



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS
MENCIÓN: SALUD ANIMAL

**QUISTES FOLICULARES OVÁRICOS:
CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE
LAS ESTRUCTURAS OVÁRICAS EN UN MODELO
EXPERIMENTAL.**

AUTORA: Vet. Natalia Raquel Salvetti

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MASTER SCIENTIAE EN CIENCIAS VETERINARIAS**

Esperanza, 01 de noviembre de 2007



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS
MENCIÓN: SALUD ANIMAL

**QUISTES FOLICULARES OVÁRICOS:
CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE
LAS ESTRUCTURAS OVÁRICAS EN UN MODELO
EXPERIMENTAL.**

AUTORA: VET. NATALIA RAQUEL SALVETTI

DIRECTOR: DR. HUGO HÉCTOR ORTEGA

CO-DIRECTOR: DR. EDUARDO JUAN GIMENO

JURADO: Dr. Jorge Guillermo Ramos

Dr. Javier Eduardo Sarradell

M.Sc. Ana María Canal

Esperanza, 01 de noviembre de 2007

*La vida es una serie de colisiones con el futuro;
no es una suma de lo que hemos sido,
sino de lo que anhelamos ser.*
Ortega y Gasset (1883-1955)

*Dedico este trabajo a mi madre que me enseñó a no bajar nunca los brazos y
a mi padre de quien heredé esta pasión por investigar.*

A mi compañero, amigo y gran amor: 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 los alumnos pasantes del Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por su ayuda desinteresada para el mantenimiento y manejo de los animales que utilicé.

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

A los 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	vii
SUMMARY	viii
I- INTRODUCCIÓN	1
I.1. Enfermedad Quística Ovárica.....	1
I.2. Hipótesis.....	5
I.3. Objetivos.....	5
I.3.1. General.....	5
I.3.2. Específicos.....	5
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
II. 1. Desarrollo folicular.....	9
II. 2. Factores involucrados en la foliculogénesis.....	14
II. 3. Atresia folicular.....	14
II. 4. Regulación de la Foliculogénesis.....	16
II. 5. Matriz Extracelular Ovárica.....	19
II.5.1. Fibras.....	19
II.5.2. Glicosaminoglicanos (GAGs).....	21
II.5.2.1. <i>Regulación de la síntesis de proteoglicanos por las gonadotropinas</i>	23
II.5.2.2. <i>Funciones de los proteoglicanos en el folículo ovárico</i>	24
II. 6. Citoesqueleto.....	24
II. 7. Balance Proliferación/Apoptosis.....	28
II. 7. 1. Proliferación celular en el ovario.....	28
II.7.1.1. <i>Mecanismos de control del ciclo celular en el ovario</i>	31
II. 7. 1.2. <i>Marcadores de proliferación celular</i>	32
II.7.2. Apoptosis.....	34
II. 8. Receptores hormonales esteroides y proteínas relacionadas.....	35
II. 8.1. Receptores hormonales esteroides.....	35
II. 8.1.1. <i>Progesterona</i>	36
II. 8.1.2. <i>Estrógenos</i>	37

II. 8.2. Proteínas de golpe de calor (Heat Shock Protein: HSPs).....	41
II.9. Enfermedad quística ovárica.....	44
III- MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
III.1. Modelo experimental.....	47
III.2. Determinación de la ciclicidad ovárica.....	47
III.3. Toma y Procesamiento de las muestras para las técnicas histológicas.....	48
III.4. Toma y Procesamiento de las muestras para Western Blot.....	49
III.5. Técnicas histoquímicas.....	50
III.5.1. Picrosirius.....	50
III.5.2. PAS (Ácido periódico – Reactivo de Schiff).....	51
III.5.3. Alcian blue a concentraciones electrolíticas críticas.....	51
III.5.4. Método de resorcina-fucsina de Weigert.....	52
III.6. Evaluación de la proliferación celular.....	53
III.7. Evaluación de la diferenciación celular.....	54
III.8. Evaluación de la apoptosis.....	55
III.8.1. Proteínas relacionadas con la apoptosis.....	55
III.8.2. TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labelling).....	56
III.9. Receptores Esteroides.....	57
III.9.1. Inmunohistoquímica.....	57
III.9.2. Western Blot.....	57
III.10. Análisis de los resultados.....	60
III.11. Evaluación Estadística.....	61
IV- RESULTADOS.....	63
IV.1. Caracterización morfológica.....	63
IV.2. Matriz extracelular ovárica.....	64
IV.2.1. Organización y cuantificación del colágeno.....	64
IV.2.2. Distribución del sistema de fibras elásticas.....	65
IV.2.3. Cuantificación de PAS.....	66
IV.2.4. Cuantificación de Alcian Blue.....	67
IV.3. Evaluación de la diferenciación celular.....	68
IV.4. Evaluación de la proliferación celular.....	73
IV.5. Evaluación de la apoptosis celular.....	74
IV.5.1. Proteínas relacionadas con la apoptosis detectadas por inmunohistoquímica.....	74
IV.5.1.1. <i>Bax</i>	74
IV.5.1.2. <i>Bcl-2</i>	76
IV.5.1.3. <i>Caspasa-3 activa</i>	77
IV.5.2. Detección <i>in situ</i> de la apoptosis (TUNEL).....	78

IV.6. Expresión de receptores hormonales y proteínas de golpe de calor.....	80
IV.6.1. Receptores de estrógenos.....	80
IV.6.1.1. Receptores de estrógenos α	80
IV.6.1.1.1. Inmunohistoquímica.....	80
IV.6.1.1.2. Western blot.....	82
IV.6.1.2. Receptores de estrógenos β	83
IV.6.1.2.1. Inmunohistoquímica.....	83
IV.6.1.2.2. Western blot.....	86
IV.6.2. Receptores de progesterona.....	86
IV.6.2.1. Inmunohistoquímica.....	86
IV.6.2.2. Western blot.....	89
IV.6.3. Proteína de Golpe de calor 70 (HSP70).....	90
IV.6.3.1. Inmunohistoquímica.....	90
IV.6.3.2. Western blot.....	92
IV.7. Niveles Hormonales.....	93
IV.7.1. LH.....	93
IV.7.2. FSH.....	93
IV.7.3. Estrógenos.....	93
IV.7.4. Progesterona.....	94
IV.7.5. Testosterona.....	94
V- DISCUSIÓN	97
V.1. Inducción de la COD en ratas.....	97
V.2. Cambios en la matriz extracelular ovárica en los quistes foliculares.....	97
V.3. Diferenciación celular en los folículos quísticos de animales con COD.....	99
V.3. Balance proliferación/apoptosis en los folículos ováricos quísticos.....	102
V.4. Expresión de receptores hormonales y proteínas relacionadas.....	107
VI- CONCLUSIONES	115
VII-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

ABREVIATURAS UTILIZADAS

μm	micrómetros
3-β-HSD	3-β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BrdU	Bromodeoxyuridina
cdk	quinasas dependientes de ciclinas
CKs	Citoqueratinas
COD	Enfermedad quística ovárica
DAB	Diaminobencidina
DBD	Dominio de unión al ADN
DE	Desvío estándar
DES	Desmina
DHEA	Dehidroepiandrosterona
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos
FGF-2	Factor de crecimiento fibroblástico-2
FSH	Hormona foliculoestimulante
GAGs	Glicosaminoglicanos
GC	Grupo control
GFAP	Proteína ácida gliofibrilar
GL	Grupo luz permanente
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
hCG	Gonadotropina coriónica humana
hs.	horas
HSPs	Proteínas de golpe de calor
IGF-1	Factor de crecimiento análogo a insulina-1
IHCSA	Área marcada con inmunohistoquímica
KO	KnockOut

LBD	Dominio de unión al ligando
LDL	Lipoproteínas de bajo peso molecular
LH	Hormona luteinizante
MEC	Matriz Extracelular
MgCl	Cloruro de magnesio
NF	Neurofilamentos
NF	Neurofilamento
NGF	Factor de crecimiento nervioso
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	buffer fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
RE	Receptor de Estrógenos
REα	Receptor de estrógenos α
REαKO	REα Knock Out
REβ	Receptor de estrógenos β
REβKO	REβ Knock Out
RP	Receptor de progesterona
RPAKO	RPA Knock Out
RPBKO	RPB Knock Out
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa
TGF-α	Factor de crecimiento transformante-α
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling.
VIM	Vimentina
α-SMA	α-actina del músculo liso

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Tipos de GAGs (Gartner y Hiatt, 1997).....	21
Tabla 2.	Clasificación de las diferentes categorías de folículos ováricos de rata (basado en la Nomina Histológica, 1994).....	49
Tabla 3.	Identificación de distintos glucosaminoglicanos a través de la coloración con Alcian Blue a concentraciones electrolíticas críticas.....	52
Tabla 4.	Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.....	55
Tabla 5.	Estándares de PM para SDS-PAGE, amplio espectro. BIO-RAD.....	58
Tabla 6.	Anticuerpos utilizados en la técnica de Western Blot.....	59
Tabla 7.	Cuantificación de la densidad óptica en técnicas histoquímicas en distintas áreas de la pared folicular. (Media +/- DE).....	68
Tabla 8.	Distribución de proteínas inmunoreactivas en la pared folicular ovárica de ratas tratadas y normales.....	69
Tabla 9.	Porcentaje de proliferación celular evaluado con PCNA en folículos terciarios normales y terciarios y quísticos en animales con COD.....	73
Tabla 10.	Área marcada por inmunohistoquímica (IHCSA) para la proteína Bax en las distintas capas de folículos de animales con COD y normales (Media +/- DE).....	75
Tabla 11.	IHCSA de la proteína Bcl-2 en las distintas capas foliculares de animales de GC y GL (Media +/- DE).....	76
Tabla 12.	Porcentaje de células marcadas con caspasa-3 en las distintas capas foliculares en las diferentes categorías de folículos en animales control y con COD (Media +/- DE).....	77
Tabla 13.	Porcentaje de células apoptóticas detectadas <i>in situ</i> mediante TUNEL en las capas foliculares en ovarios de animales normales vs animales con COD (Media +/- DE).....	79
Tabla 14.	Porcentaje de área inmunomarcada con RE α en la pared folicular en las diferentes categorías de folículos en crecimiento en GC y GL (Media +/-DE).....	81
Tabla 15.	Porcentaje de área inmunomarcada con RE β en la granulosa de la pared folicular en las diferentes categorías de folículos en crecimiento en GC y GL (Media +/-DE).....	84
Tabla 16.	Porcentaje de área inmunomarcada con RP en la pared folicular en las diferentes categorías de folículos en crecimiento en GC y GL (Media +/-DE).....	87
Tabla 17.	IHCSA con HSP70 en las distintas capas de la pared folicular en folículos de diferentes categorías en los GC y GL (Media +/- DE).....	91

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).....	13
Figura 2.	Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipofisario y el ovario. (Gartner y Hiatt, 1997).....	18
Figura 3.	Ciclo de división celular y sus marcadores. La replicación del ADN está confinada a la fase S del ciclo. La fase G1 está comprendida entre las fases M (mitosis) y S, en cambio G2 está comprendido entre S y M. La célula incorpora BrdU en la fase S, expresa Ki-67 desde el final de G1 hasta la M inclusive y expresa PCNA durante todo el ciclo de división celular encontrándose en la fase S su mayor concentración.....	33
Figura 4.	Estructura de los receptores hormonales nucleares. (Drummond et al., 2000).....	36
Figura 5.	Vista panorámica de un ovario de rata del GL. Se observan dos folículos quísticos completos y parte de un tercero.....	63
Figura 6.	Detalle de la pared folicular de un quiste de un animal con COD.....	63
Figura 7.	Pared folicular de un quiste coloreada con Picosirius alcalino visto en el microscopio de luz.....	65
Figura 8.	Pared folicular de un quiste coloreada con Picosirius alcalino visto en el microscopio de luz con polarización. La birrefringencia intensa se ve en la teca externa.....	65
Figura 9.	Pared de un folículo terciario coloreada con Picosirius alcalino visto en el microscopio de luz....	65
Figura 10.	Pared de un folículo quístico coloreada con Picosirius alcalino visto en el microscopio de luz.....	65
Figura 11.	Vaso sanguíneo coloreado con resorcina fucsina de Weigert sin oxidación (VS).....	66
Figura 12.	Pared folicular de un quiste coloreada con resorcina fucsina de Weigert sin oxidación.....	66
Figura 13.	Pared folicular de un folículo terciario con resorcina fucsina de Weigert con oxidación.....	66
Figura 14.	Pared folicular de un quiste coloreada con resorcina fucsina de Weigert con oxidación.....	66
Figura 15.	Pared de un folículo terciario coloreado con PAS. (G: granulosa, TI: teca interna, TE: teca externa).....	67
Figura 16.	Pared folicular de un quiste folicular coloreada con PAS. (G: granulosa, TI: teca interna, TE: teca externa).....	67
Figura 17.	Pared de un folículo terciario coloreado con Alcian Blue 0,3M. (G: granulosa).....	68
Figura 18.	Pared de un folículo quístico coloreado con Alcian Blue 0,3M. (G: granulosa).....	68
Figura 19.	Pared de un folículo atrésico del GC inmunomarcado para citoqueratinas.....	70
Figura 20.	Pared de un folículo atrésico del GC inmunomarcado para citoqueratinas.....	70
Figura 21.	Pared de un folículo terciario del GC inmunomarcado para citoqueratinas.....	70
Figura 22.	Pared de un folículo quístico del GL inmunomarcado para citoqueratinas.....	70
Figura 23.	Pared de un folículo atrésico de un animal control inmunomarcado para vimentina.....	71

Figura 24.	Pared de un folículo terciario de un animal control inmunomarcado para vimentina.....	71
Figura 25.	Pared de un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para vimentina.....	71
Figura 26.	Pared de un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para vimentina.....	71
Figura 27.	Pared de un folículo terciario de un animal control inmunomarcado para desmina.....	72
Figura 28.	Pared de un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para desmina.....	72
Figura 29.	Pared de un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para α -SMA.....	72
Figura 30.	Pared de un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para α -SMA.....	72
Figura 31.	Vaso sanguíneo inmunomarcado para α -SMA.....	72
Figura 32.	Pared de un folículo terciario del grupo control inmunomarcado para PCNA.....	73
Figura 33.	Pared de un folículo terciario del grupo con COD inmunomarcado para PCNA.....	73
Figura 34.	Pared de un folículo quístico del grupo COD inmunomarcado para PCNA.....	74
Figura 35.	Pared en un folículo terciario de un animal del grupo GC inmunomarcado para bax.....	75
Figura 36.	Pared en un folículo terciario de un animal del GL inmunomarcado para bax.....	75
Figura 37.	Pared en un folículo quístico de un animal del GL inmunomarcado para bax.....	75
Figura 38.	Pared en un folículo atrésico tipo II de un animal del GL inmunomarcado para bax.....	75
Figura 39.	Pared en un folículo terciario de un animal normal inmunomarcado para bcl-2.....	76
Figura 40.	Pared en un folículo terciario de un animal con COD inmunomarcado para bcl-2.....	76
Figura 41.	Pared en un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para bcl-2.....	77
Figura 42.	Pared en un folículo atrésico tipo I de un animal con COD inmunomarcado para bcl-2.....	77
Figura 43.	Pared en un folículo terciario de un animal normal inmunomarcado para caspasa-3 activa.....	78
Figura 44.	Pared en un folículo terciario de un animal con COD inmunomarcado para caspasa-3 activa.....	78
Figura 45.	Pared en un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para caspasa-3 activa.....	78
Figura 46.	Pared en un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para caspasa-3 activa.....	78
Figura 47.	Detección <i>in situ</i> de apoptosis en la pared en un folículo terciario de un animal control.....	79
Figura 48.	Detección <i>in situ</i> de apoptosis en la pared en un folículo atrésico tipo I de un animal control.....	79
Figura 49.	Detección <i>in situ</i> de apoptosis en la pared en un folículo atrésico tipo II de un animal control.....	80
Figura 50.	Detección <i>in situ</i> de apoptosis en la pared en un folículo quístico de un animal con COD.....	80
Figura 51.	Glándulas intersticiales de un ovario control marcadas para RE α	82
Figura 52.	Folículo secundario pequeño de un animal control inmunomarcado para RE α	82
Figura 53.	Pared de un folículo terciario de un animal control marcada para RE α	82

Figura 54.	Pared de un folículo quístico de un animal con COD marcada para RE α	82
Figura 55.	Niveles de marcación con RE α por inmunoblotting en muestras de ovarios completos de animales del GC y de GL.....	83
Figura 56.	Folículo secundario pequeño de un animal del GC marcado para RE β	85
Figura 57.	Folículo secundario mediano de un animal del GC marcado para RE β	85
Figura 58.	Folículo atrésico de un animal del GC marcado para RE β	85
Figura 59.	Pared de un folículo terciario de un animal del GC marcado para RE β	85
Figura 60.	Folículo primario de un animal del GL marcado para RE β	85
Figura 61.	Folículo secundario pequeño de un animal del GL marcado para RE β	85
Figura 62.	Pared folicular de un folículo terciario de un animal del GL marcado para RE β	86
Figura 63.	Pared de un folículo quístico de un animal del GL marcado para RE β	86
Figura 64.	Niveles de marcación con RE β por inmunoblotting en muestras de ovarios completos de animales del GC y de GL.....	87
Figura 65.	Folículo secundario mediano de un animal control marcado para RP.....	88
Figura 66.	Pared de un folículo terciario de un animal control marcado para RP.....	88
Figura 67.	Folículo atrésico tipo III avanzado de un animal control marcado para PR.....	88
Figura 68.	Pared de un folículo quístico de un animal con COD marcado para RP. Además se observa un folículo atrésico tipo III avanzado intensamente marcado.....	88
Figura 69.	Niveles de marcación para PR-B por inmunoblotting en muestras de ovarios completos de animales del GC y de GL.....	89
Figura 70.	Niveles de marcación para PR-A por inmunoblotting en muestras de ovarios completos de animales del GC y de GL.....	89
Figura 71.	Niveles de marcación para PR-C por inmunoblotting en muestras de ovarios completos de animales del GC y de GL.....	90
Figura 72.	Folículo secundario mediano de un animal control marcado para HSP-70.....	92
Figura 73.	Pared de un folículo terciario de un animal control marcado para HSP-70.....	92
Figura 74.	Folículo atrésico tipo II de un animal con COD marcado para HSP-70.....	92
Figura 75.	Pared de un folículo quístico de un animal con COD marcado para HSP-70.....	92
Figura 76.	Niveles de marcación para HSP70 por inmunoblotting en muestras de ovarios completos de animales del GC y de GL.....	93
Figura 77.	Niveles séricos de hormonas gonadotrópicas (LH y FSH) en animales del GC y del GL.....	94
Figura 78.	Niveles séricos de hormonas esteroideas (estrógenos y progesterona) en animales del GC y del GL.....	94
Figura 79.	Niveles séricos de testosterona en animales del GC y del GL.....	95

RESUMEN

El objetivo de la presente tesis fue validar un modelo experimental de la enfermedad quística ovárica en ratas e identificar las posibles alteraciones presentes en los ovarios de estos animales relacionadas con los componentes de la matriz extracelular, la diferenciación y balance apoptosis/proliferación celular y la expresión de receptores hormonales esteroides y proteínas relacionadas. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar que fueron colocadas en un ambiente con luz permanente por 15 semanas. Se utilizaron técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas y western blot. Los resultados muestran que los animales con la enfermedad presentaron ovarios con numerosos folículos distendidos y quísticos. Estos folículos presentaron niveles de proliferación y de apoptosis disminuidos con respecto a los folículos sanos. También se hallaron diferencias en la expresión de proteínas del citoesqueleto y en la expresión de receptores hormonales. Los receptores de estrógenos presentaron una relación alterada entre subtipos con respecto a los ovarios de los animales normales. Hubo una disminución en la inmunomarcación con RP en los folículos quísticos y se encontró una relación alterada en las isoformas estudiadas mediante western blot. Estos resultados concuerdan en parte con los hallados en la bibliografía en relación a la enfermedad que se presenta en los bovinos, por lo cual podemos concluir que el modelo utilizado es válido para el estudio de esta enfermedad.

