementos de supervivencia de las células para suprimir la apoptosis. Estos incluyen: EGF, NGF, factores estimulantes de colonia, eritropoyetina, IGF-I, FGF-2, activina, TGF α , y las gonadotropinas. Se ha encontrado que suprimiendo la onda preovulatoria de gonadotropinas se induce la atresia folicular en el término de 48 h y que además, administrando esas gonadotropinas de manera exógena, pueden rescatarse los folículos de la atresia temprana. Se ha demostrado también que las gonadotropinas afectan la maquinaria apoptótica suprimiendo la expresión de factores proapoptóticos e induciendo la expresión de proteínas antiapoptóticas (Tilly, 1996; Robles y col., 1999). Por ejemplo, el tratamiento de ratas hipofisectomizadas con FSH disminuye el grado de apoptosis y fragmentación del ADN en los folículos ováricos. Del mismo modo, el tratamiento temprano con FSH o LH/hCG en folículos preovulatorios *in vitro* previene el comienzo de la apoptosis espontánea, subrayando el rol de las gonadotropinas como un factor de supervivencia (Hsueh y col., 1994). Por otra parte, Yacobi y col. (2004) mostraron que, si bien la administración de gonadotropinas (principalmente LH) disminuye la apoptosis en las células de la granulosa en cultivo de folículos preovulatorios, incrementa la apoptosis de las células teco/intersticiales a través de la activación de la caspasa-3. Tilly (1996) demostraron que la inhibición de la apoptosis en las células de la granulosa y la atresia folicular mediada por el tratamiento con gonadotropinas puede estar asociada a la habilidad de estas hormonas de reducir las cantidades de Bax presentes en las células de la granulosa manteniendo los niveles de expresión de Bcl-2 y Bcl-xL. Además, los niveles de ARNm para Bcl-xS se reducen luego de la administración de gonadotropinas y este efecto podría contribuir a un cambio en el balance entre los inductores y supresores de la muerte celular programada (Tilly, 1996; Johnson, 2003). En bovinos con COD, los niveles de gonadotropinas se mantienen constantes a lo largo del tiempo, sin la onda preovulatoria de gonadotropinas (la cual fue inhibida por la ACTH); lo que podría indicar que estas hormonas pueden contribuir a la supervivencia de los folículos que se transformarán en quísticos.

Además, las hormonas esteroideas actúan tanto como supresoras o estimuladoras de la apoptosis en diferentes tejidos y/o sistemas (Billig y col., 1993; Hsueh y col.,

1994). El tratamiento con estrógenos incrementa el índice mitótico de las células de la granulosa y el desarrollo folicular. En contraste, los andrógenos, disminuyen el peso de los ovarios en ratas hipofisectomizadas tratadas con estrógenos y causan el deterioro de los folículos incrementando el número de células con picnosis. Los andrógenos no aromatizables, tales como la DHEA, no solo inhiben la actividad de la aromatasas y estimulan la producción de progesterona en las células de la granulosa, sino que también inducen la atresia en los folículos preantrales y antrales. Los folículos atrésicos presentan una proporción de andrógenos incrementada con respecto a los estrógenos en el líquido folicular. La disminución en la producción de estrógenos en algunas especies resulta en la concomitante acumulación de andrógenos en el líquido folicular, sugiriendo un posible rol de los andrógenos en la progresión del proceso de atresia. Esta evidencia lleva a pensar que los esteroides ováricos están involucrados en el proceso de iniciación de la atresia. La progesterona es otro de los factores que tiene acciones antiapoptóticas en células de la granulosa luteinizadas humanas y de roedores (Yacobi y col., 2004). Las vacas con COD inducida demostraron tener niveles séricos de testosterona iguales que los animales control, con iguales niveles de estrógenos, lo cual puede contribuir a inhibir los procesos de muerte celular programada a nivel ovárico. Por otro lado se encontraron niveles bajos de progesterona en el líquido folicular de los folículos quísticos en relación a los folículos antrales. Esto sugiere que la progesterona tal vez no sea un factor importante en la supervivencia celular en los quistes.

5.3. Expresión de receptores hormonales.

En los ovarios normales, la expresión de los receptores de hormonas esteroides (RE y RP) coincidió con la descrita en la bibliografía (Rosenfeld y col., 1999; Van den Broeck y col., 2002a; Amrozi y col., 2004; D'Haeseleer y col., 2005, 2006). Ambas isoformas del RE se expresaron tanto en las células de la teca como de la granulosa, con distinta intensidad, a diferencia de lo observado en otras especies (Wang y col., 1999, 2000; Pelletier y col., 2000). El RE α fue localizado tanto en la granulosa como en la teca interna de todas las categorías foliculares, con muy pocas células de la teca externa marcadas. Hubo diferencias con el trabajo realizado por Van den Broeck y col. (2002b), quienes no observaron marcación en la granulosa con el anticuerpo utilizado, a pesar de

ser el mismo clon que el usado en el presente trabajo. Podemos inferir que el modo en que procesaron las muestras no fue el óptimo para la conservación del receptor. El RE β se localizó en ambas capas en todas las categorías foliculares. El RP se halló en la granulosa y teca interna de todos los folículos. Berisha y col. (2002) investigaron la expresión normal del ARNm de ambas isoformas del RE y del RP en el ovario bovino y mostraron la presencia del ARNm en los mismos tipos celulares en que nosotros encontramos la expresión de dichas proteínas. La inmunomarcación de las membranas de nitrocelulosa obtenidas por WB también fue coincidente con la bibliografía. El RE α marcó una banda en la zona correspondiente a los 66 kDa y el RE β se marcó en los 55 kDa. El RP marcó las tres isoformas en las bandas correspondientes a las proteínas de 110 kDa (RP-B), 90 kDa (RP-A1), 74kDa (RP-A2) y 60 kDa (RP-C).

Es sabido que la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona es inducida por las gonadotrofinas y cambia de acuerdo a los niveles hormonales a lo largo del ciclo estral (Cook y col., 1990; Calder y col., 1999; Rosenfeld y col., 2001). Las vacas con COD presentan de manera característica alteraciones en la frecuencia y pulsos de LH con respecto a aquellas que presentan ciclos estrales normales (Ribadu y col., 2000). Si bien los niveles de estas hormonas no están aumentados en este modelo experimental, es probable que los niveles constantes de gonadotrofinas influyan sobre la expresión de los receptores hormonales en el ovario como así también a nivel del eje hipotálamo-hipofisario (Taft y col., 1996).

En los animales con COD inducida pudimos observar una expresión similar del RE α en la granulosa de los folículos quísticos y terciarios, en los dos grupos, con menor expresión en los folículos secundarios y atrésicos de ambos grupos. La teca solo mostró diferencias entre los folículos quísticos con los atrésicos del grupo tratado. Sin embargo, los folículos quísticos espontáneos presentaron una elevación considerable de los niveles del RE α en ambas capas foliculares en relación a todas las otras categorías estudiadas. El análisis de esta proteína en la pared completa mediante western blot indicó solo un incremento de los niveles en los folículos antrales grandes provenientes de animales sincronizados con respecto a los quistes inducidos. Por otra parte, el RE β mostró una disminución en los niveles proteicos en ambas capas de folículos secundarios, terciarios y atrésicos del grupo tratado con ACTH en relación a los

folículos terciarios controles y los quistes mostraron niveles parecidos a estos últimos. Los quistes espontáneos mostraron niveles bajos en la expresión de este subtipo de receptor. La expresión en pared completa mostró niveles elevados de expresión en los folículos antrales grandes de animales sincronizados con relación a los folículos quísticos (tanto espontáneos como inducidos). Estos resultados muestran que hay diferencias en la expresión de receptores de estrógenos principalmente la isoforma β en los folículos provenientes de los animales con COD inducida y espontánea. Algunos estudios llevados a cabo en distintas especies, incluyendo seres humanos y en modelos experimentales en roedores, han mostrado que los ovarios de individuos con COD presentan diferencias en la expresión de la proteína y el ARNm de los receptores de estrógenos con respecto a individuos con ovarios normales (Odore y col., 1999; Jakimiuk y col., 2002; Salvetti y col., 2007,2009a). Odore y col. (1999) mostraron que hay una notable reducción en la concentración total de receptores de estrógenos en los quistes foliculares bovinos con respecto a los folículos dominantes de animales normales. Sin embargo estos autores no discriminaron entre los distintos subtipos de receptores de estrógenos, así como en la localización de los mismos. Por otro lado, Calder y col. (2001) no hallaron diferencias en la expresión del ARNm del RE β en los folículos quísticos de hembras bovinas con respecto a los folículos dominantes, utilizando la técnica de hibridización *in situ*, lo cual coincide con los resultados obtenidos por nosotros ya que los quistes inducidos mantuvieron los niveles de RE β iguales a los folículos terciarios normales. Jakimiuk y col. (2002) encontraron variaciones en la expresión de las dos isoformas del RE en las capas foliculares de los quistes en relación con los folículos del mismo tamaño en mujeres con PCOD y normales respectivamente. Ellos mostraron, por RT-PCR y WB una disminución tanto del ARNm como de las proteínas de RE β en las células de la granulosa como de la teca interna en los folículos derivados de individuos con COD en comparación con los folículos del mismo tamaño de mujeres sanas. En cuanto al RE α , la única diferencia encontrada por estos autores fue un marcado incremento en la expresión proteica en las células de la teca interna proveniente de los ovarios quísticos.