Palabras Clave: enfermedad quística ovárica, rata, matriz extracelular, citoesqueleto, balance proliferación/apoptosis, receptores hormonales.

SUMMARY

The objective of the present thesis was to validate an experimental model of the ovarian cystic disease in rats and to identify the possible alterations presents in the ovaries of these animals related with the components of the extracelullar matrix, the cellular differentiation and balance apoptosis/proliferation, as well as the expression of steroids receptors and related proteins. Wistar rats were placed in an environment with permanent light for 15 weeks. Histochemical, immunohistochemical and Western blot techniques were used. The results show that the animals with the disease presented ovaries with numerous distended and cystic follicles. These follicles presented proliferation and apoptosis levels diminished with regard to the healthy follicles. It were also differences in the expression of cytoskeletal proteins and in the expression of hormonal receptors. The estrogen receptors presented an altered relationship among subtypes with regard to the ovaries of the normal animals. The same thing happened with the different isoforms of the progesterone receptor studied by means of western blot. These results agree partly with those found in the bibliography in relation to the illness that is presented in the bovine ones. We can conclude that the used experimental model is been worth for the study of this syndrome.

Keywords: ovarian cystic disease, rat, extracellular matrix, cytoskeletal proteins, proliferation/apoptosis balance, steroid receptors.

I- INTRODUCCIÓN

I- INTRODUCCIÓN

I.1. Enfermedad Quística Ovárica.

La enfermedad quística ovárica (cystic ovarian disease: COD) es uno de los trastornos reproductivos más comunes que ocurren en las vacas lecheras afectando entre el 6 y el 19% de las hembras vacunas en producción (Eyestone y Ax, 1984; Garverick, 1997; Silvia et al., 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 en disminución de la producción de leche y gastos veterinarios (Silvia et al., 2002; 2005). Por esto es que existen fuertes justificaciones económicas para desarrollar medidas preventivas y tratamientos para esta enfermedad.

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 et al., 1944; Garm, 1949; Casida y Chapman, 1951; Wiltbank et al., 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), gonadotropinas (Casida et al., 1944; Nakao et al., 1978), y, más recientemente GnRH (Kesler y Garverick, 1982; Nanda et al., 1988). Sin embargo, la

mayoría de estos tratamientos no poseían un sustento teórico adecuado (Silvia et al., 2002).

Si bien, la COD ha sido ampliamente estudiada en relación a su diagnóstico y tratamiento (Nanda et al., 1991; Opsomer et al., 1996; Christopher y Devanathan, 1997; Agarwal y Shankar, 1998; Sharma, 1998; Calder et al., 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 et al., 1998; Heuer et al., 1999; Ribadu et al., 1999,2000).

En los bovinos existen ciertos factores que facilitan el desarrollo de la enfermedad. Entre los factores predisponentes endógenos se encuentran en primer lugar una debilidad constitucional y la producción lechera elevada de algunas razas. Los quistes se observan con mayor frecuencia en vacas lecheras y en menor proporción en las dedicadas a la producción de carne, siendo una situación diagnosticada esporádicamente en este tipo de ganado, más común en las razas doble propósito. Son comúnmente observados en vacas de 5 a 7 años y raramente en vaquillonas. La COD generalmente aparece en animales de alta producción, en el pico de la lactancia, entre 1 y 4 meses luego del parto (Gasse et al., 1984; Grohn et al., 1994;1995). Dentro de los factores causales exógenos puede citarse un manejo nutricional inadecuado (excesivo uso de concentrados), como así también la alimentación insuficiente y el desbalance de minerales y vitaminas. Los animales con quistes ováricos se encuentran fundamentalmente en establecimientos de explotación intensiva. También tienen influencia el estabulado con las consiguientes deficiencias de ejercicio y luz, así como las influencias estacionales y climáticas (Erb y Martin, 1980; Grunert y Berchtold,

1988). Periódicamente los quistes ováricos ocurren en vacas o vaquillonas donantes en los programas de transferencia embrionaria, cuando han recibido hormona foliculoestimulante (FSH) o sus análogos, para la superovulación. Por otra parte, los estrógenos utilizados en diferentes tratamientos, se consideran causas desencadenantes. Además, según Dolezel et al., (1998) los progestágenos aplicados en el proestro, para sincronizar los ciclos estrales en los programas de inseminación artificial, también pueden provocar quistes ováricos. En ocasiones pueden aparecer quistes en vaquillonas de primer servicio o en hembras preñadas, debido a las características de crecimiento de las ondas foliculares en los bovinos.

La COD puede ser inducida en varias especies mediante tratamientos hormonales e inclusive mediante modificaciones en el ambiente tales como exposición a luz o a sonidos agudos por periodos prolongados de tiempo (Singh, 1969; Mahesh et al., 1987). Las especies que han sido utilizadas como modelos experimentales incluyen bovinos, ovinos, y animales de laboratorio tales como cobayos, hámsteres y ratas (Quandt y Hutz, 1993; Salvetti et al., 2004; Ortega et al., 2007). La utilización de animales de laboratorio en modelos experimentales de enfermedades permite el manejo de gran cantidad de animales en espacios reducidos así como un seguimiento estrecho de los eventos que ocurren en los mismos, cosa difícil de lograr en los grandes animales de granja.

En la rata (*Ratus norvegicus*) se han empleado diversos tratamientos para lograr la aparición de COD. Dentro de los tratamientos hormonales se han aplicado estrógenos (valerato de estradiol), (Baravalle et al, 2007) y andrógenos (dehidroepiandrosterona -DHEA- en animales adultos, androgenización neonatal mediante propionato de testosterona), (Anderson et al., 1997; Baravalle et al., 2007) se han utilizado drogas que

actúan inhibiendo enzimas (letrozol), (Baravalle et al., 2006) o bloqueando receptores hormonales (bloqueantes de receptores de progesterona: RU486); y se logró inducir la enfermedad exponiendo ratas a condiciones ambientales anormales (Salveti et al., 2004).

No obstante su eficacia, los tratamientos hormonales causan la aparición súbita de ovarios quísticos debido al disturbio en los procesos metabólicos y fisiológicos, lo que limita la validez de estos modelos. Se ha demostrado que la administración continua de estrógenos, como ocurre en el modelo de valerato de estradiol, lleva a una degeneración progresiva del núcleo arcuato hipotalámico, lo cual perjudica el estudio del eje hipotálamo-hipofisario (Martini, 1982; Brawer et. al, 1986). El tratamiento con andrógenos (DHEA) lleva a la presencia de metabolitos circulantes, que pueden interferir con los patrones de liberación de hormona luteinizante (LH) en el sistema nervioso central, lo cual limita las condiciones experimentales (Martini, 1982; Kalra y Kalra, 1983). Se ha descrito que los patrones hormonales y morfológicos observados en animales androgenizados no se correlacionan totalmente con los de la enfermedad quística ovárica, y por lo tanto, la androgenización, tampoco sería un modelo adecuado para su estudio (Jones et al., 1987).

La exposición a luz constante de ratas adultas causa ovarios quísticos en forma gradual y similar a lo que puede verse en la enfermedad idiopática y es el modelo menos invasivo. Las características anatómicas de los ovarios quísticos resultantes de este modelo son similares a los de la COD en humanos y otras especies (Mahajan, 1988; Baldissera et. al., 1991; Salvetti et al., 2004).

I.2. Hipótesis

Las ratas con enfermedad quística ovárica presentan alteraciones en los procesos celulares normales; tales como el balance proliferación/apoptosis, la diferenciación celular y la expresión de receptores hormonales que formarían parte de la etiopatogenia de esta enfermedad.

I.3. Objetivos

I.3.1. General

Validar un modelo experimental de la enfermedad quística ovárica, inducido con un método no invasivo, integrando varios métodos de estudio, para contribuir a una mejor comprensión de este síndrome en especies de interés zootécnico.

I.3.2. Específicos

a) Determinar las características histoquímicas de los quistes ováricos, a través de la valoración cualitativa y cuantitativa de los elementos que constituyen la matriz extracelular: las fibras, tanto elásticas como colágenas; y los constituyentes de la sustancia fundamental amorfa.

b) Evaluar el grado de proliferación y diferenciación celular en las diferentes estructuras tisulares de los ovarios de ratas con COD, analizando: antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y componentes del citoesqueleto (vimentina, desmina, citoqueratinas, neurofilamentos, proteína ácida gliofibrilar y α -actina) por inmunohistoquímica.

c) Valorar la apoptosis en las células que componen los folículos, a través de la detección por inmunohistoquímica de moléculas relacionadas (bax, bcl-2, caspasa-3) así como también por la técnica de TUNEL.

d) Realizar la evaluación de la inmunomarcación de receptores de estrógenos y progesterona en las diferentes células que constituyen la pared folicular tanto en ovarios quísticos como así también en ovarios normales.

e) Caracterizar mediante Western blot la expresión de las isoformas de los receptores de estrógenos y progesterona en los ovarios quísticos.

f) Identificar que tipos celulares de los que integran el folículo ovárico sufren modificaciones en la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos utilizados durante la transformación quística de los folículos.

g) Describir y comparar las características morfológicas e inmunohistoquímicas encontradas en el modelo experimental utilizado con respecto a lo descrito en la bibliografía para la enfermedad que ocurre en los bovinos.

II- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

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 del embrión incipiente y aseguran su implantación y desarrollo exitosos. Esta glándula varía morfológicamente entre especies, aunque básicamente está constituida por un parénquima en el cual se encuentran folículos en distintos estadios de desarrollo, folículos atrésicos, cuerpos lúteos y glándulas intersticiales, y un estroma formado por 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, 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, 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 (Dellmann, 1998).

II. 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. De acuerdo a lo establecido por la Nomenclatura Histológica los folículos se clasifican en: folículos primordiales, primarios, secundarios, terciarios y preovulatorios (Nomenclatura Histológica, 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 esta caracteriza al folículo terciario. 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 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 ovífero, 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 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 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 radiata (Dellmann y Eurell, 1998).

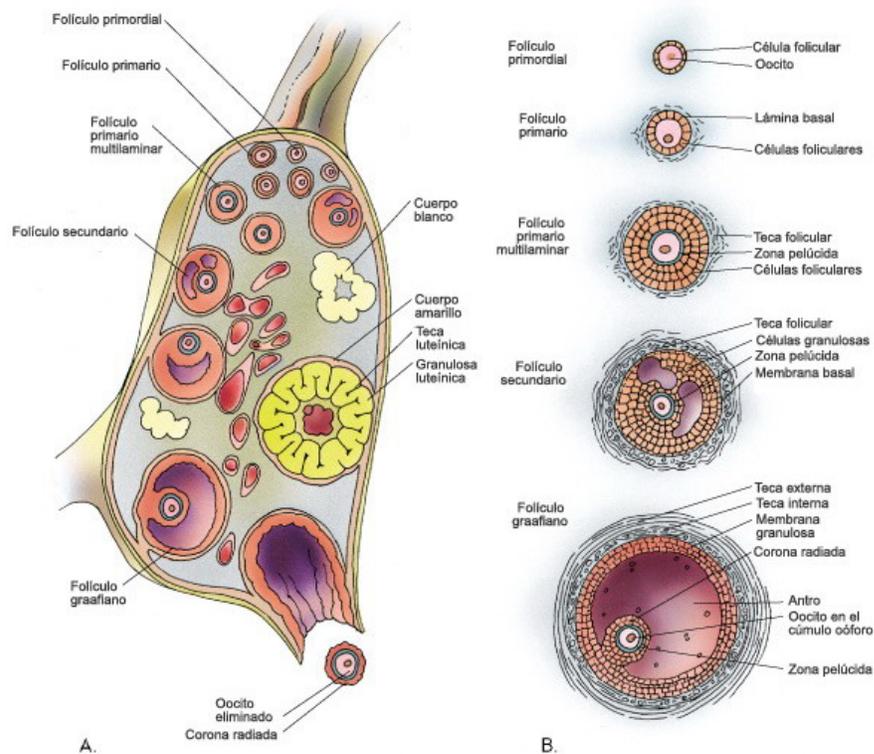


Figura 1. A- En este esquema se muestra un corte longitudinal de un ovario adulto en el cual se observan las distintas categorías de folículos en crecimiento, la ovulación, cuerpo lúteo y cuerpo blanco. B- Se muestran las principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento con sus componentes.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

Luego de la ovulación, las capas foliculares se reorganizan para convertirse en el cuerpo hemorrágico en 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).

II. 2. 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 reanudar la meiosis. De este modo, sólo un número de folículos sobrevivirá, mientras que el resto entrará en atresia (McGee y Hsueh, 2000).

II. 3. 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 et al., 1994; Quirk et

al., 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 et al., 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, ser humano) se hipertrofian y pasan a formar parte del parénquima ovárico como glándulas intersticiales capaces de secretar hormonas esteroideas, principalmente andrógenos (Quirk et al., 2004).

Desde el punto de vista morfológico, la atresia en los folículos terciarios puede dividirse en varios estadios (Greenwald y Roy, 1994; Hsueh et al., 1994):

- Estadio I: se caracteriza por un bajo número de células de granulosa (<10%) con núcleo picnótico cerca del antro folicular mientras otras células se encuentran en mitosis (Greenwald y Roy, 1994).

- Estadio II: se caracteriza por la presencia de varias células de granulosa picnóticas (10-30%), pocas células en mitosis y restos celulares en el antro. La membrana basal pierde integridad y existe infiltración de leucocitos en la capa de células granulosas (Hirshfield, 1988; Greenwald y Roy, 1994).

- Estadio III: se caracteriza por una reducción en el número de células de granulosa, ausencia de células en mitosis y un colapso del folículo. Las células de la teca se hipertrofian y contienen gotas de lípidos. También ocurren cambios histológicos como fragmentación de la membrana basal, presencia de núcleos picnóticos y una reducción masiva del volumen de células granulosas. Con respecto al ovocito, sufre ruptura de la vesícula germinal probablemente como resultado de los cambios ocurridos en células de granulosa. El degeneramiento que sufren las células de granulosa a medida que avanza la atresia posee todas las características de la muerte celular programada o apoptosis, la cual se detalla más adelante (Greenwald y Roy, 1994).

II. 4. Regulación de la Foliculogénesis

El sistema hipotálamo- hipófisis coordina el proceso que destina a un folículo a ovular mediante el control del ciclo estral en los animales. El factor 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 este factor 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 gonadotropas de la hipófisis anterior, que son las encargadas de sintetizar LH y FSH, y, tras su unión a receptores de alta afinidad expuestos en la membrana, estimula la liberación de las gonadotropinas. 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 gonadotropinas hipofisarias (Hillier, 2001).

La FSH y la LH comparten características estructurales y químicas similares. La biosíntesis y la secreción de las gonadotropinas están estrictamente reguladas a través del ciclo reproductivo. La expresión se encuentra regulada por factores hipotalámicos (GnRH), factores intrahipofisarios (principalmente los péptidos, la 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 gonadotropos. 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 del hipotálamo, gonadotropinas liberadas por la hipófisis y síntesis y secreción de hormonas ováricas, se lo denomina eje hipotálamo-hipófiso-ovárico (Figura 2), (Hillier, 2001).

El folículo ovárico en desarrollo sintetiza andrógenos y estrógenos. Estas hormonas actúan a nivel hipotálamo-hipofisario estimulando la secreción de gonadotropinas 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 gonadotropinas 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).

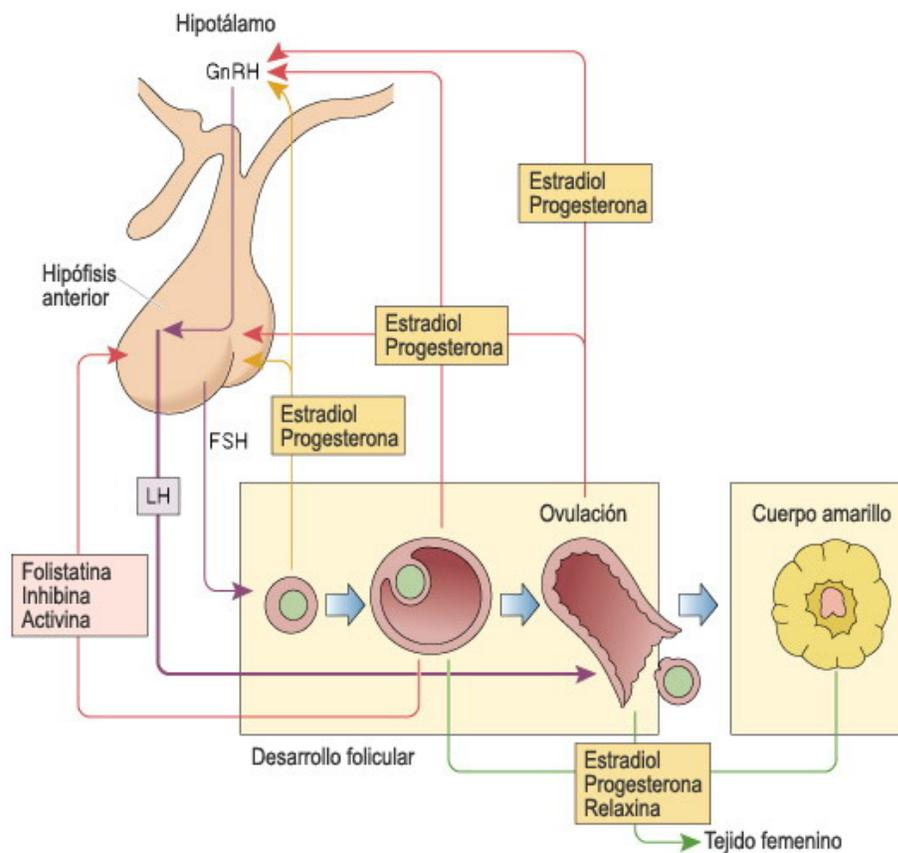


Figura 2. Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipofisario y el ovario. (Gartner y Hiatt, 1997).