Es sabido que las gonadotropinas (Byers y col., 1997) y los estrógenos (Sharma y col., 1999) regulan negativamente la expresión del RE β en las células de la granulosa y

ambos receptores de estrógenos muestran una tendencia hacia la regulación positiva en paralelo al aumento de los niveles de estrógenos en el líquido folicular hecho que se correlaciona con la regulación positiva de los receptores de LH y de FSH (Berisha y col., 2000, 2002).

Teniendo en cuenta las acciones de los estrógenos a nivel ovárico: estimulación de la proliferación y diferenciación celular durante la foliculogénesis, disminución de la apoptosis, estimulación de la secreción de factores de crecimiento, incremento de las uniones estrechas entre las células de la granulosa, aumento de la expresión de receptores para gonadotrofinas en el folículo, etc (Rosenfeld y col., 2001); cualquier cambio en la expresión y concentración de los distintos subtipos de receptores de estrógenos puede llevar a modificaciones en el modo de acción de los estrógenos sobre sus células blanco. Si bien las consecuencias de estos cambios no están claras todavía, hay que considerar que ambos subtipos tienen distinta afinidad por el 17- β -estradiol y además es posible la formación de heterodímeros cruzados entre los dos tipos de RE. Bajo estas circunstancias sería de esperar que pequeños cambios en la relación RE α /RE β interrumpieran la foliculogénesis normal llevando a alteraciones reproductivas tales como persistencia folicular y COD (Mosselman y col., 1996; Taft y col., 1996; Pettersson y col., 1997; Lingenfelter y col., 2007). Así, los efectos del estradiol en estas condiciones pueden llevar a cambios en el balance proliferación/apoptosis (Isobe y Yoshimura, 2000a y b), en las concentraciones de receptores para gonadotrofinas (Calder y col., 2001), en las acciones de las enzimas y en el metabolismo celular (Calder y col., 2001), etc. Investigaciones recientes hechas con ratones KO para RE revelaron que la presencia de ambos receptores es un prerrequisito para el funcionamiento apropiado del eje hipotálamo-hipofisario-ovárico y para una exitosa ovulación. Los ratones sin el gen RE α (ratones RE α KO) exhiben un fenotipo similar al de la PCOD que se presenta en humanos con niveles de LH aumentados, y ovarios caracterizados por la presencia de múltiples folículos quísticos y hemorrágicos sin evidencias de ovulación (Couse y col., 2003). Si bien los ratones KO para el gen RE β (RE β KO) son fértiles, los ovarios de estos animales muestran signos morfológicos de desarrollo folicular anormal, y una capacidad ovulatoria reducida (Couse y col., 2004; Emmen y col., 2005). Quienes desarrollaron estos modelos demostraron también que las acciones del estradiol a través

del RE β son vitales para la diferenciación celular de las células de la granulosa dependiente de FSH, y que en ausencia de este receptor, los folículos preovulatorios son deficientes en la necesaria organización celular, actividad enzimática y en las vías de señalización de receptores (principalmente receptores de LH) (Couse y col., 2004; Emmen y col., 2005). Los cambios observados en los ratones KO probablemente no solo se deban a la deficiencia de los receptores a nivel ovárico sino también a la ausencia de estos en otros niveles del eje hipotálamo-hipofisario con la consecuente disrupción en los mecanismos de retroalimentación.

Los RP se expresaron en todos los tipos celulares estudiados y en todas las categorías foliculares tal como se describe en la bibliografía (Van den Broeck, 2002b). Hubo marcación tanto nuclear como citoplasmática lo cual ha sido descrito en trabajos previos y está explicado por algunas acciones no genómicas que ocurren a través de estos receptores que se encuentran en el citoplasma de las células de varios tejidos (Ogle y col., 1998; Schams y col., 2003; Ulbrich y col. 2003).

La expresión del RP en las células de la granulosa fue elevada en las células de la granulosa de los folículos terciarios controles con respecto a los folículos quísticos inducidos, similar a lo observado en las muestras obtenidas en frigorífico. Los animales con COD presentaron una mayor expresión de la isoforma RP-A2 en los folículos terciarios antrales de animales sincronizados con una tendencia a la disminución en RP-B en los quistes espontáneos. Se ha demostrado que el RP-A funciona como un inhibidor transcripcional de todos los receptores hormonales esteroides y como un facilitador de señales cruzadas dependientes de ligandos entre los caminos de señales de los receptores sexuales esteroides dentro de la célula. El RP-B aparece como un activador transcripcional de los genes de respuesta a la progesterona. De este modo, la relación RP-A/RP-B en células específicas define la respuesta fisiológica a la progesterona (Wen y col., 1994). No se sabe mucho acerca de la isoforma RP-C. En la rata esta forma es predominantemente citoplasmática y no tiene actividad transcripcional por si misma pero puede transformar las capacidades transcripcionales de RP-B y RP-A en menos eficientes (Ogle, 2002). Los cambios en la expresión relativa de las distintas isoformas podría de este modo alterar las actividades biológicas inducidas por la progesterona y resultar en cambios por la ausencia funcional de esta

hormona sin cambios en los niveles tisulares o séricos de la misma (Fang y col., 2002; Schams y col., 2003; Goldman y col., 2005).

Si consideramos la regulación hormonal, la onda de LH actúa directamente para inducir la expresión de ARNm y proteína de RP en las células granulosas diferenciadas que expresan altos niveles de receptores de LH y aromatasas citocromo P450 (Natraj y Richards, 1993). Aparentemente, la progesterona producida por las células estimuladas que poseen los receptores disminuyen las posibilidades de morir por apoptosis, actuando esta hormona como un factor de supervivencia de las células (Svensson y col., 2000).

En ratones KO para el RP-A (RPAKO), la isoforma RP-B funciona de manera tejido-específica para mediar un subconjunto de funciones reproductivas de los RP. La ablación del RP-A no afecta la respuesta a la progesterona en la glándula mamaria ni en el timo pero resulta en severas anomalías a nivel de la función uterina y ovárica. Los ovarios de los ratones RPAKO contienen gran cantidad de folículos anovulatorios maduros detenidos en un estadio similar de desarrollo, con un número reducido de ovocitos y con evidentes fallas en la ovulación. El estudio de ratones RPKO reveló la ausencia de ciertas enzimas metaloproteasas necesarias a la hora de la disolución del ápice de los folículos preovulatorios para la correcta expulsión de los ovocitos (Mulac-Jericevic y Conneely, 2004). Por otro lado, la ausencia de RP-A en el útero de los ratones RPAKO revelan una inesperada actividad proliferativa dependiente de progesterona a través del RP-B en el epitelio y demuestran que el RP-A es necesario para inhibir la proliferación inducida por progesterona (a través del RP-B) y estrógenos en este tejido. Esta actividad inhibitoria no se detecta en la glándula mamaria en donde ambos receptores actúan como mediadores de la proliferación inducida por progesterona. En los folículos provenientes de animales con COD, los niveles de RP-A2 fueron inferiores a los encontrados en los folículos terciarios de los animales control aunque también hubo una tendencia de la isoforma B a disminuir en los quistes espontáneos, lo que podría también explicar una menor proliferación en estos ovarios debido a la actividad inhibitoria de la isoforma A sobre la B.