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).

II. 5. Matriz Extracelular Ovárica.

El correcto desarrollo de los folículos ováricos requiere de una alta proliferación celular y por ende de una continua remodelación de la matriz extracelular (MEC) en la medida en que los folículos se van diferenciando desde primordiales, hasta las múltiples capas celulares que constituyen al folículo preovulatorio (Greenwald y Roy, 1994; Monniaux et al., 1997). Por muchos años se pensó que la MEC ovárica funcionaba meramente de armazón proporcionando el apoyo arquitectónico necesario a las estructuras ováricas específicas. Sin embargo, hoy se sabe que no solo sirve de apoyo, sino que mantiene un microambiente especializado en el cual ocurren muchas de las funciones propias del ovario.

La composición de la MEC de la pared folicular ha sido extensamente descrita (Luck, 1994). Está formada por una parte con estructura microscópica definida que es el sistema de fibras y una parte denominada sustancia fundamental amorfa que no tiene estructura visible al microscopio óptico.

II.5.1. Fibras

Las principales fibras que constituyen al tejido conjuntivo que forma parte de la pared folicular son fibras colágenas y en menor medida, fibras elásticas. Las fibras colágenas y elásticas se distribuyen desigualmente en las diferentes variedades de tejido

conjuntivo y puede existir más de un tipo de fibras en un mismo tejido. (Montes, 1992, 1996).

Existen al menos 19 tipos diferentes de colágeno en los distintos tejidos de un organismo y todos ellos tienen características estructurales propias (Ross et al., 2005). En el ovario los que se destacan son: el colágeno tipo I que forma fibras visibles al microscopio de polarización se encuentra en la cápsula albugínea, y en general en el estroma y médula ováricos, así como formando la teca externa e interna de los folículos de gran tamaño, fibras colágenas tipo III que son el mayor componente de las fibras reticulares que forman una delicada malla que soporta a las estructuras ováricas y el colágeno tipo IV que está constituyendo la membrana basal de la capa de células de la granulosa en los folículos ováricos (Luck, 1994).

Por otra parte, la ultraestructura de las fibras elásticas demuestra que están compuestas por una porción central que contiene material amorfo, abundante y homogéneo, identificado como elastina, rodeado por microfibrillas de aproximadamente 10-12 nm de diámetro que, en secciones transversales, muestran un perfil tubular electro-denso. Durante el desarrollo de la fibra elástica, las microfibrillas aparecen primero, seguidas por el depósito gradual de material amorfo que se va incluyendo entre estas. En algunos sitios anatómicos sólo aparecen los paquetes de microfibrillas sin el depósito de material amorfo, a este tipo de fibras componentes del sistema elástico se las denomina fibras oxitalánicas. Las llamadas fibras elaunínicas, en cambio, son aquellas que poseen material amorfo dispuesto en forma de parches mezclados entre las microfibrillas. Las fibras elásticas en el ovario se encuentran principalmente en la túnica elástica de los vasos sanguíneos en la médula y estroma ováricos; y en las tecas foliculares de los folículos en crecimiento (Montes, 1992).

II.5.2. Glicosaminoglicanos (GAGs)

La sustancia fundamental amorfa está constituida por glucoproteínas alargadas, como la fibronectina, que es responsable de la adhesión de las células no epiteliales a la matriz, y la laminina que es responsable de la adhesión de las células epiteliales a la membrana basal; y por glicosaminoglicanos (GAGs) o proteoglicanos (GAGs asociados con proteínas) que forman un gel hidratado, en el cual están inmersos los otros componentes de la matriz, confiriendo a ésta resistencia a las fuerzas compresivas y permitiendo la circulación de nutrientes, metabolitos y hormonas, en el tejido conjuntivo, favorecidos por la fase acuosa del gel. (Gartner y Hiatt, 1997; Ross et al., 2005).

Tabla 1: Tipos de GAGs (Gartner y Hiatt, 1997).

GAG	Masa Molecular (Da)	Disacáridos repetitivos	Aminoazúcar sulfatado	Enlace cov. c/ proteína	Localización
Acido hialurónico	10 ⁷ -10 ⁸	Glucuronato y <i>N</i> -acetil-glucosamina	Ninguno	No	Tejido conjuntivo, líquido sinovial, cartílago, dermis.
Queratán sulfato	10.000-30.000	Galactosa y <i>N</i> -acetil-glucosamina	<i>N</i> -acetil-glucosamina	Si	Cartílago, córnea, disco intervertebral
Heparán sulfato	15.000-20.000	Glucuronato (o iduronato) y <i>N</i> -acetil-galactosamina	<i>N</i> -acetil-galactosamina	Si	Vasos sanguíneos, pulmón, lámina basal
Heparina	15.000-20.000	Glucuronato (o iduronato) y <i>N</i> -acetil-galactosamina	<i>N</i> -acetil-galactosamina	No	Gránulos de los mastocitos, hígado, pulmón, piel
Condroitin-4-sulfato	10.000-30.000	Glucuronato y <i>N</i> -acetil-galactosamina	<i>N</i> -acetil-galactosamina	Si	Cartílago, hueso, córnea, vasos sanguíneos
Condroitin-6-sulfato	10.000-30.000	Glucuronato y <i>N</i> -acetil-galactosamina	<i>N</i> -acetil-galactosamina	Si	Cartílago, gelatina de Wharton, vasos sanguíneos
Dermatán sulfato	10.000-30.000	Glucuronato (o iduronato) y <i>N</i> -acetil-galactosamina	<i>N</i> -acetil-galactosamina	Si	Válvulas cardíacas, piel, vasos sanguíneos

Trabajos de los años 50 sugirieron que las células de la granulosa de los folículos ováricos de los mamíferos tenían la capacidad de sintetizar GAGs en el momento de la formación del antro y secretarlos dentro del líquido folicular. Estos GAGs fueron identificados como condroitín sulfato, dermatán sulfato y heparina. Estos están covalentemente unidos a un corazón proteico denominándose proteoglicanos. La síntesis de los proteoglicanos por las células de la granulosa se altera significativamente en respuesta a las gonadotropinas, lo que sugiere que estas moléculas tienen funciones definidas durante la foliculogénesis (Salustri et al., 1999).

Las células de la granulosa que forman la corona radiada sintetizan el mismo espectro de proteoglicanos, sin embargo, durante el periodo preovulatorio, a diferencia de las otras células granulosas, estas secretan una gran cantidad de hialuronato que se organiza entre las células de la granulosa formando una matriz muco-elástica (Salustri et al., 1992). Tanto los proteoglicanos como el hialuronato han sido identificados como importantes en un gran rango de procesos biológicos. Los proteoglicanos son sintetizados por todas las células animales. Sin embargo, sus concentraciones, el corazón proteico y el tipo y la estructura de sus cadenas de GAGs difieren en los distintos tejidos o incluso en el mismo tejido durante la diferenciación, envejecimiento o en procesos patológicos. Las macromoléculas maduras están involucradas en la adhesión entre células y de las células con la matriz, en la migración y proliferación celular, en actividades de co-receptor para varios factores de crecimiento tales como el FGF (factor de crecimiento fibroblástico), en la unión a otras moléculas tales como las lipoproteínas de bajo peso molecular (LDL) y por consiguiente afectando su interacción con los receptores de fijación, en la activación o inhibición de proteasas y en la formación de la matriz (Salustri et al., 1999).

Durante el desarrollo folicular, los espacios intercelulares de la pared granulosa son ocupados por la cavidad central debido a la coalescencia del líquido secretado por dichas células. Estas células secretan principalmente condroitín sulfato y heparán sulfato los que se acumulan en el líquido folicular, aunque también se asocian con la membrana celular (Salustri et al., 1999).

II.5.2.1. Regulación de la síntesis de proteoglicanos por las gonadotropinas

La síntesis de los proteoglicanos por las células de la granulosa esta regulada por las gonadotropinas. Inyecciones diarias de FSH por dos días en ratas hipofisectomizadas inmaduras tratadas con dietilbestrol estimula la incorporación de sulfato a los proteoglicanos ováricos cerca de 10 veces. Los análisis histoquímicos de las secciones ováricas muestran que los proteoglicanos secretados por las células de la granulosa se acumulan en el antro en desarrollo, la FSH también estimula la síntesis de proteoglicanos por las células de la granulosa *in vitro*. Por otra parte, las células granulosas de los folículos maduros tienen receptores para LH, y se ha visto que la LH tiene efectos inhibidores sobre la secreción de proteoglicanos en los tejidos ováricos. Tal regulación hormonal da cuenta de la disminución observada en la concentración de los GAGs en el líquido folicular en al medida en que el tamaño folicular aumenta (Salustri et al., 1999).

Las prostaglandinas, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la testosterona, al igual que la FSH pueden estimular la síntesis de proteoglicanos por las células de la granulosa, y el factor de crecimiento análogo a insulina-1 (IGF-1) incrementa los efectos de la FSH (Adashi et al., 1986). Así, es esperable que estos factores locales participen en la regulación de la síntesis de proteoglicanos *in vivo*.

II.5.2.2. Funciones de los proteoglicanos en el folículo ovárico.

Los grupos carboxilos y sulfato cargados negativamente y la conformación extendida de las cadenas de GAGs sobre la larga molécula de condroitín sulfato crean un gran dominio alrededor del corazón proteico con una alta densidad de carga interna, y por ende, la macromolécula ocupa un gran volumen de solvente. Esto crea una alta presión mediante la atracción de cationes que promueve el flujo de solvente hacia el interior del folículo para formar el líquido folicular y para mantener el folículo expandido (Salustri et al., 1999).

Los proteoglicanos que contienen heparán sulfato asociados a la membrana celular pueden unir lipoproteínas y participar de su captación por una gran cantidad de células. Tales complejos de proteínas-lípidos proveen una mayor fuente de colesterol para muchas células, incluyendo las células de la granulosa luteinizadas, y de hecho, la síntesis de progesterona por estas células es estrictamente dependiente de la disponibilidad de estas lipoproteínas. Por otra parte los GAGs presentes en el líquido folicular pueden inhibir la degradación de las LDL y la producción de progesterona en células de la granulosa en cultivo (Bellin et al., 1987).

II. 6. Citoesqueleto

Las células deben organizarse espacialmente e interaccionar mecánicamente con su entorno, deben disponer de una morfología correcta, ser físicamente robustas y poseer una estructura interna adecuada. Además muchas de ellas deben sufrir cambios de forma y deben desplazarse de un lugar a otro. Todas ellas tienen que reordenar sus componentes internos al crecer, dividirse o adaptarse a las circunstancias cambiantes de

su ambiente. Las células eucariotas desarrollan todas estas funciones espaciales y mecánicas en alto grado dependiendo de un sistema de filamentos denominados citoesqueleto. El citoesqueleto empuja a los cromosomas durante la mitosis y entonces divide la célula en dos. Conduce y dirige el tráfico intracelular de orgánulos, transporta materiales desde un punto de la célula a otro. Sostiene la frágil membrana plasmática y proporciona el sostén mecánico que permite a la célula soportar el estrés sin ser destruida por los cambios ambientales. La gran variedad de funciones del citoesqueleto se deben al comportamiento de tres familias de proteínas, que se ensamblan formando tres principales tipos de filamentos. Cada tipo de filamento presenta distintas propiedades mecánicas y dinámicas, pero ciertos principios fundamentales son comunes a todos ellos (Alberts et al., 1994).

En el citoesqueleto de la mayoría de las células eucariotas hay tres tipos de filamentos fundamentales para su organización espacial. *Los filamentos intermedios* proporcionan la fuerza y la resistencia al estrés mecánico. *Los microtúbulos* (formados por tubulina) determinan las posiciones de los orgánulos rodeados de membrana y dirigen el transporte intracelular. *Los microfilamentos* (filamentos de actina) determinan la forma de la superficie celular y son necesarios para la locomoción. Además de los filamentos son necesarias ciertas proteínas accesorias que permiten a la célula el correcto ensamble de dichas estructuras. Los componentes del citoesqueleto están siempre en un estado fluctuante, de este modo, cuando las condiciones cambian, la reorganización celular estructural requiere energía adicional (Alberts et al., 1994).

La actina es una proteína que se encuentra en todas la células eucariotas entre las cuales tiene una alta homología en su secuencia aminoacídica. En los vertebrados hay tres isoformas sutilmente distintas, llamadas α , β y γ , que se diferencian ligeramente en

su secuencia de aminoácidos. La actina α solo se expresa en células musculares mientras que la actina β y γ se expresan en todas las células no musculares del organismo (Alberts et al., 1994).

Si bien todas las células eucariotas presentan actina y tubulina, los filamentos intermedios solo se encuentran en algunos metazoos incluyendo los vertebrados, nemátodos y moluscos. Incluso en estos organismos, estos filamentos no son necesarios para todos los tipos celulares. Los filamentos intermedios son particularmente abundantes en las células sometidas a estrés mecánico y parece que su función más importante consiste en proporcionar resistencia física a las células y a los tejidos (Alberts et al., 1994).

Existe una gran variedad de filamentos intermedios. Los diferentes tipos celulares expresan familias distintas de estos filamentos.

El término filamentos intermedios es usado para describir los filamentos intracitoplasmáticos que corresponden al mayor sistema filamentososo del citoplasma celular. Como el nombre lo indica, los aproximadamente 10 nm (6 a 12 nm) de estos filamentos están entre los finos filamentos de actina (4 a 7 nm) y los microtúbulos (11 a 16 nm). Sobre la base de las principales proteínas (o polipéptidos) presentes en estos filamentos, se pueden identificar cinco principales tipos de filamentos intermedios. Estos incluyen:

- 1- Filamentos intermedios que contienen prequeratinas o proteínas similares a estas denominados citoqueratinas. Este tipo de filamento se expresa en las células de origen epitelial. Existen más de 20 tipos de citoqueratinas que se expresan en células epiteliales determinadas. Cada filamento de citoqueratina está formado por una cantidad idéntica de cadenas de queratinas tipo I (ácidas) y de tipo II (básicas o neutras) que

heterodimerizan (se unen dos a dos) formando los tetrámeros fundamentales. Las redes de citoqueratinas entrelazadas se mantienen unidas mediante puentes disulfuro y pueden sobrevivir incluso después de la muerte de las células, formando cubiertas resistentes como por ejemplo las capas externas de la piel, plumas, uñas, etc. La diversidad de las CKs es clínicamente muy útil para el diagnóstico del origen de un tumor maligno epitelial (carcinoma).

2- Filamentos intermedios que contienen vimentina. Estos filamentos son los predominantes, aunque no los únicos que se encuentran en la mayoría de las células de origen mesenquimático tales como condrocitos y células endoteliales. Más allá de esto, es sabido que en algunos casos al menos la vimentina se comporta como un marcador de maduración celular. Este tipo de filamento puede, en ciertos casos encontrarse en células epiteliales en cultivo, y de origen miogénico o neurogénico. De este modo es concebible pensar que en algunos estados patológicos, este filamento puede encontrarse virtualmente en cualquier tipo celular.

3- Filamentos intermedios que contienen la proteína desmina. Estos son característicamente encontrados en las células de origen muscular (músculo estriado cardíaco, esquelético o visceral y músculo no estriado visceral o vascular).

4- Filamentos intermedios que contienen neurofilamentos. Estos filamentos se encuentran mayoritariamente en las proyecciones de las células nerviosas (axones principalmente) aunque no en todas. Existen tres tipos de proteínas de neurofilamentos (NF-L, NF-M, NF-H) que se ensamblan formando heterodímeros. Durante el crecimiento axonal se incorporan nuevas subunidades de neurofilamentos a lo largo del axón en un proceso dinámico.

5- Filamentos intermedios que contienen proteína ácida gliofibrilar. Se localizan como paquetes en los cuerpos celulares y prolongaciones de los astrocitos o células gliales.

La presencia de células de distintos orígenes y las continuas modificaciones que sufren estas en el ovario parecen estar asociadas con distintos patrones de expresión de las proteínas del citoesqueleto. Las células pueden ser caracterizadas de acuerdo con la expresión de los componentes del citoesqueleto tales como los filamentos intermedios o α actina. De este modo, las células musculares que son componentes del ovario tales como las células de la teca externa o del estroma ovárico expresan desmina. Por otra parte, aquellas células de origen epitelial, por ejemplo el epitelio cúbico de revestimiento del ovario, suelen expresar citoqueratinas. Diversos autores han estudiado la distribución de distintos componentes del citoesqueleto en las células que componen el ovario. La expresión de estos componentes celulares es muy variable, por cuanto en el ovario, las células están constantemente cambiando ya sea porque sufren una intensa proliferación/apoptosis o porque se diferencian en un sentido determinado para cumplir funciones distintas en diferentes momentos (Santini et al., 1993; Selstam et al., 1993; van den Hurk et al., 1995; Khan-Dawood et al., 1996, 1997; Pan y Auersperg, 1998; Löffler et al., 2000; Marettova y Maretta, 2002).

II. 7. Balance Proliferación/Apoptosis

II. 7. 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, terminalmente diferenciada de 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 entorno a 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 et al., 1978). 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 et al., 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 et al., 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 et al., 1978; Hirshfield, 1991) y que rápidamente inicien un programa de diferenciación terminal (luteinización) en el cual las células dejan de dividirse de la manera acelerada en que lo venían haciendo (Richards et al., 1986; Richards, 1994). Este evento ocurre dentro de las 4 horas posteriores al pico de LH y se relaciona con ciertos cambios en las moléculas reguladoras específicas de la progresión del ciclo celular (Robker y Richards, 1998).

Luego de la ovulación, las células de la granulosa llegan al grado de máxima diferenciación cuando se luteinizan para formar un cuerpo lúteo maduro. Las células de la granulosa están programadas, en la rata, para luteinizarse 7 horas después de la exposición al pico de LH (Richards et al., 1986; Robker y Richards, 1998).