Las diferencias encontradas en la expresión de ambos subtipos de RE y las isoformas de RP entre lo observado en los folículos quísticos obtenidos del modelo

experimental y los provenientes de frigorífico tal vez se deban a la alta heterogeneidad en estas últimas ya que al momento de la recolección de las muestras no existen datos sobre el estado del animal, tratamientos previos, gestaciones, edad de los animales, etc.; y además sin la posibilidad de obtener muestras de sangre que aportarían datos significativos sobre las hormonas séricas. Estos hallazgos recalcan la importancia de trabajar con modelos experimentales en donde pueden controlarse algunas cuestiones tales como la edad de los animales, estado reproductivo, el tiempo de persistencia de los folículos, etc.

6- CONCLUSIONES

6- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis y su discusión con los aportes de otros autores, nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1- Los procesos de proliferación y apoptosis se vieron alterados en los ovarios de los animales afectados por la enfermedad en comparación con los de los controles, encontrándose baja proliferación en las capas celulares de los folículos terciarios y quísticos de esos animales; con un concomitante bajo índice de apoptosis. Esto indicaría que si bien estos folículos no siguen creciendo, tampoco están destinados a la atresia, por lo menos de manera temprana.

2- La expresión de RE mostró diferencias entre los folículos en crecimiento normales de los ovarios control con respecto a los mismos en los ovarios de animales con COD. La expresión de RE α se mantuvo normal en los folículos en crecimiento y quísticos de los animales tratados y el RE β presentó niveles inferiores a los encontrados en los animales normales. Esto indica cambios en la relación RE α /RE β en los ovarios de los animales con la enfermedad, y considerando que ambos receptores tienen distinta afinidad por el 17- β -estradiol, mediando diferentes respuestas, esta podría ser una de las causas de las alteraciones celulares observadas en los ovarios de los animales con la enfermedad.

3- Se observaron diferencias en la expresión de las isoformas del RP, así como en su cuantificación total por inmunohistoquímica. Los quistes mostraron menores niveles de expresión de RP total. El RP-A2 se encontró aumentado en los folículos controles y se observó una tendencia a disminuir del RP-B en los quistes espontáneos. Esto muestra un cambio en la relación de las isoformas expresadas en los animales tratados, probablemente asociado con las alteraciones en la proliferación y diferenciación celular.

4- Las similitudes halladas entre este modelo experimental, y los casos espontáneos de bovinos estudiados mediante material de frigorífico, resaltan la importancia del trabajo en medicina experimental que permite el estudio de aspectos difíciles de concretar en casos a campo. Por otra parte, muchos de los resultados aquí presentados muestran evidentes diferencias entre el modelo utilizado y los casos espontáneos obtenidos en frigorífico. Muchas de estas diferencias podrían subsanarse a

través del estudio de casos de campo en los cuales puedan obtenerse datos de rodeo, de pariciones de los animales, de alimentación, de enfermedades previas o concomitantes, etc; y de este modo agrupar diferentes subpoblaciones con la misma enfermedad de manera de ver en cuales de estas puede utilizarse el modelo y en cuales no.

7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, D.H.; Dumesic, D.A. y Franks, S. (2002) *Developmental origin of polycystic ovary syndrome – a hypothesis*. J. Endocrinol. 174: 1-5.
- Adams, G.P.; Matteri, R.L.; Kastelic J.P.; Ko, J.C. y Ginther, O.J. (1992). *Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers*. J. Reprod. Fertil. 94: 177-188.
- Adams, G.P.; Jaiswal, R.; Singh, J. y Malhi, P. (2008). *Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle*. Theriogenology 69: 72-80.
- Adashi, E.Y.; Jones P.B. y Hsueh A.J. (1981). *Synergistic effect of glucocorticoids on the stimulation of progesterone production by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells*. Endocrinology 109:1888-1894.
- Aerts, J.M.J. y Bols, P.E.J. (2008a). *Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development*. Reprod. Dom. Anim. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x
- Aerts, J.M.J. y Bols, P.E.J. (2008b). *Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects*. Reprod. Dom. Anim. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x
- Agarwal, S.K. y Shankar, U. (1998). *Clinical response, related progesterone profile and subsequent fertility after gonadotrofin releasing hormone administration in crossbred cows with ovarian cyst*. Ind. Vet. J. 75:127-130.
- Amrozi, Kamimura, S.; Ando, T.; Hamana, K. (2004). *Distribution of estrogen receptor α in the dominant follicles and corpus luteum at the three stages of estrous cycle in Japanese black cows*. J. Vet. Med. Sci. 66: 1183-1188.
- Anderson, E. y Lee, G.Y. (1997). *The polycystic ovarian (PCOD) condition: apoptosis and epithelization of the ovarian antral follicles are aspects of cystogenesis in the dehydroepiandrosterone (DHEA)-treated rat model*. Tissue Cell 29:171-189.
- Arbeiter, K.; Aslan S. y Schwarzenberger F. (1990). *Ovarian cysts in cattle-etiology, therapy success, fertility*. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 97:380-382.

- Baker, J.; Hardy, M.P.; Zhou, J.; Bondy, C.; Lupu, F.; Bellve, A.R. y Efstratiadis, A. (1996). *Effects of an IGF-I gene null mutation on mouse reproduction*. Mol. Endocrinol. 10:903-918.
- Bao, B. y Garverick, H.A. (1998) *Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review*. J. Anim. Sci. 76: 1903-1921.
- Baravalle, C.; Salvetti N.R.; Mira G.A.; Pezzone, N.; Ortega, H.H. (2006). *Microscopic Characterization of Follicular Structures in Letrozole -Induced Polycystic Ovarian Syndrome in the Rat*. Arch. Med. Res. 37: 830-839.
- Baravalle, C.; Salvetti N.R.; Mira G.A.; Lorente J.A. y Ortega H.H. (2007). *Role of ACTH in the pathogenesis of Polycystic Ovarian Syndrome in the rat: hormonal profiles and ovarian morphology*. Physiol. Res. 56: 67-78.
- Bartolomé, J.A.; Thatcher W.W.; Melendez P.; Risco C.A. y Archbald L.F. (2005). *Strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cysts in dairy cattle*. JAVMA, 227: 1409-1415.
- Beato, M. y Klug, J. (2000). *Steroid hormone receptors: an update*. Hum. Reprod. Update. 6: 225-236.
- Berisha, B.; Schams, D.; Kosmann, M.; Amselgruber, W. y Einspanier, R. (2000). *Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles*. J. Endocrinol. 167:371-382.
- Berisha, B.; Pfaffl, M. y Schams, D. (2002). *Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrous cycle and pregnancy*. Endocrine 17: 207-214.
- Billig, H.; Furuta, I.; Hsueh y A.J. (1993). *Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis*. Endocrinology 133: 2204-2212.
- Björnström, L. y Sjöberg, M. (2005). *Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes*. Mol. Endocrinol. 19: 833-842.

- Bosu, W.T. y Peter, A.T. (1987). *Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows*. Theriogenology 28: 725.
- Brenner, R.M.; West, N.B.; Norman, R.L.; Sandow, B.A.; Verhage, H.G. (1979). *Progesterone suppression of the estradiol receptor in the reproductive tract of macaques, cats and hamsters*. Adv. Exp. Med. Biol. 117:173-196.
- Byers, M.; Kuiper, G.G.; Gustafsson, J.A.; Park-Sarge, O.K. (1997). *Estrogen receptor- β mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotrofins*. Mol. Endocrinol. 11:172-182.
- Calder, M.D.; Salfen, B.E.; Bao, B.; Youngquist, R.S. y Garverick, H.A. (1999). *Administration of progesterone to cows with ovarian follicular cysts results in a reduction in mean LH and LH pulse frequency and initiates ovulatory follicular growth*. J. Anim. Sci. 77: 3037-3042.
- Calder, M.D.; Manikkam M.; Salfen, B.E.; Youngquist R. S.; Lubahn D.B.; Lamberson W.R y Garverick H.A. (2001). *Dominant bovine ovarian follicular cysts express increased levels of messenger RNAs for luteinizing hormone receptor and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta(4),delta(5) isomerase compared to normal dominant follicles*. Biol. Reprod. 65:471-476.
- Casida, L.E. y Chapman A.B. (1951). *Factors affecting the incidence of cystic ovaries in a herd of Holstein cows*. J. Dairy Sci. 34: 1200-1205.
- Casida, L.E.; Mcshan, W.H. y Meyer, R.K. (1944). *Effects of an unfractionated pituitary extract upon cystic ovaries and nymphomania in cows*. J. Anim. Sci. 3:273-282.
- Christopher, C. y Devanathan, T.G. (1997) *Incidence of Cystic Ovarian Degeneration in crossbred cows*. Ind. Vet. J. 74:184-184.
- Clarke, I.J. y Cummins J.T. (1985). *GnRH pulse frequency determines LH pulse amplitude by altering the amount of releasable LH in the pituitary glands of ewes*. J. Reprod. Fertil. 73:425-431.
- Colitti, M.; Colin, J.; Wilde, C.J. y Stefanon, B. (2004) *Functional expression of bcl-2 protein family and AIF in bovine mammary tissue in early lactation*. J. Dairy Res. 71: 20-27.

- Conneely, O.M. (2001). *Perspective: female steroid hormone action*. *Endocrinology* 142: 2194-2199.
- Cook, D.L.; Smith, C.A.; Parfet, J.R.; Youngquist, R.S.; Brown, E.M. y Garverick, H.A. (1990). *Fate and turnover rate of ovarian follicular cysts in dairy cattle*. *J. Reprod. Fertil.* 90:37-46.
- Cooke, R.G. y Benhaj K.M. (1989). *Effects of ACTH and cortisol on luteolysis in the ewe*. *Anim. Reprod. Sci.* 20:201.
- Couse, J.F.; Yates, M.M.; Walker, V.R.; Korach, K.S. (2003). *Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ER α but not ER β* . *Mol. Endocrinol.* 17:1039-1053.
- Couse, J.F.; Yates, M.M.; Sanford, R.; Nyska, A.; Nilson, J.H.; Korach, K.S. (2004). *Formation of cystic ovarian follicles associated with elevated luteinizing hormone requires estrogen receptor- β* . *Endocrinology* 145:4693-4702.
- D'Haeseleer, M.; Van Poucke, M. y Van den Broeck, W. (2005). *Cell-specific localization of oestrogen receptor β (ESR2) mRNA within various bovine ovarian cell types using in situ hybridization*. *Anat. Histol. Embryol.* 34: 265-272.
- D'Haeseleer, M.; Cocquyt, G.; Van Cruchten, S.; Simoens, P. y Van Den Broeck, W., (2006). *Cell-specific localisation of apoptosis in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle*. *Theriogenology* 65: 757-772.
- Das, M.; Djahanbakhch, O.; Hacihanefioglu, B.; Saridogan, E.; Ikram, M.; Ghali, L.; Raveendran, M. y Storey, A. (2008) *Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovary syndrome*. *J Clin Endocr Metab*, 93: 881-887.
- de Silva, M. y J. J. Reeves. (1988). *Hypothalamic-Pituitary function in chronically cystic and regularly cycling dairy cows*. *Biol. Reprod.* 38: 264.
- Dellmann, H.D. y Eurell, J.A. (1998). *Textbook of veterinary histology, 5th ed., London: Williams y Wilkins.* p. 252.
- Dobson, H. y Smith, R.F. (2000) *What is stress, and how does it affect reproduction?* *Anim. Reprod. Sci.* 60: 743-752.

- Dobson, H.; Ribadu, A.Y.; Noble, K.M.; Tebble, J.E. y Ward, W.R. (2000). *Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle*. J. Reprod. Fertil. 120: 405-410.
- Donadeu, F.X. y Ginther, O.J. (2002) *Changes in concentrations of follicular-fluid factors during follicle selection in mares*. Biol. Reprod. 66:1111-1118.
- Douthwaite, R. y Dobson, H. (2000). *Comparison of different methods of diagnosis of cystic ovarian disease in cattle and an assessment of its treatment with a progesterone-releasing intravaginal device*. Vet. Rec. 147:355-359.
- Driancourt, M.A.; Reynaud, K.; Cortvrindt, R. y Smitz, J. (2000). *Roles of KIT and KIT ligand in ovarian function*. Rev. Reprod. 5:143-152.
- Drummond, A.E.; Britt, K.L.; Dyson, M.; Jones, M.E.; Kerr, J.B.; O'donnell, L.; Simpson, E.R. y Findlay, J.K. (2002). *Ovarian steroid receptors and their role in ovarian function*. Mol. Cell. Endocrinol. 191:27-33.
- Duleba, A.J.; Spaczynski, R.Z.; Olive, D.L.; Behrman, H.R. (1997). *Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells*. Biol. Reprod. 56:891-897.
- Durlinger, A.L.L.; Gruijters, M.J.G.; Kramer, P.; Karels, B.; Ingraham, H.A.; Nachtigal, M.W.; Uilenbroek, J.T.J.; Grootegoed, J.A.; Themmen, A.P.N. (2002). *Anti-Müllerian Hormone Inhibits Initiation of Primordial Follicle Growth in the Mouse Ovary*. Endocrinology 143: 1076-1084
- El-Hefnawy, T. y Zeleznik, A.J. (2001) *Synergism between FSH and activin in the regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cyclin D2 expression in rat granulosa cells*. Endocrinology, 142:4357-4362.
- Emmen, J.M.; Couse, J.F.; Elmore, S.A.; Yates, M.M.; Kissling, G.E.; Korach, K.S. (2005). *In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER)- α and ER β null mice indicate a role for ER β in follicular maturation*. Endocrinology 146:2817-2826.
- Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Grandien, K.; Lagercrantz, S.; Lagercrantz, J.; Fried, G.; Nordenskjöld, M.; Gustafsson, J.A. (1997). *Human estrogen receptor β -gene*

- structure, chromosomal localization and expression pattern*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82:4258-4265.
- Evans, A.C.O. (2003) Characteristics of Ovarian Follicle Development in Domestic Animals. *Reprod. Dom. Anim.* 38, 240–246.
- Evans, A.C.O., Adams, G.P., Rawlings, N.C.(1994) *Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age*. J. *Reprod. Fertil.* 102:463-470.
- Eyestone, W.H. y Ax, R.L. (1984). *A review of ovarian follicular cysts in cows, with comparisons to the condition in women, rats and rabbits*. *Theriogenology* 22:109-125.
- Fang, X.; Wong, S. y Mitchell, B.F. (2002). *Messenger RNA for progesterone receptor isoforms in the late-gestation rat uterus*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:E1167-1172.
- Farookhi, R (1980) *Effects of androgen on induction of gonadotrophin receptors and gonadotrophin-stimulated adenosin 3', 5'- monophosphate production in rat ovarian granulosa cells*. *Endocrinology* 106:1216-1223.
- Fathala, M.A.; Geissenger, H.D. and Liptrap, R.M., (1978). *Effects of endometrial damage and prostaglandin F2a in experimental cystic ovarian follicles in the cow*. *Res. Vet. Sci.* 25, 269–279.
- Fitzpatrick, S.I.; Funkhouser, J.M.; Sindoni, D.M.; Stevis, P.E.; Deecher, D.C.; Bapat, A.R.; Merchenthaler, I. y Frail, D.E. (1999). *Expression of Estrogen Receptor-β Protein in Rodent Ovary*. *Endocrinology* 140:2581–2591.
- Fleischer, P.; Metzner, M.; Beyerbach, M.; Hoedemaker, M. y Klee, W. (2001). *The relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows*. *J. Dairy Sci.* 84: 2025-2035.
- Galloway, M.; Gregan, S.M.; Wilson, T.; McNatty, K.P.; Juengel, J.L.; Ritvos, O.; Davis, G.H. (2002). *BMP-15 mutations and ovarian function*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191:15-18.
- Garnero, O.; Perusia, O. (2002) *Manual de anestésias y cirugías del bovino. 1° edición*. - Editorial Imprenta San Cayetano, Santa Fe, Argentina. p. 125.