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 et al., 1986a,b) o de FSH (Kumar et al., 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 et al., 1991)

II.7.1.1. 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 células 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 et al., 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 que 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.

Los estrógenos son conocidos por ser potentes mitógenos. En el útero, el estradiol induce 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 mostrado también que la ciclina D1 puede unirse directamente al receptor de estrógenos e intensificar la transcripción de genes específicos (Zwijsen et al., 1997). Finalmente, existen muchas hormonas adicionales que actúan en el ovario afectando la proliferación y diferenciación celulares 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); IGF-I que probablemente juegue un rol mas importante en la diferenciación celular que en la proliferación (Baker et al., 1996); los andrógenos (Billig et al., 1993).

II. 7. 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 et al, 2007). En

la Figura 3 se muestra en qué fases del ciclo de división celular pueden ser encontrados algunos de estos marcadores de proliferación.

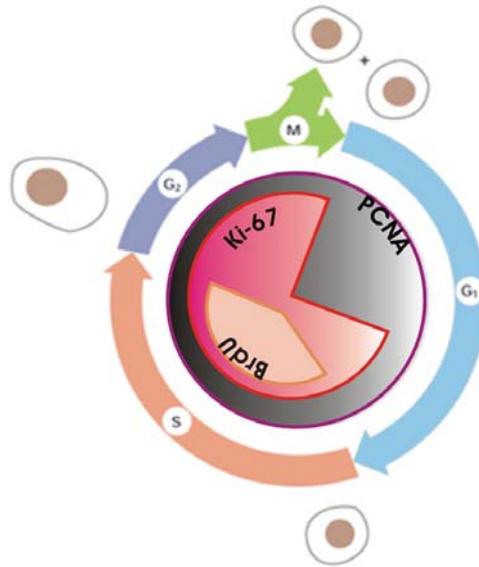


Figura 3. Ciclo de división celular y sus marcadores. La replicación del ADN está confinada a la fase S del ciclo. La fase G_1 está comprendida entre las fases M (mitosis) y S, en cambio G_2 está comprendido entre S y M. La célula incorpora BrdU en la fase S, expresa Ki-67 desde el final de G_1 hasta la M inclusive y expresa PCNA durante todo el ciclo de división celular encontrándose en la fase S su mayor concentración

PCNA es una proteína nuclear de 35 kDa que tiene un papel esencial en la regulación del ciclo celular (Xiong et al., 1991). Durante la fase S del ciclo celular, PCNA se aparea con el ciclina D (Xiong et al., 1992), otro regulador importante de proliferación celular. Este complejo es modulado por varios factores de crecimiento y otros estímulos de crecimiento (Xiong et al., 1991). Si durante la fase G las células reciben los estímulos apropiados, ellas entran a la fase S del ciclo, y la expresión de PCNA aumenta a lo largo de G/S de la interfase, alcanzando una meseta durante G_2 . (Liu et al., 1989). La expresión de PCNA declina bruscamente en la fase M y en quiescencia. Estas características hacen del PCNA un marcador muy útil para células proliferantes.

II.7.2. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un evento que se caracteriza por la formación de fragmentos celulares sellados, cuerpos apoptóticos, evitando la inflamación causada por la liberación descontrolada del contenido intracelular, 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 que sufre el ADN como consecuencia de la activación de señales intracelulares que concluyen en la activación de una endonucleasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 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 et al., 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 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).

II. 8. Receptores hormonales esteroides y proteínas relacionadas

II. 8.1. Receptores hormonales esteroides

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 et al., 2002).

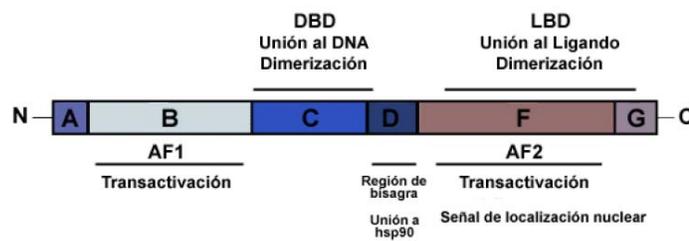


Figura 4. Estructura de los receptores hormonales nucleares. (Drummond et al., 2002)

II. 8.1.1. Progesterona

La progesterona, mediante sus receptores, juega un rol crucial en la ovulación, implantación y mantenimiento de la preñez (Graham y Clark, 1997). 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 et al., 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 et al., 1993; Vegeto et al., 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 et al., 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 femenina esta subrayada por la infertilidad en los ratones KnockOut (KO) para RP (Lydon et al., 1995). Si bien los ratones muestran histológicamente ovarios normales, estos fallan en ovular aun 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 et al., 1995; Gava et al., 2004).

II. 8.1.2. 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 et al., 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 et al., 1996; Wang et al., 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 et al., 1997; Matsuzaki et al., 1999; Wang et al., 1999, 2000).

En los mamíferos, la actividad de RE α en el útero y oviducto esta regulada por los niveles de hormonas circulantes (Brenner et al., 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 et al., 1999). La expresión de este subtipo en particular en el ovario esta relegado a las células de la teca interna, células de las glándulas intersticiales, epitelio germinal y algunas células del estroma; habiendo diferencias 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 et al., 1999, 2000; Pelletier et al., 2000; Rosenfeld et al., 2001; Van Den Broeck et al., 2002).

En el ovario, RE β es el subtipo de receptor predominante y los niveles de proteína de este receptor son variables en el ovario de la rata durante el ciclo estral (Hiroi et al., 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 está altamente expresado en los pequeños folículos en desarrollo aunque menos en los grandes folículos debido a la habilidad de las gonadotrofinas de regular hacia abajo la expresión génica de RE β (Kuiper et al., 1996; Byers et al., 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 et al., 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 et al., 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 et al., 1999; Sharma et al., 1999). Fitzpatrick et al., (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. Este 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 et al., 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 et al., 1990; Umayahara et al., 1994). Paech et al., (1997) han demostrado que sin bien la unión del complejo estrógenos-RE α tanto al sitio ERE como 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 et al., 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.

II. 8.2. Proteínas de golpe de calor (Heat Shock Protein: HSPs).

Las HSPs son proteínas celulares altamente conservadas presentes en una gran variedad de especies. Estas proteínas tienen dos funciones principales: primero, bajo condiciones fisiológicas, actúan como chaperonas moleculares, las cuales están relacionadas con el plegamiento correcto y transporte de proteínas intracelulares que se producen en las células; segundo, pueden ser inducidas en respuesta a estrés celular incluyendo: cambios en la temperatura, presencia de radicales libres, infecciones virales o bacterianas, presencia de metales pesados, etanol, isquemia, etc. Estas proteínas han sido ampliamente categorizadas de acuerdo a su tamaño en las siguientes familias: HSP70, HSP27, HSP60, HSP90 y HSP100 (Neuer et al., 2000).

Es sabido que muchos receptores nucleares, incluyendo los receptores para hormonas esteroideas sexuales, forman grandes complejos heterogéneos que contienen HSPs. Algunos componentes de estos heterocomplejos-receptores son proteínas con funciones de chaperonas bien establecidas (HSP90 y HSP70), y una de sus funciones críticas es facilitar el plegamiento del LBD de los receptores para una conformación de alta afinidad para los esteroideos. Se ha propuesto que la HSP90 se une al LBD de los receptores solubles no ocupados y los mantiene en estado inactivo. La unión del ligando al receptor dispara la liberación de la HSP90 del complejo e invierte la represión. De este modo la HSP90 actúa como represor de la función de los receptores, pero también es un componente necesario en el camino de activación de los receptores (Koshiyama et al., 1995).

Históricamente, los estudios sobre la habilidad protectora de las HSPs han sido enfocados principalmente en su papel como chaperonas, para prevenir los plegamientos erróneos de las proteínas o para acelerar el replegamiento y renaturalización de las mismas (Mosser et al., 1997; 2000). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la función de las HSPs abarca un gran espectro de roles antiapoptóticos, que pueden o no estar relacionados con su función de chaperonas (Beere, 2004, 2005). Se han propuesto muchos mecanismos por los cuales las HSPs impiden la activación de la cascada de las caspasas que incluyen al camino intrínseco, dependiente de la mitocondria, y al extrínseco, dependiente de receptores de muerte celular. Las HSPs pueden inhibir la actividad de las proteínas proapoptóticas derivadas de Bcl-2 para prevenir la permeabilización de la membrana mitocondrial externa con la consecuente liberación de factores apoptogénicos. La interrupción de la formación del apoptosoma

representa otro mecanismo por el cual las HSPs pueden impedir la activación de las caspasas y la consecuente inducción de la apoptosis (Beere, 2004, 2005).

En las células eucariotas, los miembros de la familia HSP70 están presentes en el citoplasma y organelas celulares donde actúan en el plegamiento y traslocación de proteínas. La HSP70 tiene dos formas de presentación en el citoplasma, una forma de 73 kDa que se expresa constitutivamente (HSC70, esta es la forma asociada a los receptores esteroides); y una forma inducible por estrés de 72 kDa (HSP70). En las células no-estresadas la HSP70 se localiza difusamente tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula, pero en las células sometidas a choque térmico aumenta la concentración de esta proteína en el nucleolo, así como también aumenta la expresión en el núcleo y citoplasma (Pratt y Toft, 1997, Mosser et al., 2000). Se sabe que la forma inducible por estrés de la HSP70 previene el clivado y la activación de Bid en respuesta a TNF, y este efecto es independiente de sus habilidades de chaperona. Esto indicaría un rol en la prevención de la apoptosis de las células que han sido sometidas a un estímulo pro-apoptótico (Gabai et al., 2002; Beere 2004). También se ha demostrado que varios inhibidores de la síntesis de progesterona inducidos por la LH y ciertos agentes luteolíticos, estimulan la expresión de HSP70 en las células esteroideogénicas, indicando esto un posible papel en la inhibición de los procesos de esteroideogénesis (Khanna et al., 1995). Estudios realizados sobre células endometriales han mostrado que la expresión de HSP70 se correlaciona negativamente con la expresión de Ki-67; y, siendo la proliferación una respuesta a las hormonas esteroides, esta HSP actuaría como represora de los efectos de estas hormonas. Por otra parte, en estas células, los RE y RP se expresan menos si han sido estimuladas por hormonas esteroides, y ocurre lo contrario con la HSP70. De este modo, la HSP70 podría estar relacionada de manera

directa o indirecta con la “down regulation” de los receptores de hormonas esteroides (Khana et al., 1995).

II. 9. Enfermedad Quística Ovárica

Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de estructuras foliculares persistentes más allá del periodo normal, que no ovulan pero tampoco sufren los procesos de atresia. Se presenta en una gran cantidad de especies, ocasionando trastornos en la fertilidad y cuantiosas pérdidas, ya sea debido a las pérdidas productivas en numerosos sistemas de producción (bovinos de leche, porcinos, ovinos) como a los gastos en tratamientos para la fertilidad en el caso de las mujeres (Moreno et al., 1999; Lakhani et al., 2002; Silvia et al., 2005).

La compleja etiopatogenia involucra numerosos procesos, no solo dentro del ovario, sino también a nivel del eje hipotálamo-hipofisario e incluso con intervención de otras glándulas como las adrenales y la pineal (Prata Lima et al., 2004; Silvia et al., 2005).

Muchos investigadores han tratado de determinar el factor causal primario. Se ha sugerido la liberación fuera de tiempo de las gonadotrofinas o el desbalance en la relación LH/FSH como posibles causas en el desarrollo de los quistes foliculares. Los quistes ováricos se desarrollan en correlación con poca respuesta a nivel del hipotálamo o de la hipófisis al 17- β -estradiol secretado por las células foliculares ováricas en el bovino. Así, la COD puede ser causada por desbalances endocrinos en el eje hipotálamo-hipofisario-ovárico. Sin embargo, los mecanismos por los cuales los folículos permanecen a través del tiempo o regresan no son conocidos aún. Lo que si se sabe es que son mecanismos complejos que involucran a más de un proceso celular,

incluyendo alteraciones en la proliferación/apoptosis, cambios en la diferenciación celular, en el ambiente en el que se desarrollan estos folículos, modificaciones en la expresión de diversas enzimas, receptores y otras proteínas y péptidos relacionados. En folículos quísticos bovinos se observó que la tasa de proliferación tanto de las células granulosas como de la teca interna eran muy inferiores a las presentes en los folículos sanos, e inclusive más bajas que en los folículos atrésicos (Isobe y Yoshimura, 2000a). Por otra parte, el grado de apoptosis en los folículos quísticos tempranos fue elevado, acercándose a los niveles de apoptosis presente en los folículos atrésicos tempranos. En la medida que el proceso continuó, el porcentaje de células muertas disminuyó en ambos tipos foliculares (Isobe y Yoshimura, 2000b). En la enfermedad que se presenta en los humanos, se encontró expresión alterada en los receptores hormonales para estrógenos, tanto en los niveles de ARNm como de proteína (Jakimiuk et al., 2002). Esto también fue visto en bovinos en los cuales se estudió la cantidad de receptores de estrógenos totales en ovarios provenientes de animales con la enfermedad con respecto a animales sanos (Odore et al., 1999). Calder et al., (2001) encontraron niveles más elevados en los receptores de LH y en la enzima 3- β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3- β -HSD) con respecto a los folículos normales dominantes. Numerosos factores externos pueden influenciar y alterar el delicado balance hormonal que es necesario para que ocurran los procesos que llevan a una ovulación normal dentro de un ciclo estral/menstrual normal. El estrés inhibe el normal funcionamiento del eje hipotálamo hipofisario llevando al desarrollo de trastornos reproductivos, a través de las hormonas secretadas por las glándulas adrenales (Silvia et al., 2005).

III- MATERIALES Y MÉTODOS

III- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Modelo experimental:

Los procedimientos efectuados con animales experimentales fueron realizados de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (NRC, 1996).

Se utilizaron 30 ratas (*Ratus norvegicus*), de la cepa Wistar provenientes del Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional del Litoral), las que fueron mantenidas hasta el inicio de la experiencia con un ciclo de luz-oscuridad controlado (luces encendidas entre las 6:00 y las 20:00), y a una temperatura de 18-22 °C con libre acceso a agua y balanceado comercial. Se seleccionaron hembras vírgenes de 60 días de edad con un peso de 230 gr (+/- 20), comprobándose la capacidad reproductiva por medio de citología vaginal diaria (Montes y Luque, 1988), utilizándose aquellas que manifestaron tres ciclos estrales regulares consecutivos de 5 días.

Los animales fueron divididos en un grupo experimental (GL) constituido por 20 ratas y un grupo control (GC) formado por 10 ratas. Los animales experimentales fueron colocados en un ambiente con las condiciones ambientales citadas, salvo por el ciclo de luz, que fue extendido a 24 hs. durante 15 semanas conforme a lo propuesto por Singh (1969). El GC se mantuvo bajo condiciones ambientales normales durante el mismo periodo.

III.2. Determinación de la ciclicidad ovárica:

Desde hace más de 70 años se sabe que el epitelio vaginal muestra variaciones histológicas que responden a la estimulación por los esteroides ováricos (Long y Evans,

1922). Estos cambios pueden ser monitoreados por extendidos vaginales de las células epiteliales que se descaman, utilizando métodos de tinción apropiados (Salveti et al., 2004). En la COD, los folículos ováricos anovulatorios continúan secretando estrógenos pero solamente a un nivel tónico, produciendo así una cornificación vaginal continua (estro vaginal persistente) como evidencia indirecta (Mahajan, 1988; Singh, 1969). Para monitorear los cambios citológicos a nivel vaginal, que reflejan los procesos de aparición de esta enfermedad, los animales fueron identificados individualmente y sometidos a lavajes vaginales diarios durante toda la experiencia (siempre a la misma hora: 19 hs). Se utilizó la metodología de evaluación propuesta por Montes y Luque (1988). La aparición de células epiteliales anucleadas cornificadas durante un lapso mayor a los 10 días se consideró como cornificación vaginal persistente.

III.3. Toma y Procesamiento de las muestras para las técnicas histológicas:

Para obtener las muestras destinadas a los estudios histológicos, los animales fueron anestesiados con acepromacina/ketamina (Anestesia Veterinaria ®) y sacrificados por exanguinación. Los ovarios fueron disecados, reducidos y posteriormente fijados en formol bufferado al 10% durante 8 hs a 4°C, luego fueron lavados en buffer fosfato salino (PBS) y procesados 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) los que 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) según lo detallado en la tabla 2.

Tabla N° 2 Clasificación de las diferentes categorías de folículos ováricos de rata (basado en la Nomina Histológica (1994)).

Clasificación	Características	Tamaño
Primario	Monocapa de células cúbicas foliculares. Sin tecas	20-50 μm
Secundario pequeño	Más de una capa de células cúbicas. Sin tecas. Preantrales	50-100 μm
Secundario mediano	Más de una capa de células cúbicas. Con tecas. Preantrales	100-250 μm
Secundario grande	Más de una capa de células cúbicas. Con tecas. Preantrales	+ 250 μm
Terciario antral	Varias capas de células granulosas. Presencia del antro.	+ 300 μm
Atrésico I	<10 % apoptosis en la capa granulosa	
Atrésico II	10 -30 % apoptosis en la capa granulosa	
Atrésico III	Perdida de la estructura folicular. Bajo % de apoptosis.	
Quísticos	Cavidad antral sumamente distendida con líquido	+ 700 μm

III.4. Toma y Procesamiento de las muestras para Western Blot:

Se extrajeron los ovarios los cuales fueron pesados y colocados en crioviales estériles e inmediatamente congelados en termo de nitrógeno líquido para posteriormente ser procesados.

Las muestras congeladas, 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 de las muestras 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.

III.5. Técnicas histoquímicas:

Con estas técnicas se evaluaron las tres capas foliculares de los folículos quísticos de los animales con COD y de los folículos terciarios de los animales del GC. No se utilizaron coloraciones de contraste para poder realizar el análisis de las imágenes mediante la segmentación de colores.

III.5.1. Picrosirius:

Cortes de 5 μm fueron desparafinados, hidratados y luego coloreados durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de Sirius Rojo (Direct Red 80 Aldrich, Milwaukee, WI 53233, U.S.A.) al 0,1% en una solución saturada de ácido pícrico, lavados por 5 minutos en agua, deshidratados y montados (Montes, 1996).

La molécula de colágeno, muy rica en aminoácidos básicos, reacciona fuertemente con los colorantes ácidos. La molécula fuertemente ácida y larga del Sirius Rojo reacciona con los grupos básicos libres del colágeno, siguiendo su misma conformación molecular y aumentando la birrefringencia propia de sus fibras y fibrillas. Esta característica del colorante permite identificar en cortes de tejido los diferentes tipos de colágeno y cuantificar cambios en su conformación molecular (Montes, 1996).