- Gartner, L.P. y Hiatt, J.L. (1997). *Histología. Texto y Atlas*. McGraw-Hill Interamericana, México, 506 p.
- Garverick, H.A. (1997). *Ovarian follicular cysts in dairy cows*. J. Dairy Sci. 80: 995-1004.
- Gaub, M.P.; Bellard, M.; Scheuer, I.; Chambon, P.; Sassone-Corsi, P. (1990). *Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex*. Cell 63:1267-1276.
- Gava, N.; Clarke, C.L.; Byth, K.; Arnett-Mansfield, R.L.; De Fazio, A. (2004). *Expression of progesterone receptors A and B in the mouse ovary during the estrous cycle*. Endocrinology 145: 3487-3494.
- Geneser, F. (2005). *Histología*, 3ra edición, Editorial Médica Panamericana. P.813.
- Gigli, I; Russo, A. y Agüero, A. (2006). *Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos*. InVet. 8: 183-204
- Ginther, O.J.; Wiltbank, M.C.; Fricke, P.M.; Gibbons, J.R.; Kot, K. (1996) *Selection of the dominant follicle in cattle*. Biol. Reprod. 55:1187-1194.
- Ginther, O.J.; Beg, M.A.; Donadeu, F.X. y Bergfelt, D.R. (2003) *Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. A review*. Anim. Reprod. Sci. 78:239-257.
- Goldman, S.; Weiss, A.; Almalah, I. y Shalev, E. (2005). *Progesterone receptor expression in human decidua and fetal membranes before and after contractions: possible mechanism for functional progesterone withdrawal*. Mol. Hum. Reprod. 11:29-77.
- Golias, C.H.; Charalabopoulos, A. y Charalabopoulos, K. (2004). *Cell proliferation and cell cycle control: a mini review*. Int. J. Clin. Pract. 58: 1134-1141.
- Graham, J.D. y Clarke, C.L. (1997). *Physiological Action of Progesterone in Target Tissues*. Endocr. Rev. 18:502-519.
- Greenwald, G.S. y Roy, S.K. (1994) *Follicular development and its control*. In: *The Physiology of Reproduction*, 2nd Edition (Knobil E, Neill J, eds.). pp. 629-724. Raven Press: New York.
- Hackett, A.J. y Batra T.R. (1985). *The incidence of cystic ovaries in dairy cattle housed*

in a total confinement system. Can. J. Comp. Med. 49: 55-57.

Hamilton, S.A.; Garverick H.A.; Keisler D.H.; Xu Z.Z.; Loos K.; Youngquist R.S. y Salfen B.E. (1995). *Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows.* Biol. Reprod. 53: 890-898.

Hatler, T.B.; Hayes S.H.; Laranja D.A.; Fonseca L.F. y Silvia W.J. (2003). *Relationship between endogenous progesterone and follicular dynamics in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts.* Biol. Reprod. 69: 218-223.

Heuer, C.; Schukken, Y.H. y Dobbelaar, P. (1999) *Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds.* J. Dairy Sci. 82:295-304.

Hillier, S.G. (2001). *Gonadotrophic control of ovarian follicular growth and development.* Mol. Cell. Endocrinol. 179:39-46.

Hiroi, H.; Inoue, S.; Watanabe, T.; Goto, W.; Orimo, A.; Momoeda, M.; Tsutsumi, O.; Taketani, Y. y Muramatsu, M. (1999) *Differential immunolocalization of estrogen receptor α and β in rat ovary and uterus.* J. Mol. Endocrinol. 22:37-44.

Hirshfield, A.N. (1985). *Comparison of granulosa cell proliferation in small follicles of hypophysectomized, prepubertal, and mature rats.* Biol. Reprod. 32:979-987.

Hirshfield, A.N. (1991). *Development of the follicles in the mammalian ovary.* Int. Rev. Cytol. 124:43-101.

Hooijer, G. A. (2003). *Cystic Ovarian Disease. Treatment, Heritability and Epidemiology.* Thesis Edited by: Mello Sevinga, Groningen, Suecia. Pp 141.

Hsu, S.Y.; Hsueh, A.J (2000) *Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm.* Physiol. Rev. 80:593-614.

Hsueh, A.J. y Erickson G. F. (1978). *Glucocorticoid inhibition of FSH-induced estrogen production in cultured rat granulosa cells.* Steroids 32: 639-648.

Hsueh, A.J.; Billig, H. y Tsafiriri, A. (1994). *Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process.* Endocr. Rev. 15:707-724.

- Isobe, N. y Y. Yoshimura. (2000a). *Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: a DNA-end labeling histochemical study*. Theriogenology 53: 897-904.
- Isobe, N. y Y. Yoshimura. (2000b). *Immunocytochemical study of cell proliferation in the cystic ovarian follicles in cows*. Theriogenology 54: 1159-1169.
- Isobe, N. y 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.
- Jaiswal, R.S., Singh, J. y Adams, G.P. (2004) *Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary*. Biol. Reprod. 71:1244-1251.
- Jakimiuk, A.J.; Weitsman, S.R.; Yen, H.W.; Bogusiewicz, M. y Magoffin, D.A. (2002). *Estrogen receptor alpha and beta expression in theca and granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 87:5532-5538.
- Johnson, A.L. (2003). *Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles*. Anim. Reprod. Sci. 78:185-201.
- Johnson, C.J. (2004). *Cystic Ovarian Disease in Cattle on Dairies in Central and Western Ohio: Ultrasonic, Hormonal, Histologic, and Metabolic Assessments*. Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Philosophy in the Graduate School of The Ohio State University.
- Johnson, A.D.; Ulberg, L.C. (1967). *Influence of exogenous progesterone on follicular cysts in dairy cattle*. J. Dairy Sci. 50:758-761.
- Jonassen, J.A. y Richards, J.S. (1980). *Granulosa cell desensitization: effects of gonadotrofins on antral and preantral follicles*. Endocrinology 106:1786-1794.
- Kastner, P.; Krust, A.; Turcotte, B.; Stropp, U.; Tora, L.; Gronemeyer, H.; Chambon, P. (1990). *Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B*. EMBO J. 9:1603-1614.
- Kesler, D.J. y Garverick H.A. (1982). *Ovarian cysts in dairy cattle: a review*. J. Anim. Sci. 55: 1147-1159.

- Kesler, D.J.; Garverick H.A.; Caudle A.B.; Elmore R.G.; Youngquist R.S. y Bierschwal C.J. (1980). *Reproductive hormone and ovarian changes in cows with ovarian cysts*. J. Dairy Sci. 63: 166-170.
- Kuiper, G.G.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.A. (1996). *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:5925-5930.
- Kumar, T.R.; Wang, Y.; Lu, N.; Matzuk, M.M. (1997). *Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility*. Nat. Genet. 15:201-204.
- Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227:680-685.
- Laporte, H.M.; Hogeveen H.; Schukken Y.H. y Noordhuizen J.P.T.M. (1994). *Cystic ovarian disease in Dutch dairy cattle, I- Incidence, risk-factors and consequences*. Livest. Prod. Sci. 38: 191-197.
- Liao, J.; Xu, X. y Wargovich, M.J. (2000). *Direct Reprobing with Anti- β -actin Antibody as an Internal Control for Western Blotting Analysis*. BioTechniques 28:216-218.
- Liptrap, R.W. y McNally P.J. (1976). *Steroid concentrations in cows with corticotrophin-induced cystic ovarian follicles and the effects of prostaglandin F_{2a} and indomethacin given by intrauterine injection*. Am. J. Vet. Res. 37: 369-375.
- Lopez-Diaz, M.C. y Bosu W.T.K. (1992). *A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants*. Theriogenology 37: 1163-1183.
- Lucy, M.C. (2007) *The bovine dominant ovarian follicle*. J. Anim. Sci. 85(Suppl.): E89-99.
- Lucy, M.C, Savio, J.D., Badinga, L., De La Sota, R.L., Thatcher, W.W. (1992) *Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle*. J. Anim. Sci. 70: 3615-3626.
- Lydon, J.P.; Demayo, F.J.; Funk, C.R.; Mani, S.K.; Hughes, A.R.; Montgomery, Jr. C.A.; Shyamala, G.; Conneely, O.M. y O'malley, B.W. (1995). *Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities*. Genes Dev. 9:2266-2278.

- Malven, P.V. 1986. *Inhibition of pituitary LH release resulting from endogenous opioid peptides*. Dom. Anim. Endocrinol. 3: 135-144.
- Mason, A.J.; Hayflick, J.S.; Zoeller, R.T.; Young, W.S.; Phillips, H.S.; Nikolics, K. y Seeburg, P.H. (1986a). *A deletion truncating the gonadotrofin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse*. Science 234:1366-1371.
- Mason, A.J.; Pitts, S.L.; Nikolics, K.; Szonyi, E.; Wilcox, J.N.; Seeburg, P.H. y Stewart, T.A. (1986b) *The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy*. Science 234:1372-1378.
- Matsuzaki, S.; Fukaya, T.; Suzuki, T.; Murakami, T.; Sasano, H. y Yajima, A. (1999). *Oestrogen receptor α and β mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle*. Mol. Human Reprod. 5:559-564.
- Mcgee, E.A. y Hsueh, A.J. (2000). *Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles*. Endocr. Rev. 21: 200-214.
- McNutt, G.W. (1927). *The corpus luteum of pregnancy in the cow (Bos taurus) and a brief discussion of the clinical ovarian changes*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 72:286-299.
- Miro, F. y Hillier, S.G. (1996). *Modulation of granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and differentiation by activin*. Endocrinology 137:464-468.
- Moberg, G.P. (1991). *How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals*. J. Dairy Sci. 74: 304-311
- Monniaux, D.; di Clemente, N.; Touzè, J.L.; Belville, C. y Rico, C. (2008). *Intrafollicular Steroids and Anti-Müllerian Hormone During Normal and Cystic Ovarian Follicular Development in the Cow*. Biol. Reprod. 387-396
- Mosselman, S.; Polman, J. y Dijkema, R. (1996). *ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor*. FEBS Lett. 392:49-53.
- Mulac-Jericevic, B. y Conneely, O.M. (2004). *Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors*. Reproduction. 128:139-146.
- Nakao, T. y E. Grünert. (1990). *Effects of dystocia on postpartum adrenocortical function in dairy cows*. J. Dairy Sci. 73: 2801-2806.

- Nakao, T.; Numata, Y.; Kubo, M. y Yamauchi, S. (1978). *Treatment of cystic ovarian disease in dairy cattle*. Cornell Vet. 68:161-178.
- Nanda, As.; Ward, W.R.; Williams, P.C.W. y Dobson, H. (1988). *Retrospective analysis of the efficacy of different hormone treatments of cystic ovarian disease in cattle*. Vet. Rec. 122:155-158.
- Nanda, A. S.; W. R. Ward y H. Dobson. (1989). *The relationship between milk yield and cystic ovarian disease in cattle*. Br Vet J 145: 39-45.
- Nanda, A.S.; Ward, W.R. y Dobson, H. (1991). *Opioid involvement in LH release during the negative feedback effects of oestradiol and progesterone in dairy cows*. Reprod. Fertil. Dev. 3:709-714.
- Natraj, U. y Richards, J.S. (1993). *Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles*. Endocrinology. 133:761-769.
- Nilsson, S.; Makela S.; Treuter, E.; Tujague, M.; Thomsen, J.; Andersson, G.; Enmark, E.; Pettersson, K.; Warner, M. y Gustafsson, J.A. (2001). *Mechanisms of estrogen action*. Physiol. Rev. 81:1535–1565.
- Nomina Histologica. International Committee on Veterinary Histological Nomenclature, 2nd ed. New York: Cornell; 1994. p 38.
- Odore, R.; Re G.; Badino P.; Donn A.; Vigo D.; Biolatti B. y Girardi C. (1999). *Modifications of receptor concentrations for adrenaline, steroid hormones, prostaglandin F2alpha and gonadotrofins in hypophysis and ovary of dairy cows with ovarian cysts*. Pharmacol. Res. 39: 297-304.
- Ogle, T.F.; Dai, D.; George, P. y Mahesh, V.B. (1998). *Regulation of the progesterone receptor and estrogen receptor in decidua basalis by progesterone and estradiol during pregnancy*. Biol Reprod 58:1188-1198.
- Ogle, T.F. (2002). *Progesterone-action in the decidual mesometrium of pregnancy*. Steroids 67:1-14
- Okada, A.; Sato, T.; Ohta, Y. y Iguchi, T. (2005) *Sex steroid hormone receptors in the developing female reproductive tract of laboratory rodents*. J. Toxicol. Sci. 30:75-89.

Opsomer, G.; P. Mijten; M. Coryn y A. De Kruif. (1996). *Post-partum anoestrus in dairy cows*. Vet Quart 18: 68-75.

Opsomer, G.; T. Wensing; H. Laevens; M. Coryn y A. De Kruif. (1999). *Insulin resistance: the link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows?* Anim. Reprod. Sci. 56:211-222.

Ortega, H.H.; Lorente, J.A.; Mira, G.A.; Baravalle, C.; Salvetti, N.R. (2004) *Constant light exposure cause dissociation in gonadotrophins secretion and inhibits partially neuroendocrine differentiation of Leydig cells in adult rats*. Reprod. Domest. Anim. 39:417-423.

Ortega H. H.; Salvetti N.R.; Müller L.A.; Amable P.; Lorente J.A; Barbeito C.G. y Gimeno E.J. (2007a). *Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with Cystic Ovarian Disease*. J. Comp. Pathol. 136: 222-230.

Ortega H.H.; Amable P.; Salvetti N.R.; Dallard B.E.; Baravalle C.; Barbeito C. G. y Gimeno E.J. (2007b). *Intraovarian localization of growth factors in induced cystic ovaries in rats*. Anat. Histol. Emryol. 36: 94-102.

Ortega, H.H.; Stangaferro, M.L.; Salvetti, N.R.; Arcangelo, D. y Palomar, M.M. (2007c) *Estudio del balance proliferación/apoptosis en estructuras foliculares de bovinos con enfermedad quística ovárica inducida experimentalmente*. Medicina (Supl III) 67:185.

Ortega H.H.; Palomar M.M.; Acosta J.C.; Salvetti N.R.; Dallard B.E.; Lorente J.A; Barbeito C.G. y Gimeno E.J. (2008). *Insulin-like growth factor I in ovarian follicles and follicular fluid from cows with spontaneous and induced Cystic Ovarian Disease*. Res. Vet. Sci. 84: 419-427.

Paech, K.; Webb, P.; Kuiper, G.G.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.; Kushner, P.J. y Scanlan, T.S. (1997). *Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites*. Science. 277:1508-1510.

Palomar M.M.; Acosta J.C.; Salvetti N.R.; Müller L.A.; Taboada A.F.; Manzini R.A.; Ortega H.H. (2007). *Valoración de la exposición a luz permanente como modelo de enfermedad quística ovárica (COD) en bovinos*. Rev. Med. Vet. 87: 223-226.

- Parrott, J.A. y Skinner, M.K. *Developmental and Hormonal Regulation of Keratinocyte Growth Factor Expression and Action in the Ovarian Follicle*. *Endocrinology* 139: 228–235, 1998.
- Pederson, T. (1970). *Follicular kinetics in the ovary of the cyclic mouse*. *Acta Endocrinol.* 64:304-323.
- Pelletier, G.; Labrie, C. y Labrie, F. (2000). *Localization of oestrogen receptor α , oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs* J. *Endocrinol.* 165:359-370.
- Perrone, M.S.; Peter A.T. y Asem E. K. (1995). *Fibronectins: role in reproduction and future applications*. *Assist. Reprod. Technol. Androl.* 7: 103:125.
- Peter, A. T. (2004). *An update on cystic ovarian degeneration in cattle*. *Reprod. Domest. Anim.* 39:1-7.
- Peter, A.T. y Dhanasekaran N. (2003). *Apoptosis of granulosa cells: a review on the role of MAPK-signalling modules*. *Reprod. Domest. Anim.* 38: 209-213.
- Pettersson, K.; Grandien, K.; Kuiper, G.G.; Gustafsson, J.A. (1997). *Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor α* . *Mol. Endocrinol.* 11:1486-1496.
- Pursley, J. R., Mee M. O., y Wiltbank M.C. (1995). *Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF (2-alpha), and GnRH*. *Theriogenology* 44:915-923.
- Quirk, S.M.; Cowan, R.G.; Harman, R.M.; Hu, C.L. y Porter, D.A. (2004). *Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival*. *J. Anim. Sci.* 82:E40-E52.
- Rao, M.C.; Midgley, A.R. Jr. y Richards, J.S. (1978). *Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation*. *Cell* 14:71-78.
- Redmer, D.A. y Reynolds L.P. (1996) *Angiogenesis in the ovary*. *Rev. Reprod.* 1: 182–192.
- Refsal, K.R.; Jarrin-Maldonado, J.H. y Nachreiner, R.F. (1987). *Endocrine profiles in cows with ovarian cysts experimentally induced by treatment with exogenous estradiol or adrenocorticotrophic hormone*. *Theriogenology* 28: 871-889.