Esta técnica se efectuó con la finalidad de tratar de identificar cambios en la organización y en los procesos de remodelación del colágeno en los componentes de la pared folicular en que predominaba el tejido conjuntivo.

Para estudiar la organización del colágeno, la polarización fue obtenida mediante 2 filtros Polaroid, uno de ellos colocado sobre el condensador y el otro sobre las lentes objetivas del microscopio. La evaluación cuantitativa de los preparados se

efectuó con el sistema de análisis digital de imágenes Image Pro-Plus 3.0 ® como se detalla mas adelante.

III.5.2. PAS (Ácido periódico – Reactivo de Schiff):

Se desparafinaron e hidrataron cortes de 5 µm de espesor los que fueron inmersos en una solución de ácido periódico al 1% por 20 minutos antes de ser tratados con el reactivo de Schiff (BIOPUR, Rosario Argentina). La reacción ácido periódico-reactivo de Schiff es muy utilizada en la histoquímica para poner en evidencia los carbohidratos que contienen grupos glicol vecinos y con carga electrostática neutra. La evaluación de los preparados se realizó mediante el programa Image ProPlus 3.0 ® como se detalla más adelante.

III.5.3. Alcian blue a concentraciones electrolíticas críticas:

Cortes de 5 µm fueron desparafinados e hidratados. Se efectuó la coloración durante 18 horas a temperatura ambiente en soluciones de Alcian Blue al 0,05% en buffer acetato 0,2 M pH 5,8 con el agregado de cloruro de magnesio en las molaridades requeridas: 0,3 M; 0,65 M; 0,9 M y 1 M.

La concentración electrolítica crítica es la cantidad de un electrolito (en este caso el cloruro de magnesio) suficiente para evitar la coloración de una determinada biomolécula debido a que se produce una competencia entre los cationes del electrolito y los cationes del colorante por unirse a los sitios polianiónicos de los tejidos (Montes y Junqueira, 1988). Este es un buen método diferencial, dado que los diversos glucosaminoglicanos ácidos presentes en el tejido conjuntivo tienen diferentes puntos

de concentración electrolítica crítica permitiendo una adecuada identificación de los mismos (tabla 3) (Montes y Junqueira, 1988).

Tabla 3: Identificación de distintos glucosaminoglicanos a través de la coloración con Alcian Blue a concentraciones electrolíticas críticas.

a	ALCIAN BLUE			
	MgCl2 0,3M	MgCl2 0,65M	MgCl2 0,9M	MgCl2 1M
No Sulfatados (Acido hialurónico)	+	-	-	-
Sulfatados a				
Condroitin 4- y 6- sulfato	+	+	-	-
Dermatan sulfato	+	+	-	-
Heparan sulfato	+	+	+	-
Keratan sulfato	+	+	+	+

^a listados de acuerdo al grado de sulfatación, + indica reacción positiva, - indica reacción negativa. (Montes y Junqueira, 1988)

Esta técnica se realizó con la finalidad de identificar cambios en los proteoglicanos presentes en los tejidos ováricos durante la inducción de la enfermedad. Para la valoración de los preparados se utilizó el equipo de análisis digital de imágenes.

III.5.4. Método de resorcina-fucsina de Weigert:

Luego de desparafinados e hidratados, dos cortes seriados de 5 μ m fueron coloreados con resorcina-fucsina de Weigert, sin ningún tratamiento previo o luego de la oxidación con oxona (Montes, 1992). Este método sirve para demostrar fibras elásticas maduras (“fibras elásticas” propiamente dichas) y también colorea fibras elaunínicas (que contienen menos elastina). Las fibras oxitalánicas se pueden evidenciar oxidando los cortes antes de la coloración. La oxidación fue efectuada usando una

solución acuosa de oxona (monopersulphate compound, Du Pont, Wilmington, Delaware 19898, U.S.A.) al 10%.

III.6. Evaluación de la proliferación celular

Se evaluó a través de la expresión de PCNA por técnicas de inmunohistoquímica. La expresión de esta proteína fue revelada por medio de una técnica de inmunohistoquímica indirecta usando anticuerpos monoclonales específicos (Tabla 4), (Ortega et al 2004, Baravalle et al 2006).

Las inmunomarcaciones se realizaron sobre cortes de 5 μm de espesor, siguiendo el protocolo descrito previamente por Ortega et al (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 (NGS) al 5%.
- 8- Incubación con anticuerpo primario: se usó un anticuerpo monoclonal, clon PC-10 (Novocastra Laboratories, UK) diluído 1:100 durante 16 horas a 4°C (toda la noche en heladera). Para los controles de especificidad se sustituyó el anticuerpo primario por NGS.

- 9- Después de la incubación con el anticuerpo primario la cámara se retiró de la heladera y se dejó a temperatura ambiente durante 15 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.

Todas las células inmunomarcadas para PCNA se consideraron positivas. Estas presentaron reacción nuclear positiva con alta heterogeneidad en la intensidad de la tinción. Por ello, se establecieron 3 rangos de intensidad: débil (1+), moderado (2+) e intenso (3+). Se contaron en cada preparado, como mínimo 1000 células de cada una de las capas que componen la pared folicular de los siguientes tipos foliculares: folículos terciarios y folículos quísticos. Sólo se cuantificaron las que mostraron la tinción nuclear más intensa (PCNA 3+) y el resultado se expresó como porcentaje de células intensamente marcadas sobre el total de células para cada capa folicular.

III.7. Evaluación de la diferenciación celular:

Se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica indirecta descrita para PCNA, con algunas variaciones. Se marcaron las siguientes proteínas: el microfilamento α -actina de músculo liso (α -SMA), y los filamentos intermedios:

vimentina, citoqueratinas, desmina, proteína acida gliofibrilar y neurofilamento. Los detalles y forma de utilización de cada uno de los anticuerpos se describen en la tabla 4. Se digitalizaron imágenes de cada una de las capas de la pared folicular para los siguientes tipos de folículos: terciarios, atrésicos, quísticos en los dos grupos de animales. Se procedió luego al análisis de las imágenes mediante el programa Image Proplus 3.0.1 como se detalla posteriormente.

Tabla 4. Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.

Proteína	Anticuerpo	Dilución	Características especiales de la técnica de IHQ.
PCNA	Clon PC-10. Novocastra	1-100	Técnica descrita en la página 53.
Citoqueratinas (Cks)	Clon LP 34, 34βE12 & 35βH11. Dako	Prediluido	Técnica descrita en la página 53.
Vimentina (Vim)	Clon V9. Zymed	1:100	Técnica descrita en la página 53.
Desmina (Des)	Clon ZC18. Zymed	1:100	Técnica descrita en la página 53.
Proteína Acídica Glíofibrilar (GFAP)	Policlonal. Dako	Prediluido	Técnica descrita en la página 53
Neurofilamento-200 (NF)	Clon RT97. Novocastra	1:50	Técnica descrita en la página 53.
α-actina del músculo liso (α-SMA)	Clon αsm-1. Novocastra	1:50	Técnica descrita en la página 53.
Bax	Policlonal. Biogenex	1:50	Sin recuperación antigénica en MW
Bcl-2	Clon 100. Biogenex	1:30	Incubación con el Ac. primario toda la noche a 25°C.
Caspasa-3	Policlonal. R&D	1:300	Sin recuperación antigénica en MW.
Receptor de estrógenos α (RE α)	Estrogen Receptor α. Clon 1D5. Biogenex.	1:40	Técnica descrita en la página 53.
Receptor de estrógenos β (RE β)	Estrogen Receptor β- PA1-311. Affinity. Policlonal	1:250	Técnica descrita en la página 53.
Heat Shock Protein-70 (HSP 70)	Heat Shock Protein 70. Clon BRM-22. Biogenex.	1:500	Técnica descrita en la página 53.
Receptor de progesterona (RP)	Progesteron Receptor 130. PR130. LETH. Policlonal	1:80	Técnica descrita en la página 53.

III.8. Evaluación de la apoptosis:

III.8.1. Proteínas relacionadas con la apoptosis.

La apoptosis fue evaluada mediante la detección de proteínas que intervienen en este proceso por inmunohistoquímica. La técnica utilizada es igual a la utilizada para PCNA con algunas modificaciones. Los anticuerpos usados, las concentraciones y particularidades se detallan en la tabla 4. Se digitalizaron imágenes de cada una de las

capas de la pared folicular para los siguientes tipos de folículos: terciarios y atrésicos (clasificados de acuerdo al grado de atresia en tres categorías) en los grupos GL y GC.

III.8.2. TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labelling)

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 et al (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: terciarios y atrésicos (clasificados de acuerdo al grado de atresia en tres categorías) en los dos grupos de animales, y quísticos en GL. 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.

III.9. Receptores Esteroides

III.9.1. Inmunohistoquímica

Se utilizó una técnica de inmunohistoquímica indirecta para detectar receptores de estrógenos α y β , y progesterona; tal como se describe para PCNA, con algunas modificaciones, las cuales se detallan en la tabla 6. Se evaluaron todos los folículos en crecimiento encontrados en los ovarios de los animales control como así también en los animales con COD: folículos primarios, secundarios (pequeños, medianos y grandes), terciarios, atrésicos (tipo I, II, y III); y folículos quísticos (solo en el GL). La evaluación de los preparados se realizó con el programa Image ProPlus 3.0 ® como se detalla mas adelante.

III.9.2. Western Blot

Se llevaron a cabo electroforesis en geles discontinuos con un 10% de acrilamida-bisacrilamida (29:1) en condiciones desnaturalizantes para el gel de resolución (Laemmli, 1970). 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 µg 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 5.

Tabla 5. Estándares de PM para SDS-PAGE, amplio espectro. BIO-RAD

Proteína	Peso molecular kDa
Miosina	200
b-galactosidasa	116,25
Fosforilasa b	97,40
Albúmina sérica	66,20
Ovoalbúmina	45
Anhidrasa carbónica	31
Inhibidor de tripsina	21,50
Lisozima	14,40
Aprotinina	6,50

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 6.

En una membrana con las mismas muestras utilizadas se procedió a la inmunodetección de una proteína constitutiva (tubulina) para asegurar que la cantidad de proteína sembrada fuera constante entre muestras.

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en la técnica de Western Blot.

Proteína	Anticuerpo	Dilución	Marca	Características
RE α	Estrogen Receptor α . Clon 1D5	1:40	Biogenex	Monoclonal
RE β	Estrogen Receptor β - PA1-311	1:250	Affinity	Policlonal
HSP 70	Heat Shock Protein 70. Clon BRM-22	1:500	Biogenex	Monoclonal
RP	Progesterone Receptor 130. PR130	1:80	LETH	Policlonal
Tubulina	Tubulina (clon: 6G7)	1:50	DSHB	Monoclonal

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

1. Enjuagar la membrana de nitrocelulosa con agua destilada y luego con TBS-T hasta la desaparición del colorante.
2. Bloquear los sitios de unión inespecíficos con TBS-T leche 5 %, 1 hora a temperatura ambiente
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. Revelado con DAB durante el tiempo necesario observando la aparición de las bandas en las zonas de interés
9. Lavado con agua destilada.
10. Secado de la membrana entre papeles secantes.

III.10. Análisis de los resultados:

Las imágenes generadas con un microscopio Olympus CH2, fueron digitalizadas mediante una cámara SONY CCD-IRIS conectada a una PC de escritorio. La evaluación de los preparados así como también de las membranas de nitrocelulosa se realizó con el analizador digital de imágenes Image Pro-Plus 3.0.

La evaluación de la proliferación celular con PCNA se efectuó mediante el recuento de células intensamente marcadas con el anticuerpo sobre el total de células para cada capa folicular en las categorías estudiadas. Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas. La evaluación de TUNEL y caspasa-3 se realizó de manera similar a lo detallado para PCNA aunque se evaluaron todas las células positivas sobre el total (Baravalle et al 2006).

Para evaluar los preparados coloreados con Picrosirius, se generó una secuencia automatizada para cuantificar la intensidad de la birrefringencia, utilizando el lenguaje de programación del sistema de análisis de imágenes. En este proceso automatizado, las imágenes de los preparados teñidos con Picrosirius y digitalizadas utilizando luz polarizada, fueron convertidas a tonos de grises. Se efectuó una calibración de intensidad con un rango entre 0 (background) y 100 (mayor intensidad de birrefringencia observada). La intensidad fue medida como el gris promedio que fue igual a la suma del valor de cada píxel dividido el total de píxeles de la imagen.

La evaluación de las demás técnicas de histoquímica como así también las de inmunohistoquímica para los anticuerpos marcadores de proteínas del citoesqueleto (Vim, Des, Cks, GFAP, NF y α -Actina), bax, bcl-2 y HSP70 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 et al., 2004).

Los preparados de inmunohistoquímica para RE y RP se evaluaron de acuerdo a lo descrito por Wang et al., (1999). Brevemente, usando la herramienta de segmentación de colores, se midió el área total positivamente coloreada con DAB (producto de reacción marrón 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 membranas de nitrocelulosa reveladas con DAB fueron escaneadas con un escáner de oficina (EPSON Stylus CX3500) y las imágenes obtenidas fueron guardadas con formato Tiff. El análisis de estas imágenes se realizó mediante la normalización de los valores en relación a la media de controles (muestras de ovarios del GC) y consiguiente comparación de las muestras de animales tratados contra ese valor.

III.11. 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 t-student cuando se analizaron dos grupos de datos o ANOVA para más grupos; en este último caso se realizó el post-test de Duncan.

IV- RESULTADOS

IV- RESULTADOS

IV.1. Caracterización morfológica

Los animales expuestos a luz permanente mostraron ciclos irregulares a partir de la tercera semana de exposición y cornificación vaginal persistente a partir de la decimotercera semana.

Con la coloración de hematoxilina-eosina, se observó que los ovarios del GC exhibían folículos en varios estadios de desarrollo incluyendo folículos primarios, secundarios y terciarios; cuerpos lúteos en regresión y glándulas intersticiales así como también folículos con diferente grado de atresia.



Figura 5. Vista panorámica de un ovario de rata del GL. Se observan dos folículos quísticos completos y parte de un tercero *.

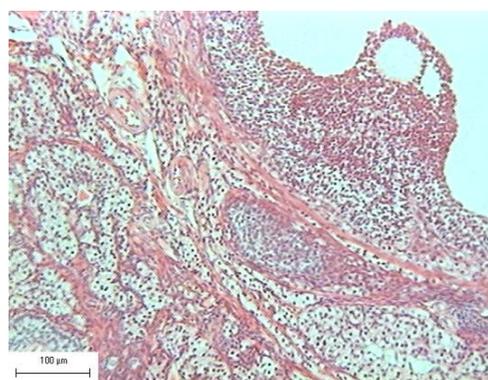


Figura 6. Detalle de la pared folicular de un quiste de un animal con COD

En el GL, los ovarios estaban evidentemente atrofiados, con ausencia de cuerpos lúteos, gran desarrollo de glándulas intersticiales y folículos en distintas etapas de desarrollo (secundarios, terciarios y folículos atrésicos). Se distinguía la presencia de grandes folículos llenos de líquido, distendidos y quísticos, con una capa de células de

la granulosa más fina o ausente con respecto a los folículos terciarios normales (figuras 5 y 6). La capa de células de la teca interna se encontraba con evidente hipertrofia.

IV.2. Matriz extracelular ovárica

IV.2.1. Organización y cuantificación del colágeno

Bajo el microscopio de polarización los diferentes tipos de colágeno que componen la pared folicular y su distribución diferencial fueron fáciles de identificar ya que el colágeno de tipo I forma fibras gruesas (fibras de colágeno), compuestas por pequeñas fibrillas empaquetadas, que, en consecuencia producen una intensa birrefringencia que va desde el color amarillo al rojo. En el ovario, estas fibras se encontraron distribuidas ampliamente en el estroma, túnica albugínea y médula. En los folículos ováricos, este tipo de fibra se encontró principalmente en la teca externa y en algunas zonas de la teca interna, principalmente alrededor de los vasos sanguíneos. El colágeno tipo III (fibras de reticulina), mostró una leve birrefringencia de un color verdoso localizado principalmente en el tejido conectivo de la teca externa, en contacto con el estroma o en la túnica albugínea del ovario.

La cuantificación de la densidad óptica de los preparados coloreados con Picrosirius, observados con iluminación convencional y evaluando las distintas áreas de la pared folicular mostró diferencias significativas en la densidad óptica en la teca externa de los folículos quísticos con respecto a los folículos terciarios normales, sin diferencias en los otros componentes de la pared (tabla 7, figuras 7 a 10).

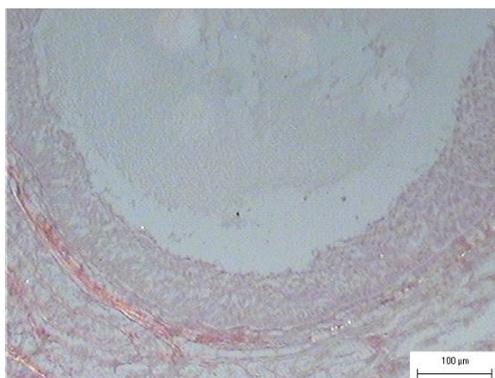


Figura 7. Pared folicular de un quiste coloreada con Picrosirius alcalino visto en el microscopio de luz.



Figura 8. Pared de un quiste coloreada con Picrosirius alcalino visto en el microscopio de luz con polarización. Se ve birrefringencia intensa en la teca externa.

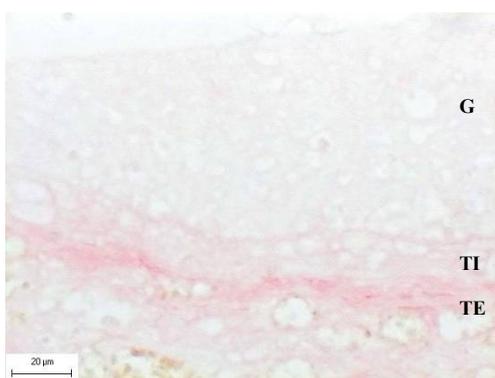


Figura 9. Pared de un folículo terciario coloreada con Picrosirius alcalino visto en el microscopio de luz. (G: granulosa, TI: Teca interna, TE: Teca externa).