- Refsal, K.R.; Jarrin-Maldonado J.H. y Nachreiner R.F. (1988) *Basal and estradiol-induced release of gonadotrofins in dairy cows with naturally occurring ovarian cysts*. Theriogenology 30: 679.
- Rey, F.; Rodríguez, F.M.; Salvetti, N.R.; Palomar, M.M.; Barbeito, C.G. y Ortega, H.H. (2009). *Role of the Insulin-like Growth Factor-II and Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in Bovine Cystic Ovarian Disease*. J Comp. Pathol. En Evaluación.
- Ribadu, A.Y.; Nakada, K.; Tanaka, Y.; Moriyoshi, M.; Zhang, W.C.; Nakao, T. (1999). *Lack of LH response to exogenous estradiol in heifers with ACTH-induced ovarian follicular cysts*. J. Vet. Med. Sci. 61:979-981.
- Ribadu, A.Y.; Nakada K.; Moriyoshi M.; Zhang W.C.; Tanaka Y.y Nakao T. (2000). *The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers*. Anim. Reprod. Sci. 64:21-31.
- Richards, J.S. (1978). *Hormonal control of follicular growth and maturation in mammals*. In: Jones RE (ed.) *The Vertebrate Ovary: Comparative Biology and Evolution*. New York: Plenum Press. P 331-360.
- Richards, J.S. (1994). *Hormonal control of gene expression in the ovary*. Endocr. Rev. 15:725-751.
- Richards, J.S.; Kirchick, H.J. (1984). *Changes in the content and phosphorylation of cytosol proteins in luteinizing ovarian follicles and corpora lutea*. Biol. Reprod. 30:737-751.
- Richards, J.S.; Hedin, L. y Caston, L (1986). *Differentiation of rat ovarian cells: evidence for functional luteinization*. Endocrinology 118:1660-1668.
- Richards, J.S., Russell, D.L., Ochsner, S., Hsieh, M., Doyle, K.H.H., Falender, A.E., Lo, Y.K., Sharma, S.C. (2000). *Novel Signaling Pathways That Control Ovarian Follicular Development, Ovulation, and Luteinization*. Endocrine 1:195-220.
- Rivera, G.M. y Fortune, J.E., (2003) *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: 437–446.

- Roberts, S. J. (1986). *Hormonal disturbances resulting in infertility: cystic ovaries*. In: S.J. Roberts Ed. *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases*, 3rd Ed., Woodstock, Vt, pp. 478-514.
- Robker, R.L. y Richards, J.S. (1998). *Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27KIP1*. *Mol. Endocrinol.* 12: 924-940.
- Robles, R.; Tao, X.J.; Trbovich, A.M.; Maravel, D.V.; Nahum, R.; Perez, G.I.; Tilly, K.I. y Tilly, J.L. (1999) *Localization, regulation and possible consequences of apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) expression in granulosa cells of the mouse ovary*. *Endocrinology* 140:2641-2644.
- Rosenfeld, C.S.; Yuan, X.; Manikkam, M.; Calder, M.D.; Garverick, H.A.; Lubahn, D.B. (1999). *Cloning, sequencing, and localization of bovine estrogen receptor-beta within the ovarian follicle*. *Biol. Reprod.* 60: 691-697.
- Rosenfeld, C.S.; Wagner, J.S.; Roberts, R.M.; Lubahn, D.B. (2001). *Intraovarian actions of oestrogen*. *Reproduction* 122:215-226.
- Roy, S.K.; Kole, A.R. (1995). *Transforming growth factor- β receptor type II expression in the hamster ovary: cellular site(s), biochemical properties, and hormonal regulation*. *Endocrinology* 136:4610-4620.
- Rutter, B. y Russo A.F. (2000). *Enfoques sobre la Dinámica, el Diagnóstico y el Tratamiento de los quistes ováricos en el Bovino*. Centro Editor Dr. Edgardo Segismundo Allignani, Santa Fe, Argentina, pp. 37.
- Salveti, N.R.; Canal A.M.; Gimeno E.J. y Ortega H.H. (2003). *Histochemical study of the extracellular matrix components in the follicular wall of induced polycystic ovaries*. *Braz. J. Morphol. Sci.* 20: 93-100.
- Salveti, N.R.; Gimeno E.J.; Lorente J.A. y Ortega H.H. (2004). *Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts*. *Cells Tissues Organs* 178: 117-125.
- Salveti, N.R.; Muller, L.A.; Acosta, J.C.; Gimeno, J.E. y Ortega, H.H. (2007). *Estrogen receptors α and β and progesterone receptors in ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease*. *Vet. Pathol.* 44:373-378.

- Salveti, N.R.; Baravalle, C.; Mira, G.A.; Gimeno, E.J.; Dallard, B.E.; Rey, F. y Ortega, H.H. (2009a). *Heat shock protein 70 and sex steroid receptors in the follicular structures of induced ovarian cysts*. *Reprod. Domest. Anim.* En prensa.
- Salveti, N.R., Panzani, C.G., Gimeno, E.J., Neme, L.G., Alfaro, N.S. y Ortega, H.H. (2009b). *An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* DOI 10.1186/1477-7827-7-68.
- Saunders, P.T.K.; Maguire, S.M.; Gaughan, J. y Millar, M.R. (1997). *Expression of oestrogen receptor beta (ER β) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry*. *J. Endocrinol.* 154:R13-R16.
- Schams, D.; Kohlenberg, S.; Amselgruber, W.; Berisha, B.; Pfaffl, M.W. y Sinowatz, F. (2003). *Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution*. *J. Endocrinol.* 177:305-317.
- Schreiber JR, Nakamura K y Erickson GF (1982). *Rat ovary glucocorticoid receptor: identification and characterization*. *Steroids* 39: 569-584.
- Sharma, S.C.; Clemens, J.W.; Pisarska, M.D. y Richards, J.S. (1999). *Expression and function of estrogen receptor subtypes in granulosa cells: regulation by estradiol and forskolin*. *Endocrinology* 140:4320-4334.
- Sharma, S.P. (1998) *Surgical treatment of unilateral cystic ovary in a Friesian cow - Clinical case report*. *Ind. Vet. J.* 75:161-162.
- Shirwalkar, H.; Deepak, N.; Modi D.N. y Maitra A. (2007). *Exposure of adult rats to estradiol valerate induces ovarian cyst with early senescence of follicles*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 272: 22-37.
- Silva, J.R.V; Figueiredo J.R. y Van den Hurk, R. (2009) *Involvement of growth hormone (GH) and insulin-growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis*. *Theriogenology* 71: 1193-1208.
- Silvia, W.J.; Hatler, T.B.; Nugent, A.M. y Laranja Da Fonseca, L.F. (2002). *Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis*. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23:167-177.

- Sirois, J. y J. E. Fortune. (1988). *Ovarian follicular dynamics during estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography*. Biol. Reprod. 39: 308-317.
- Slot, K.A.; Voorendt, M.; De Boer-Brouwer, M.; Van Vugt, H.H. y Teerds, K.J. (2006). *Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary*. J. Endocrinol. 188:179-192.
- Stoebel, D.P. y Moberg G.P. (1982). *Effect of adrenocorticotrophin and cortisol on luteinizing hormone surge and estrous behavior of cows*. J. Dairy Sci. 65: 1016-1024.
- Svensson, E.C.; Markstrom, E.; Andersson, M. y Billig H. (2000). *Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotrofin*. Biol. Reprod. 63:1457-1464.
- Taft, R.; Ahmad, N. y Inskeep, E.K. (1996). *Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle*. J. Anim. Sci. 74:2985-2991.
- Thièry, J. C. y Martin G. B. (1991). *Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep--a review*. Reprod. Fertil. 3:137-173.
- Tilly, J.L. (1996) *Apoptosis and ovarian function*. Rev. Reprod. 1:162-72.
- Tung, L.; Mohamed, M.K.; Hoeffler, J.P.; Takimoto, G.S. y Horwitz, K.B. (1993). *Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors*. Mol. Endocrinol. 7:1256-1265.
- Uilenbroek, J.Th.J. y Richards, J.S. (1979). *Ovarian follicular development during the rat estrous cycle: gonadotrofin receptors and follicular responsiveness*. Biol. Reprod. 20:1159-1165.
- Ulbrich, S.E.; Kettler, A. y Einspanier, R. (2003). *Expression and localization of estrogen receptor α , estrogen receptor β and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro*. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 84, 279-289.
- Umayahara, Y.; Kawamori, R.; Watada, H.; Imano, E.; Iwama, N.; Morishima, T.; Yamasaki, Y.; Kajimoto, Y.; Kamada, T. (1994). *Estrogen regulation of the insulin-like*

growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. J. Biol. Chem. 269:16433-16442.

Van Den Broeck, W.; Coryn, M.; Simoens, P.; Lauwers. H. (2002a) *Cell-specific distribution of oestrogen receptor-alpha in the bovine ovary.* Reprod. Dom. Anim. 37: 291-293

Van den Broeck, W.; D'haeseleer, M.; Coryn, M. y Simoens, P. (2002b) *Cell-specific distribution of progesterone receptors in the bovine ovary.* Reprod. Domest. Anim. 37:314-320.

Vanholder T.; G. Opsomer y A. De Kruif. (2006) *Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review.* Reprod. Nutr. Develop. 46:105-119.

Vegeto, E.; Shabaz, M.M.; Wen, D.X.; Goldman, M.E.; O'malley, B.W. y McDonnell, D.P. (1993). *Human progesterone receptor A form is a cell and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function.* Mol. Endocrinol. 7:1244-1255.

Wang, H.; Masironi, B.; Eriksson, H. y Sahlin, L. (1999). *A comparative study of estrogen receptors α and β in the rat uterus.* Biol. Reprod. 61:955-964.

Wang, H.; Eriksson, H. y Sahlin, L. (2000). *Estrogen receptors α and β in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle.* Biol. Reprod. 63:1331-1340.

Wang, J. y Roy, S.K. (2004) *Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle stimulating hormone.* Biol Reprod 70(3): 577-85.

Wei, L.L. y Miner, R.S. (1994). *Evidence for a third progesterone receptor isoform in human breast cancer cells, T47D.* Cancer Res. 54:340-343

Wen, D.X. ; Xu, Y.F. ; Mais, D.E. ; Goldman, M.E. y McDonnell, D.P. (1994). *The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells.* Mol. Cell. Biol. 14:8356-8364.

Wiltbank, J.N.; Tyler, W.J. y Casida, L.E. (1953). *A study of atretic large follicles in six sire-groups of Holstein-Friesian cows.* J. Dairy Sci. 36:1077-82.

Woods, A. y Ellis, C.R. (1994). *Laboratory Histopathology. A Complete Reference.* Longman Group Limited. Londres.

- Woosley, J.T. (1991). *Measuring cell proliferation*. Arch. Pathol. Lab. Med. 115:555-557.
- Yacobi, K.; Wojtowicz, A.; Tsafiriri, A. y Gross, A. (2004) *Gonadotrofins enhance caspase-3 and -7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture*. Endocrinology, 145:1943-1951.
- Yamauchi, N.; Takezawa T; Kizaki, K.; Herath, C.B. y Hashizume, K. (2003). *Proliferative Potential of endometrial Stromal Cells, and endometrial and Placental Expression of Cyclin in the Bovine*. J. Reprod. Devel. 49:553-560.
- Yang, P.; Kriatchko, A. y Shyamal, R. (2002). *Expression of ER- α and ER- β in the Hamster Ovary: Differential Regulation by Gonadotrofins and Ovarian Steroid Hormones*. Endocrinology 143:2385-2398.
- Yoshioka K.; Iwamura S. y Kamomae H. (1998). *Changes of ovarian structures, plasma LH, FSH, progesterone and estradiol-17 beta in a cow with ovarian cysts showing spontaneous recovery and relapse*. J. Vet. Med. Sci. 60:257-260.
- Youngquist, R. S. y W. F. Braun Jr. 1986. *Management of infertility in the cow*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 189: 411-414.
- Zaied, A.A.; Garverick, H.A.; Kesler, D.J.; Bierschwal, C.J.; Elmore, R.J. y Youngquist R.S. 1981. *Luteinizing hormone response to estradiol benzoate in cows with ovarian cyst*. Theriogenology 16: 349.
- Zulu, V.C. y Penny C. (1998). *Risk Factors of Cystic Ovarian Disease in Dairy Cattle*. J. Reprod. Physiol. 44: 191-195.
- Zwijnsen, R.M.L.; Wientjens, E.; Klompmaker, R.; Van Der Sman, J.; Bernards, R. y Michalides, R.J.A.M. (1997). *CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1*. Cell 88:405-415.
- Zwijnsen, R.M.L.; Buckle, R.S.; Hijmans, E.M.; Loomans, C.J.M. y Bernards, R. (1998) *Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1*. Genes Dev. 12:3488-3498

8- PUBLICACIONES

Artículos directamente relacionados con el tema de la tesis doctoral:

- Salvetti NR, Muller LA, Acosta JC, Gimeno JE, Ortega HH. 2007. Estrogen Receptors α and β and Progesterone Receptors in Ovarian Follicles of Cows with Cystic Ovarian Disease. *Veterinary Pathology*. 44:373-378.
- Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. 2007. Revisión: Enfermedad Quística Ovárica Bovina. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias*. 6: 71-86.
- Stangaferro ML, Salvetti NR, Alfaro NS, Palomar MM, Rey F, Gimeno EJ, Ortega HH. 2009. Cell proliferation and survival mechanisms underlying the abnormal persistence of follicular cysts in bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Enviado*.

Artículos parcialmente relacionados con el tema de la tesis doctoral (otros aspectos de la COD en el bovino y otros modelos experimentales de la enfermedad):

- Salvetti NR, Canal AM, Gimeno EJ, Ortega HH. 2003. Histochemical study of the extracellular matrix components in the follicular wall of induced polycystic ovaries. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*. 20(1):93-100.
- 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(2):117-125.
- Salvetti NR, Canal AM, Gimeno EJ, Ortega HH. 2004. Polycystic Ovarian Syndrome: temporal characterization of the induction and reversion process in an experimental model. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 41: 389-395.
- Baravalle C, Salvetti NR, Mira GA, Pezzone N, Ortega HH. 2006. Microscopic Characterization of Follicular Structures in Letrozole -Induced Polycystic Ovarian Syndrome in the Rat. *Archives of Medical Research*. 37: 830-839.
- Ortega HH, Amable P, Salvetti NR, Dallard BE, Baravalle C, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2007. Intraovarian localization of growth factors in induced cystic ovaries in rats. *Anatomia Histologia Embryologia*. 36: 94-102.
- Baravalle C, Salvetti NR, Mira GA, Lorente JA, Ortega HH. 2007. Role of ACTH in the pathogenesis of Polycystic Ovarian Syndrome in the rat: hormonal profiles and ovarian morphology. *Physiological Research*. 56: 67-78.
- Ortega HH, Salvetti NR, Müller LA, Amable P, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2007. Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with Cystic Ovarian Disease. *Journal of Comparative Pathology*. 136:222-230.
- Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Müller LA, Taboada AF, Mazzini RA, Ortega HH. 2007. Valoración de la exposición a luz permanente como modelo de enfermedad quística ovárica (COD) en bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria*. 87:223-226.
- Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Barberis F, Beldomenico PM, Ortega HH. 2008. Treatment of Cystic Ovarian Disease with Naloxone in High Production Dairy Cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 31: 184-186.

- Ortega HH, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, Barbeito C, Gimeno EJ. 2008. Insulin-like growth factor I in ovarian follicles and follicular fluid from cows with spontaneous and induced Cystic Ovarian Disease. *Research in Veterinary Science*. 84: 419-427.
- Francou M, Durdos M, Salvetti NR, Baravalle C, Rey F, Ortega HH. 2008. Characterization of pituitary cell populations in rats with induced polycystic ovaries. *Cells, Tissues and Organs*. 188: 310-319.
- Salvetti NR, Baravalle C, Mira GA, Gimeno EJ, Dallard BE, Rey F, Ortega HH. 2009. Heat shock protein 70 and sex steroid receptors in the follicular structures of induced ovarian cysts. *Reproduction in Domestic Animals*. 44:805-814.
- Ortega HH, Salvetti NR, Padmanabhan V. 2009. Developmental programming: prenatal androgen excess disrupts ovarian steroid receptor balance. *Reproduction* 137:865-877.
- Zurvarra FM, Salvetti NR, Ian Mason J, Velazquez MML, Alfaro NS, Ortega HH. Disruption in the Expression and Immunolocalization of Steroid Receptors and Steroidogenic Enzymes in Letrozole-induced Polycystic Ovaries in Rat. *Reproduction, Fertility and Development*. 21: 827-839.
- Salvetti NR, Panzani CG, Gimeno EJ, Neme LG, Alfaro NS, Ortega HH. 2009. An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats. *Reproductive Biology and Endocrinology* DOI 10.1186/1477-7827-7-68.
- Velázquez MML, Alfaro NS, Dupuy C; Salvetti NR; Rey F, Ortega HH. 2009. Heat shock protein patterns in the bovine ovary and their relation with cystic ovarian disease. *Animal Reproduction Science*. DOI:10.1016/j.anireprosci.2009.08.010. En Prensa.
- Rey F, Rodríguez FM, Salvetti NR, Palomar MM, Barbeito CG, Ortega HH. 2009. Role of the Insulin-like Growth Factor-II and Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in Bovine Cystic Ovarian Disease. *Journal of Comparative Pathology*. En Prensa.
- Amweg AN, Paredes A, Salvetti NR, Lara HE, Ortega HH. Constitutive expression of melanocortin receptors in the bovine ovary. *Domestic Animal Endocrinology*. Enviado.