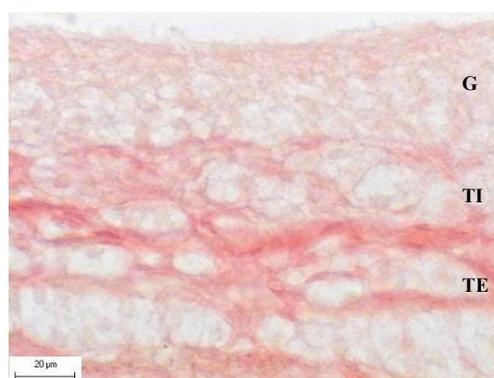


Figura. 10 Pared de un folículo quístico coloreada con Picrosirius alcalino visto en el microscopio de luz. (G: granulosa, TI: Teca interna, TE: Teca externa).

IV.2.2. Distribución del sistema de fibras elásticas

Excepto por la membrana elástica en las arteriolas de pequeño calibre que se encuentran en las tecas, no se detectaron fibras elásticas maduras (coloreadas con la fucsina resorcina de Weigert) en la pared folicular (figuras 11 a 14). Sin embargo, en ambas tecas se encontraron grandes cantidades de fibras relacionadas al sistema elástico: las fibras elaunínicas se encontraron principalmente en los espacios intercelulares de la teca interna y a lo largo de la periferia de los manojos de fibras colágenas en la teca externa. Luego de la oxidación, el método Weigert reveló la presencia de fibras oxitalánicas incluidas en la matriz que rodea las fibras de colágeno

en la teca externa. La distribución fue similar tanto en los folículos normales como en los quísticos.

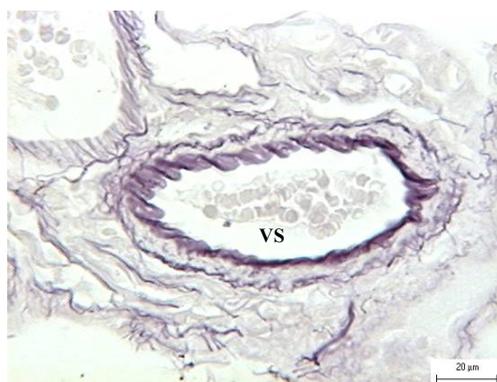


Figura 11. Vaso sanguíneo coloreado con resorcina fucsina de Weigert sin oxidación (VS).

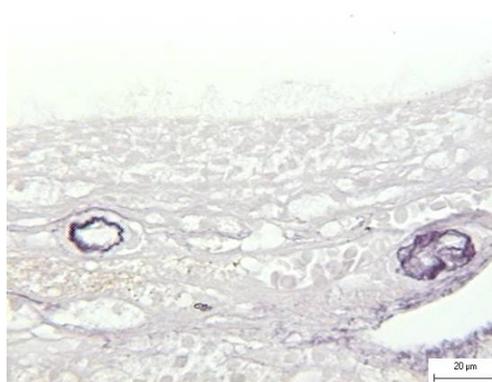


Figura 12. Pared folicular de un quiste coloreada con resorcina fucsina de Weigert sin oxidación.

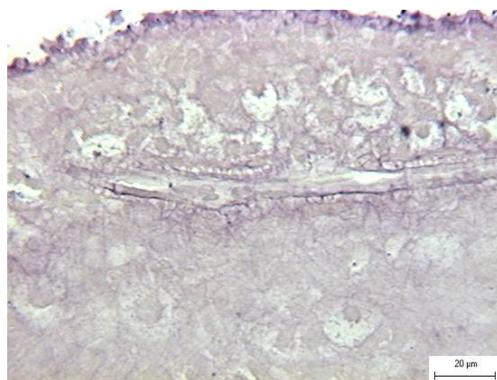


Figura 13. Pared folicular de un folículo terciario coloreada con resorcina fucsina de Weigert con oxidación.

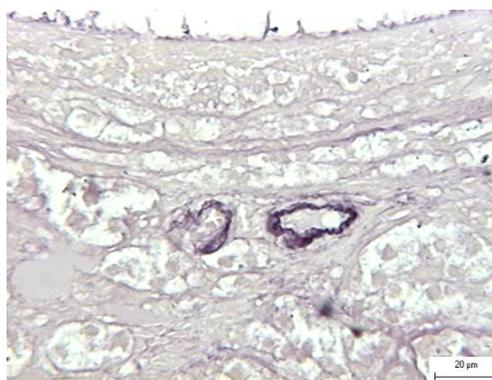


Figura 14. Pared folicular de un quiste coloreada con resorcina fucsina de Weigert con oxidación.

IV.2.3. Cuantificación de PAS

Los hidratos de carbono neutros fueron encontrados en los espacios intercelulares y entre las fibras con el método PAS. Dentro de la pared folicular, la teca externa fue la capa más intensamente coloreada, con un significativo incremento en la tinción en los folículos quísticos. En la capa de células de la granulosa, la densidad óptica fue mas baja en los folículos quísticos. La teca interna presentó una tinción moderada, sin cambios entre los distintos tipos de folículos (tabla 7, figuras 15 y 16).

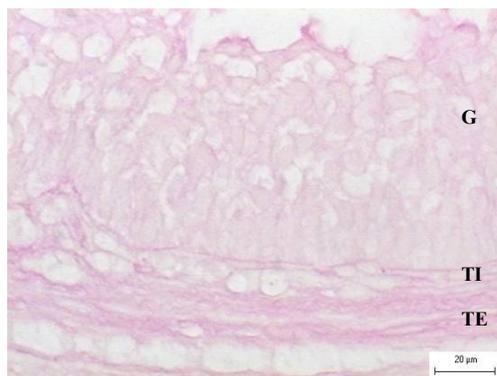


Figura 15. Pared de un folículo terciario coloreado con PAS. (G: granulosa, TI: Teca interna, TE: Teca externa).

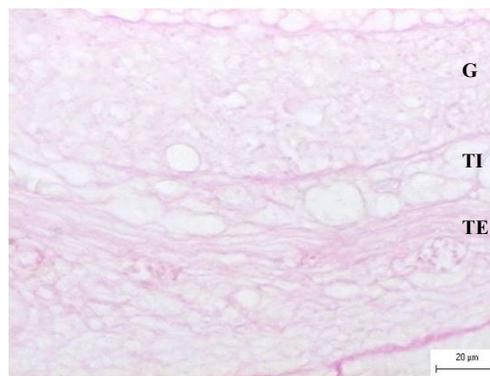


Figura 16. Pared folicular de un quiste coloreado con PAS. (G: granulosa, TI: Teca interna, TE: Teca externa).

IV.2.4. Cuantificación de Alcian Blue

Los GAGs ácidos fueron localizados tanto dentro como fuera de las células mediante el método de Alcian Blue. Dentro de la pared folicular, la capa de células de la granulosa fue la que se coloreó con mayor intensidad en los folículos terciarios normales, con una reducción significativa en la tinción en los folículos quísticos. La teca interna presentó una marcación moderada sin cambios significativos entre las categorías de folículos estudiados. En la teca externa, la densidad óptica fue significativamente mayor en los folículos quísticos con respecto a los folículos terciarios normales (tabla 7, figuras 17 y 18).

El hecho de que la mayor densidad óptica fue obtenida en la concentración 0.3 M de cloruro de magnesio sugiere que la mayor proporción de GAGs presente en estos tejidos corresponde al ácido hialurónico. A tan altas concentraciones molares de cloruro de magnesio, la densidad óptica de la correspondiente alcianofilia fue altamente diferenciable del background de fondo, sugiriendo esto que los GAGs con mayor grado de sulfatación como el condroitín sulfato, el heparán sulfato y el keratán sulfato, están presentes a muy bajas concentraciones si es que están presentes en estos tejidos.

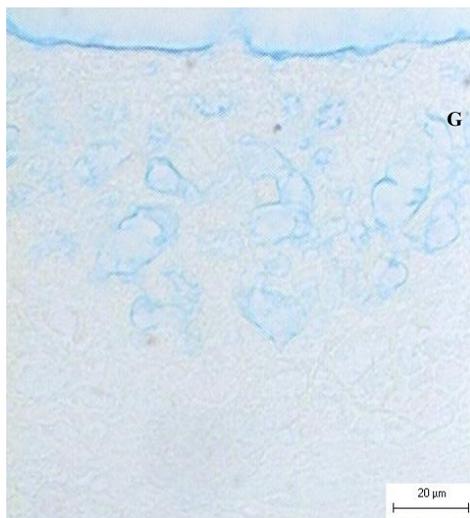


Figura 17. Pared de un folículo terciario coloreado con Alcian Blue 0,3M. (G: granulosa)

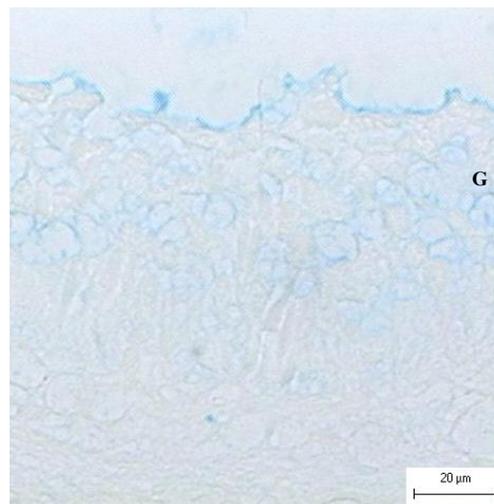


Figura 18. Pared de un folículo quístico coloreado con Alcian Blue 0,3M. (G: granulosa)

Tabla 7: Cuantificación de la densidad óptica en técnicas histoquímicas en las distintas áreas de la pared folicular. (Media +/- DE)

	Picosirius	PAS	Alcian Blue MgCl ₂ 0,3M
Folículos terciarios normales			
Granulosa	3.11 ± 1.35	11.82 ± 1.92 ^b	19.98 ± 3.40 ^d
Teca interna	16.93 ± 7.01	12.70 ± 5.26	3.12 ± 1.77
Teca externa	35.09 ± 7.67 ^a	24.48 ± 4.07 ^c	6.66 ± 1.49 ^e
Folículos quísticos			
Granulosa	3.78 ± 2.69	10.76 ± 1.54 ^b	10.73 ± 2.64 ^d
Teca interna	19.65 ± 7.10	14.74 ± 5.32	4.04 ± 1.83
Teca externa	50.55 ± 7.45 ^a	32.39 ± 4.21 ^c	8.96 ± 1.58 ^e

Letras iguales indican diferencias significativas ^{a, b, d, e} Diferencias p<0,01; ^c Diferencias p<0,05

IV.3. Evaluación de la diferenciación celular

Los resultados de la expresión inmunohistoquímica para cada anticuerpo se encuentran en la tabla 8. Las citoqueratinas mostraron una muy baja expresión en las células de la granulosa en los folículos terciarios del GC (figura 21) mientras que las células de la granulosa de los folículos atresicos (figuras 19 y 20) y quísticos (figura 22) expresaron una alta IHCSA para esta proteína. No se detectó marcación en las células de las tecas.

Como se muestra en las figuras 24 a 26, las células de la granulosa de los folículos quísticos muestran una significativamente aumentada expresión de vimentina con respecto a las mismas células de los folículos terciarios de animales normales. Esta diferencia también fue significativa entre los folículos atrésicos y terciarios normales (figura 23). Las células de la teca interna mostraron una moderada reactividad con este anticuerpo, sin diferencias entre los folículos estudiados. Algunas células de la teca externa mostraron una reactividad débil en los folículos considerados en este estudio.

Tabla 8: Distribución de proteínas inmunoreactivas en la pared folicular ovárica de ratas tratadas y normales*.

	VIM	CKs	DES	NF-200	GFAP	α -SMA
GC						
<i>Folículos terciarios</i>						
Granulosa	7.72 ± 0.86 ^a	0.74 ± 0.51 ^c	-	-	-	-
Teca interna	5.76 ± 3.52	-	0.82 ± 2.35	-	-	-
Teca externa	1.92 ± 1.55	-	8.93 ± 3.12	-	-	11.21 ± 4.56
<i>Folículos atrésicos</i>						
Granulosa	28.09 ± 4.11 ^b	11.80 ± 6.37 ^d	-	-	-	-
Teca interna	6.17 ± 3.25	-	1.56 ± 1.74	-	-	-
Teca externa	1.63 ± 1.26	-	10.21 ± 3.44	-	-	10.33 ± 5.14
GL						
<i>Folículos quísticos</i>						
Granulosa	32.52 ± 6.73 ^b	18.26 ± 5.41 ^d	-	-	-	-
Teca interna	5.76 ± 2.40	-	1.29 ± 2.91	-	-	-
Teca externa	2.24 ± 1.67	-	10.83 ± 2.11	-	-	9.87 ± 4.03
<i>Folículos atrésicos</i>						
Granulosa	34.25 ± 11.97 ^b	16.79 ± 4.23 ^d	-	-	-	-
Teca interna	7.29 ± 2.47	-	1.74 ± 2.58	-	-	-
Teca externa	1.42 ± 1.10	-	11.33 ± 4.05	-	-	12.14 ± 3.91

* Los valores corresponden a la media del Área Marcada por Inmunohistoquímica (*Immunohistochemical Stained Area*: IHCSA) ± DE. Las columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0,01$).

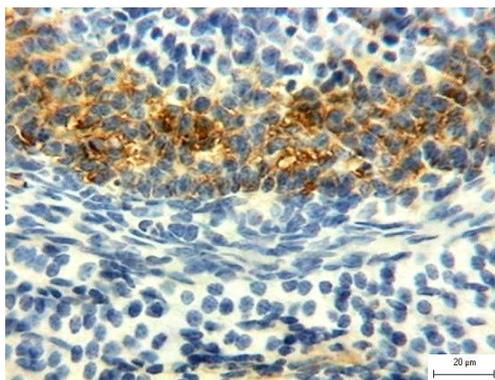


Figura 19. Pared de un folículo atrésico del GC inmunomarcado para citoqueratinas.

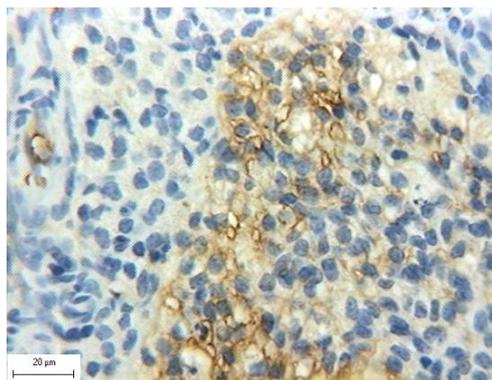


Figura 20. Pared de un folículo atrésico del GC inmunomarcado para citoqueratinas.

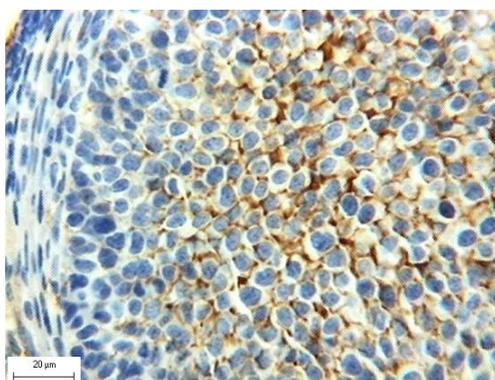


Figura 21. Pared de un folículo terciario del GC inmunomarcado para citoqueratinas.

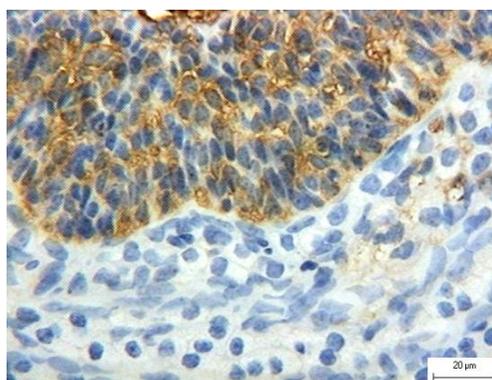


Figura 22. Pared de un folículo quístico del GL inmunomarcado para citoqueratinas.

La localización inmunohistoquímica para desmina estuvo restringida a la capa de células de la teca externa alrededor de los folículos de todas las categorías encontrados en los ovarios de animales del GC como del GL (figuras 27 y 28). En la teca interna también se encontró marcación de distribución irregular, en algunas células y dentro de la pared de los vasos sanguíneos, en las células musculares lisas. En los folículos atrésicos, se observaron acumulaciones de células positivas probablemente correspondientes a restos de vasos sanguíneos. Además, en el ovario se encontró esta proteína en el estroma, túnica albugínea, médula ovárica e irregularmente entre las glándulas intersticiales.

La inmunoreactividad para GFAP y NF fue negativa en la pared folicular de los folículos estudiados. Se observó positividad en algunas zonas de la médula ovárica en donde normalmente se localizan los nervios que entran al ovario, lo que se tomó como control positivo de la técnica.

La α -SMA fue localizada en la zona perifolicular formando una esfera incompleta alrededor de los folículos de las categorías estudiadas (figuras 29 y 30), particularmente en la teca externa y en el estroma que rodea a los folículos. No hubo positividad en las capas de células de la granulosa, ni en la teca interna. En esta última, se encontraron algunas estructuras positivas correspondientes a vasos sanguíneos (figura 31). No hubo diferencias entre los distintos tipos de folículos en el IHCSA.

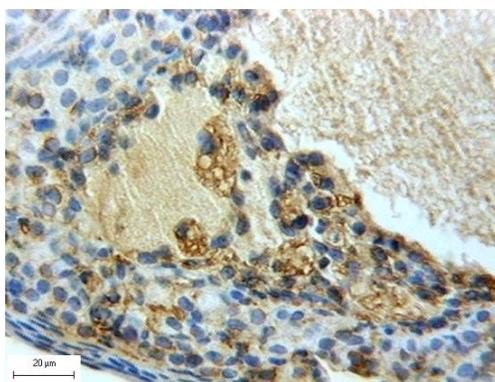


Figura 23. Pared de un folículo atrésico de un animal control inmunomarcado para vimentina.

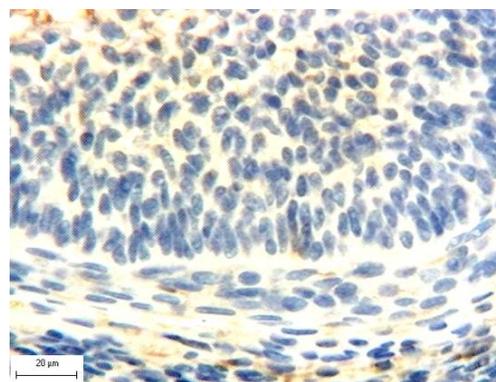


Figura 24. Pared de un folículo terciario de un animal control inmunomarcado para vimentina.

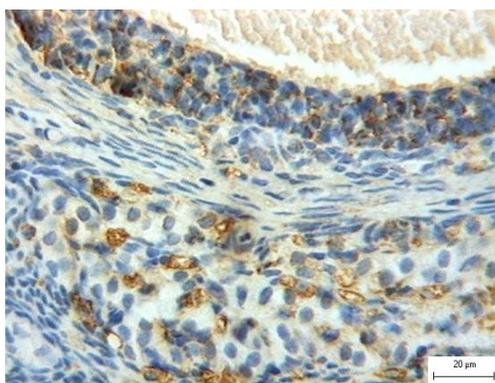


Figura 25. Pared de un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para vimentina.

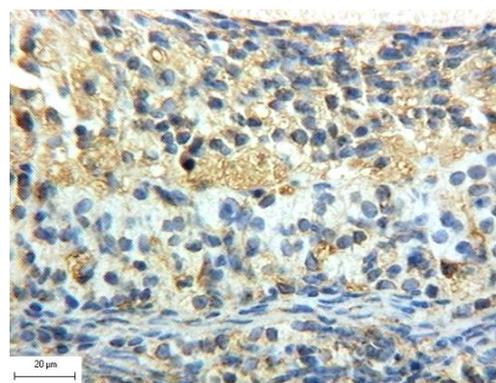


Figura 26. Pared de un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para vimentina.

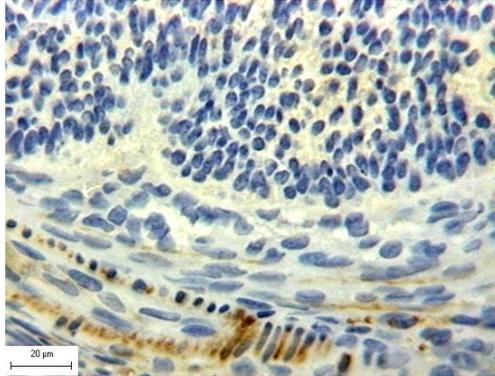


Figura 27. Pared de un folículo terciario de un animal control inmunomarcado para desmina.

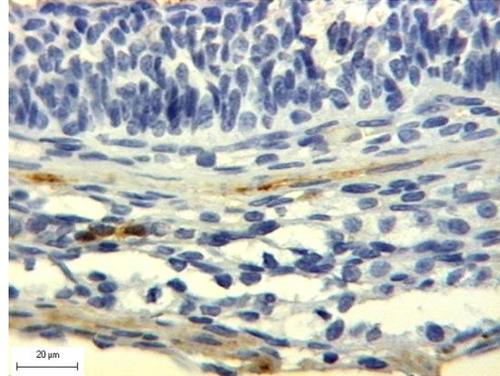


Figura 28. Pared de un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para desmina.

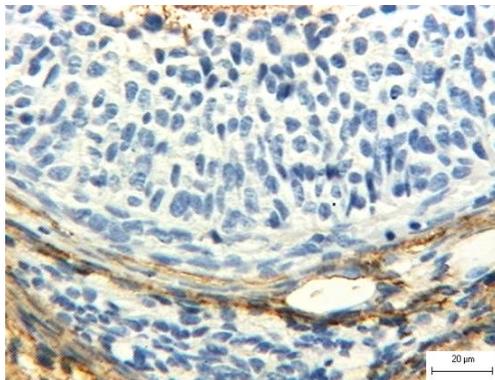


Figura 29. Pared de un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para α -SMA.

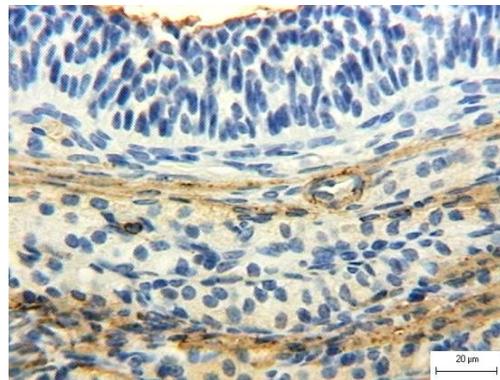


Figura 30. Pared de un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para α -SMA.

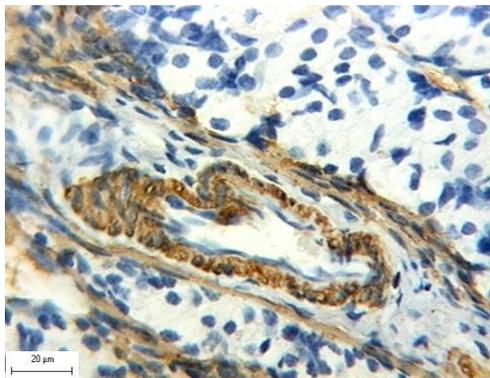


Figura 31. Vaso sanguíneo inmunomarcado para α -SMA.

IV.4. Evaluación de la proliferación celular

Se observaron células marcadas con PCNA en todas las capas foliculares en las categorías estudiadas. El mayor porcentaje de proliferación en cuanto a las células de la granulosa fue encontrado en los folículos terciarios del GC, siendo menor en los folículos terciarios del GL y aún menor en los folículos quísticos (tabla 9, figuras 32 a 34). En la capa de células de la teca interna se encontraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de proliferación siendo mayor en los folículos terciarios de ambos grupos (tabla 9, figuras 32 a 34). No hubo diferencias en la expresión de PCNA en la teca externa, siendo en general muy baja la expresión de esta proteína.

Tabla 9. Porcentaje de proliferación celular evaluado con PCNA en folículos terciarios normales y terciarios y quísticos en animales con COD.

	Granulosa	Teca Interna	Teca Externa
GC			
Folículos terciarios	16,30 ± 2,67 ^a	12,55 ± 3,85 ^d	3,82 ± 1,50
GL			
Folículos terciarios	6,79 ± 2,65 ^b	11,73 ± 3,02 ^d	4,67 ± 2,35
Folículos quísticos	2,60 ± 1,92 ^c	3,97 ± 2,97 ^e	0,90 ± 1,45

Diferencias significativas $p < 0.01$ entre letras distintas ^{a, b, c, d, e}

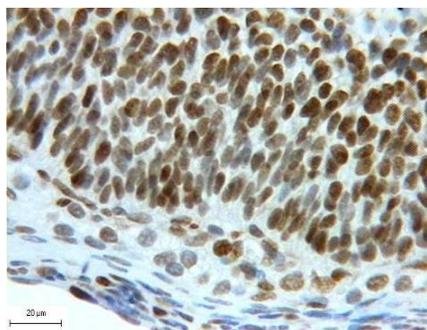


Figura 32. Pared de un folículo terciario del grupo control inmunomarcado para PCNA.

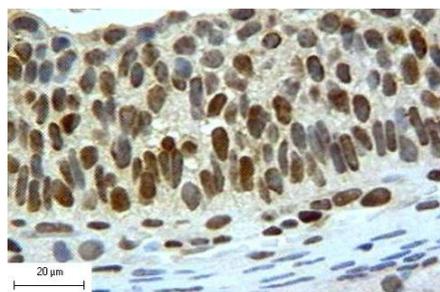


Figura 33. Pared de un folículo terciario del grupo con COD inmunomarcado para PCNA.

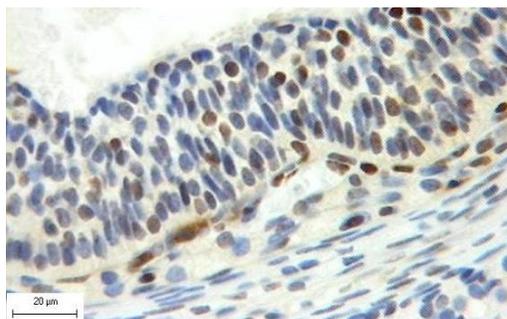


Figura 34. Pared de un folículo quístico del grupo COD inmunomarcado para PCNA.

IV.5. Evaluación de la apoptosis celular

IV.5.1. Proteínas relacionadas con la apoptosis detectadas por inmunohistoquímica

IV.5.1.1. Bax

Los resultados de la inmunomarcación con Bax se muestran en la tabla 10. Se observó marcación en 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 estuvo en la capa de células de la granulosa y de las tecas de los folículos atrésicos I y II en ambos grupos (figura 38). Los folículos terciarios y quísticos del GL mostraron una marcación similar a los folículos terciarios del GC, que fue menor a la de los folículos atrésicos tipo I y II de los dos grupos (figuras 35, 36 y 37). Los folículos atrésicos de tipo III mostraron una muy escasa marcación en ambos grupos, siendo esta similar a la de los folículos terciarios. En la teca interna se encontró una elevada marcación con bax en los folículos terciarios, atrésicos tipo II y III del grupo COD, así como también en los folículos III del grupo control. No hubo diferencias en la expresión de bax en la teca externa.

Tabla 10. IHCSA para la proteína Bax en las distintas capas de folículos de animales con COD y normales (Media +/- DE).

	Granulosa	Teca Interna	Teca Externa
GC			
Folículos terciarios	1,41 ± 0,29 ^a	1,81 ± 0,67 ^c	0,31 ± 0,28
Folículos atrésicos I	8,44 ± 6,43 ^b	4,45 ± 2,99 ^c	0,64 ± 0,74
Folículos atrésicos II	7,20 ± 6,73 ^b	4,26 ± 2,38 ^c	1,99 ± 3,83
Folículos atrésicos III	5,04 ± 1,58 ^a	7,17 ± 6,95 ^d	1,74 ± 2,02
GL			
Folículos terciarios	1,94 ± 1,32 ^a	10,66 ± 3,41 ^d	2,90 ± 0,43
Folículos quísticos	2,09 ± 1,24 ^a	5,21 ± 3,74 ^c	1,97 ± 2,29
Folículos atrésicos I	7,30 ± 0,01 ^b	3,15 ± 0,13 ^c	1,72 ± 0,01
Folículos atrésicos II	7,47 ± 3,48 ^b	7,30 ± 2,64 ^d	4,23 ± 2,77
Folículos atrésicos III	5,65 ± 4,15 ^a	14,41 ± 3,24 ^e	1,07 ± 0,83

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

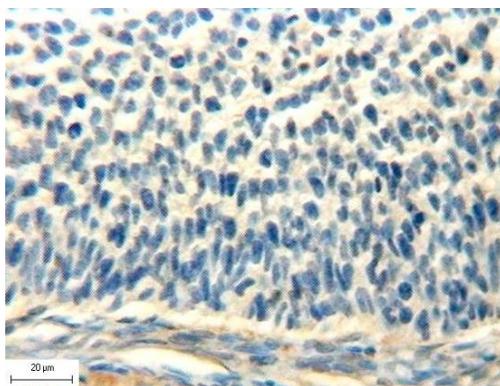


Figura 35. Pared en un folículo terciario de un animal del GC inmunomarcado para bax.

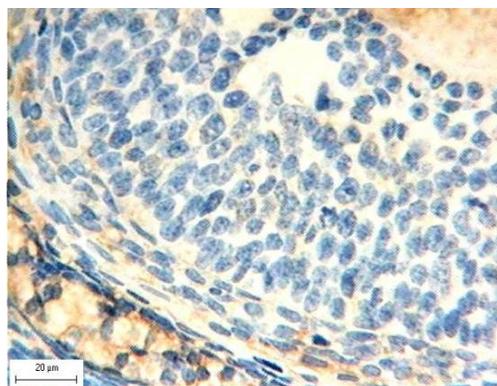


Figura 36. Pared en un folículo terciario de un animal del GL inmunomarcado para bax.

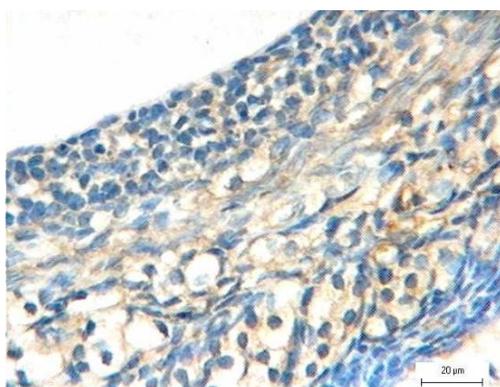


Figura 37. Pared en un folículo quístico de un animal del GL inmunomarcado para bax.

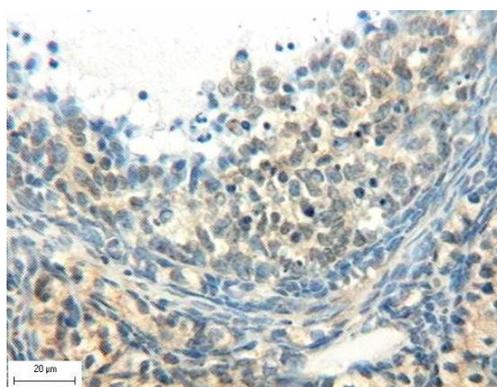


Figura 38. Pared en un folículo atrésico tipo II de un animal del GL inmunomarcado para bax.

IV.5.1.2. Bcl-2

Los resultados de la expresión de bcl-2 se muestran en la tabla 11. Todas las células presentaron marcación 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 de todas las categorías (figuras 39 a 42). Con respecto a la teca interna, los resultados fueron similares, observándose una mayor expresión en las células de los folículos atrésicos tipo III del GC. En la teca externa, la más alta expresión fue observada en los folículos atrésicos tipo III del GC.

Tabla 11. IHCSA de la proteína Bcl-2 en las distintas capas foliculares de animales con COD y normales (Media +/- DE).

	Granulosa	Teca Interna	Teca Externa
GC			
Folículos terciarios	18,08 ± 7,29 ^a	6,98 ± 2,50 ^c	2,00 ± 1,20 ^f
Folículos atrésicos I	4,29 ± 1,20 ^b	1,89 ± 2,23 ^d	0,33 ± 0,35 ^f
Folículos atrésicos II	4,37 ± 1,79 ^b	1,66 ± 0,68 ^d	0,99 ± 0,98 ^f
Folículos atrésicos III	7,08 ± 5,38 ^b	15,49 ± 5,70 ^e	4,70 ± 3,85 ^g
GL			
Folículos terciarios	14,95 ± 6,18 ^a	5,01 ± 2,09 ^c	2,26 ± 1,31 ^{fg}
Folículos quísticos	15,10 ± 3,62 ^a	7,64 ± 1,89 ^c	2,50 ± 1,49 ^{fg}
Folículos atrésicos I	2,79 ± 0,26 ^b	1,51 ± 0,09 ^d	0,70 ± 0,10 ^f
Folículos atrésicos II	4,19 ± 1,56 ^b	3,24 ± 3,36 ^d	2,00 ± 2,80 ^f
Folículos atrésicos III	3,75 ± 1,55 ^b	1,77 ± 0,37 ^d	1,12 ± 0,30 ^f

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

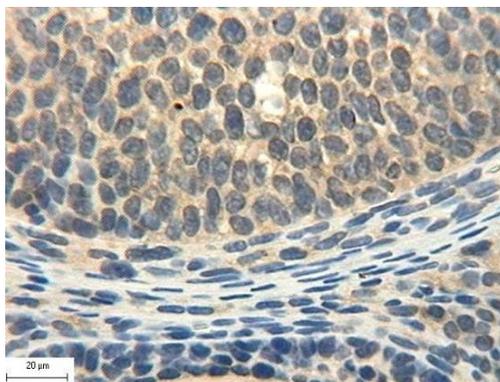


Figura 39. Pared en un folículo terciario de un animal normal inmunomarcado para bcl-2

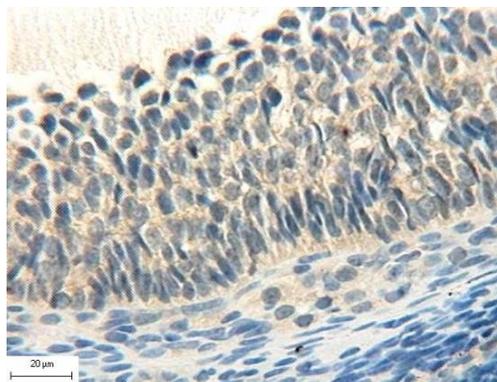


Figura 40. Pared en un folículo terciario de un animal con COD inmunomarcado para bcl-2

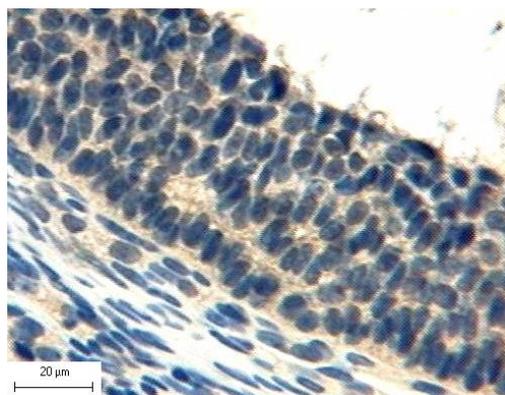


Figura 41. Pared en un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para bcl-2

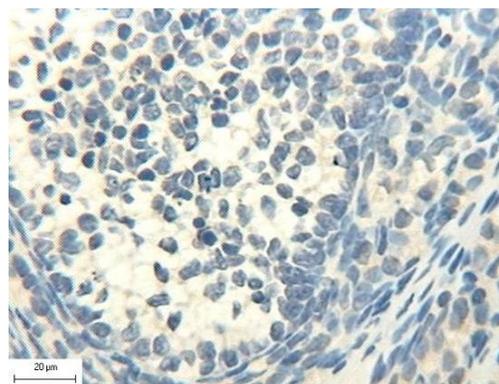


Figura 42. Pared en un folículo atrésico tipo I de un animal con COD inmunomarcado para bcl-2.

IV.5.1.3. Caspasa-3 activa

Se observó marcación para caspasa-3 tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células (tabla 12). En las células de la granulosa, la marcación mas intensa se encontró en las células de los folículos atrésicos tipo I y II, siendo menor tanto en los folículos atrésicos tipo III como en los terciarios y quísticos de ambos grupos (figuras 43 a 46).

Tabla 12. Porcentaje de células marcadas con caspasa-3 en las distintas capas foliculares en las diferentes categorías de folículos en animales control y con COD (Media +/- DE).

	Granulosa	Teca Interna	Teca Externa
GC			
Folículos terciarios	2,75 ± 2,03 ^a	8,84 ± 5,20 ^d	1,38 ± 1,13
Folículos atrésicos I	11,39 ± 1,97 ^b	18,96 ± 2,77 ^c	0,00 ± 0,00
Folículos atrésicos II	15,09 ± 3,31 ^b	8,04 ± 1,97 ^d	2,08 ± 4,17
Folículos atrésicos III	12,45 ± 3,45 ^b	8,92 ± 3,34 ^d	2,64 ± 1,81
GL			
Folículos terciarios	4,68 ± 2,12 ^a	6,72 ± 4,18 ^d	2,33 ± 1,67
Folículos quísticos	3,46 ± 0,93 ^a	6,63 ± 3,87 ^d	1,80 ± 2,07
Folículos atrésicos I	14,16 ± 5,88 ^b	16,47 ± 2,16 ^c	0,00 ± 0,00
Folículos atrésicos II	24,09 ± 12,36 ^c	16,63 ± 4,92 ^c	3,97 ± 0,65
Folículos atrésicos III	8,91 ± 4,06 ^b	6,60 ± 5,72 ^d	0,00 ± 0,00

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En la teca interna, se observó una mayor expresión en los folículos atrésicos tipo I en ambos grupos y tipo II del grupo de animales tratados. La marcación en la teca externa fue relativamente baja sin diferencias significativas entre las distintas categorías foliculares ni entre los grupos.

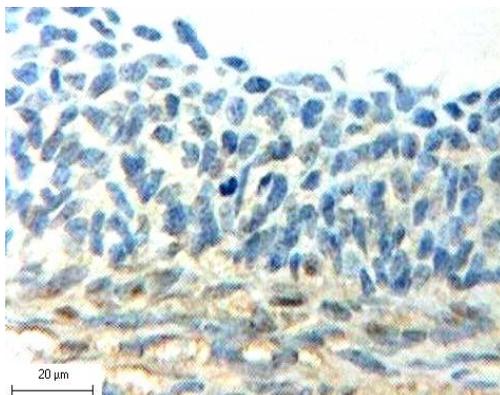


Figura 43. Pared en un folículo terciario de un animal normal inmunomarcado para caspasa-3 activa

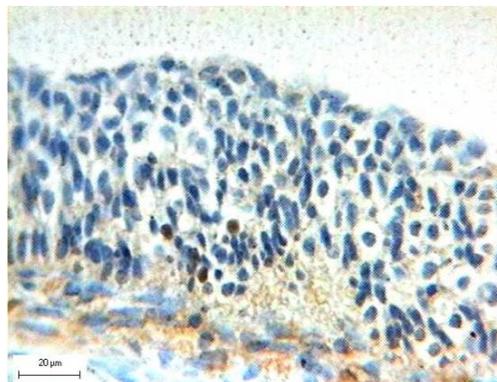


Figura 44. Pared en un folículo terciario de un animal con COD inmunomarcado para caspasa-3 activa

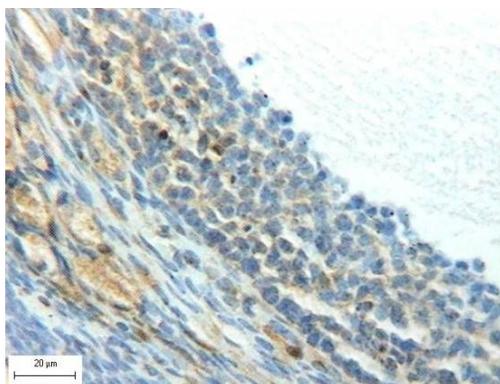


Figura 45. Pared en un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para caspasa-3 activa.

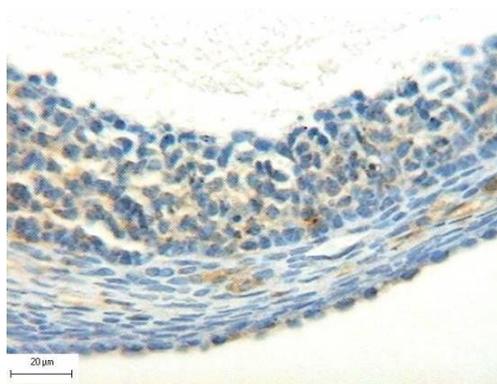


Figura 46. Pared en un folículo quístico de un animal con COD inmunomarcado para caspasa-3 activa.

IV.5.2. Detección *in situ* de la apoptosis (TUNEL)

Los folículos atrésicos tipo II de ambos grupos fueron los que presentaron mayores porcentajes de células apoptóticas en la capa de células de la granulosa y en la teca interna (figura 48 y 49). En las células de la granulosa, los folículos terciarios del GC (figura 47) presentaron muy escaso porcentaje de células positivas con respecto a los folículos quísticos del grupo tratado, sin diferencias entre los folículos terciarios de

ambos grupos (figura 50). Los folículos atrésicos de tipo II del GL presentaron los mayores índices de células marcadas. En cuanto a la teca interna fueron estos últimos los que presentaron un mayor porcentaje con respecto a las demás categorías foliculares. No hubo diferencias entre los grupos en las células de la teca externa, siendo el porcentaje de células positivas muy bajo (Tabla 13).

Tabla 13. Porcentaje de células apoptóticas detectadas *in situ* mediante TUNEL en las capas foliculares en ovarios de animales normales vs animales con COD (Media +/- DE).

	Granulosa	Teca Interna	Teca Externa
GC			
Folículos terciarios	0,46 ± 0,36 ^a	0,22 ± 0,50 ^d	0,12 ± 0,26
Folículos atrésicos I	5,06 ± 1,50 ^a	0,50 ± 0,49 ^d	0,27 ± 0,54
Folículos atrésicos II	13,16 ± 1,30 ^c	1,83 ± 1,16 ^d	0,54 ± 0,27
Folículos atrésicos III	9,13 ± 2,92 ^a	1,86 ± 0,66 ^d	0,48 ± 0,45
GL			
Folículos terciarios	2,89 ± 1,24 ^{ab}	3,41 ± 2,38 ^d	0,28 ± 0,56
Folículos quísticos	9,33 ± 2,31 ^b	1,97 ± 0,34 ^d	0,28 ± 0,41
Folículos atrésicos I	5,59 ± 1,30 ^a	0,66 ± 0,45 ^d	0,00 ± 0,00
Folículos atrésicos II	20,15 ± 5,87 ^c	3,82 ± 2,10 ^e	0,00 ± 0,00
Folículos atrésicos III	7,09 ± 3,11 ^a	1,62 ± 1,86 ^d	0,12 ± 0,28

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

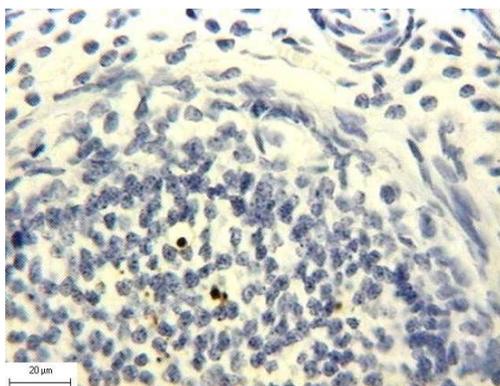


Figura 47. Detección *in situ* de apoptosis en la pared en un folículo terciario de un animal control.

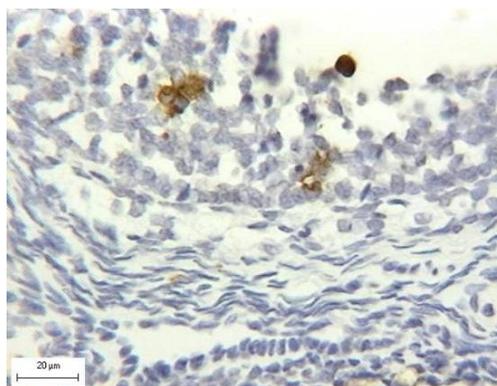


Figura 48. Detección *in situ* de apoptosis en la pared en un folículo atrésico tipo I de un animal control.

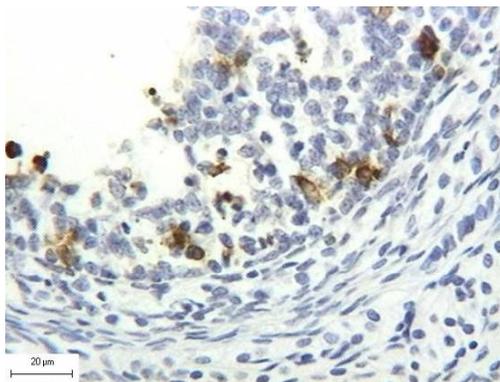


Figura 49. Detección *in situ* de apoptosis en la pared en un folículo atrésico tipo II de un animal control.

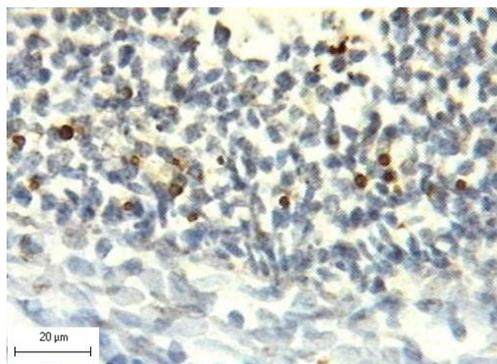


Figura 50. Detección *in situ* de apoptosis en la pared en un folículo quístico de un animal con COD.

IV.6. Expresión de receptores hormonales y proteínas de golpe de calor.

IV.6.1. Receptores de estrógenos.

IV.6.1.1. Receptores de estrógenos α .

IV.6.1.1.1. Inmunohistoquímica

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 las glándulas intersticiales, en el epitelio de cubierta del ovario y en las células luteales. Tanto los núcleos como los citoplasmas celulares mostraron marcación con el anticuerpo usado. En general las células de la teca interna y las glándulas intersticiales mostraron la marcación nuclear mas intensa (figura 51), variando de moderada a leve en el resto de las células. En el GC, los folículos en crecimiento primarios y secundarios pequeños (figura 52) mostraron una elevada marcación en las células de la granulosa la cual fue disminuyendo en tanto aumentaba el tamaño folicular, siendo mas baja en los folículos terciarios (figura 53). Hubo expresión en todas las categorías de folículos atrésicos estudiados. Las células de la teca interna presentaron una marcación intensa sin diferencias significativas entre las distintas categorías de folículos en los animales

control observándose solo una mayor expresión en los folículos atrésicos tipo III avanzados con respecto a los folículos en crecimiento y otras categorías de folículos atrésicos. Se hallaron diferencias significativas en la expresión de RE α entre ambos grupos estudiados (tabla 14).

Tabla 14. Porcentaje de área inmunomarcada con RE α en la pared folicular en las diferentes categorías de folículos en crecimiento en GC y GL (Media \pm DE).

	Granulosa	Teca Interna
GC		
Folículos primarios	62,70 \pm 13,09 ^a	-
Folículos secundarios pequeños	30,60 \pm 14,54 ^b	-
Folículos secundarios medianos	30,40 \pm 10,26 ^b	26,20 \pm 6,96 ^{fh}
Folículos secundarios grandes	19,13 \pm 10,79 ^b	18,97 \pm 6,85 ^{fh}
Folículos terciarios	21,79 \pm 9,08 ^c	27,06 \pm 6,34 ^f
Folículos atrésicos I	17,13 \pm 3,68 ^c	19,15 \pm 10,49 ^{fh}
Folículos atrésicos II	22,86 \pm 4,21 ^c	23,24 \pm 6,90 ^{fh}
Folículos atrésicos III	21,77 \pm 12,16 ^c	20,67 \pm 8,33 ^{fh}
Folículos atrésicos III avanzados	26,31 \pm 10,12 ^{bc}	32,46 \pm 12,36 ^{ef}
GL		
Folículos primarios	61,80 \pm 15,17 ^a	-
Folículos secundarios pequeños	47,09 \pm 23,89 ^{de}	-
Folículos secundarios medianos	47,22 \pm 22,81 ^{de}	27,78 \pm 20,49 ^{fh}
Folículos secundarios grandes	27,98 \pm 5,58 ^{ce}	16,41 \pm 13,73 ^{fh}
Folículos terciarios	50,58 \pm 17,06 ^{de}	15,42 \pm 7,06 ^h
Folículos quísticos	39,07 \pm 9,72 ^e	21,02 \pm 9,35 ^{fh}
Folículos atrésicos I	15,67 \pm 0,62 ^c	23,21 \pm 6,28 ^{fgh}
Folículos atrésicos II	52,29 \pm 3,77 ^e	30,66 \pm 13,64 ^{gh}
Folículos atrésicos III	14,96 \pm 10,81 ^c	32,65 \pm 24,78 ^{gh}
Folículos atrésicos III avanzados	48,67 \pm 14,94 ^e	41,82 \pm 13,31 ^g

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Los folículos en crecimiento pequeños y medianos del grupo de GL presentaron una mayor expresión de RE α en las células de la granulosa que los correspondientes folículos del GC. No hubo diferencias entre los grupos en la categoría folículos secundarios grandes. El mayor porcentaje de marcación se encontró en las capa de células de la granulosa de los folículos terciarios de los animales del GL con respecto a las demás categorías de folículos en crecimiento de ambos grupos. Los folículos

quísticos presentaron una mayor marcación de su capa de células de la granulosa con respecto a los folículos terciarios del GC (figura 54). En la teca interna solo se encontraron diferencias significativas entre los folículos terciarios de ambos grupos, siendo mayor en el grupo tratado. Además, para ambos grupos la mayor expresión fue vista en la capa teca interna de los folículos atrésicos tipo III avanzados, en relación a las demás categorías de folículos. Los resultados están detallados en la tabla 14.

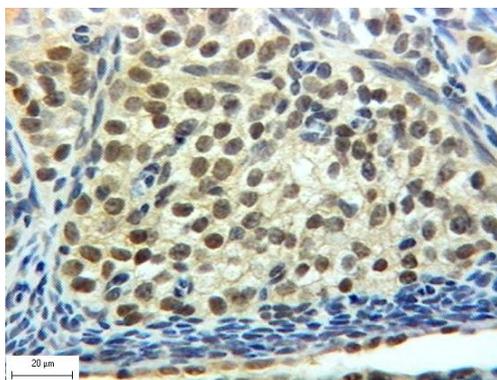


Figura 51. Glándulas intersticiales de un ovario control marcadas para RE α .

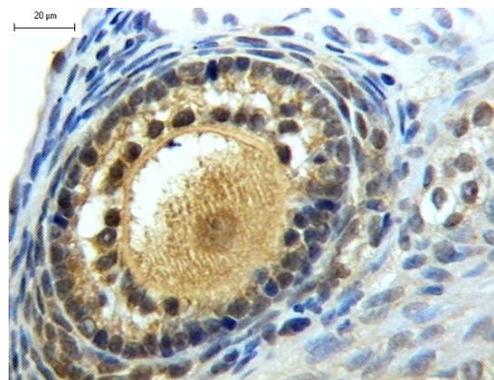


Figura 52. Folículo secundario pequeño de un animal control inmunomarcado para RE α .

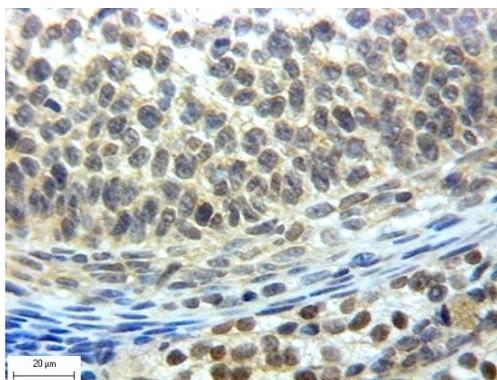


Figura 53. Pared de un folículo terciario de un animal control marcada para RE α .

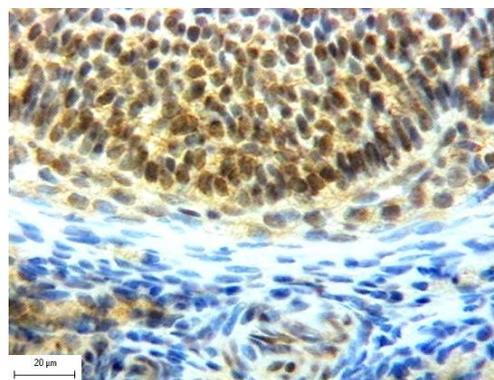


Figura 54. Pared de un folículo quístico de un animal con COD marcada para Re α .

IV.6.1.1.2. Western blot

La inmunomarcación de las membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo 1D5 dio como resultado la identificación de una banda nítida a nivel de las proteínas de 66

kDa de peso. A simple vista se observaron diferencias entre ambos grupos las que fueron corroboradas por el análisis estadístico. Hubo una mayor marcación en los animales tratados con respecto a los animales control ($p < 0,05$) (figura 55).

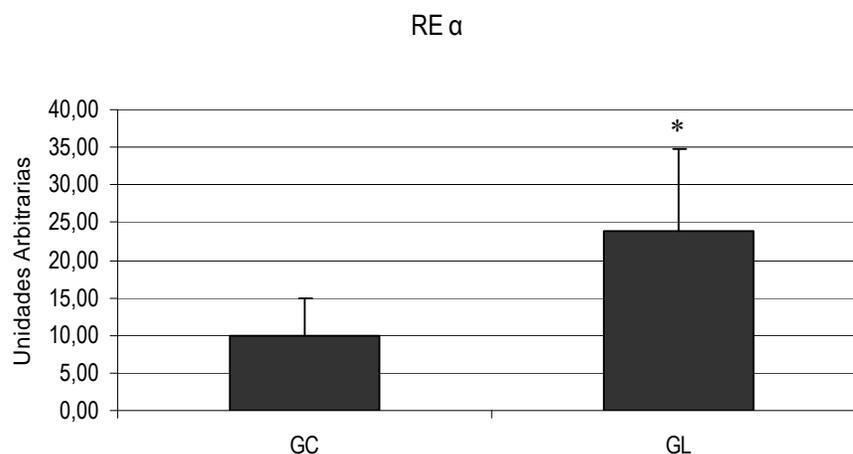


Figura 55. Niveles de marcación con RE α por inmunoblotting en muestras de ovarios completos de animales del GC y de GL.*Diferencias significativas $p < 0,05$.

IV.6.1.2. Receptores de estrógenos β .

IV.6.1.2.1. Inmunohistoquímica

Con el anticuerpo utilizado se observó marcación en los núcleos de las células foliculares y granulosas de las distintas categorías de folículos, tanto sanos como atrésicos (tabla 15). No hubo marcación en las células luteales, estromales, glándulas intersticiales ni en el epitelio de cubierta ovárico. Se observó escasa marcación de algunas células de la teca interna. Se encontraron diferencias en la expresión del RE β entre las distintas categorías de folículos de los animales control siendo la mayor expresión detectada en la capa de células granulosas de los folículos secundarios medianos y grandes y terciarios con respecto a los folículos en crecimiento primarios y secundarios pequeños (figuras 56, 57 y 59). Los folículos atrésicos tipo I y III

avanzados presentaron una mayor expresión que las otras categorías de folículos atrésicos en el grupo control, similar a la de los pequeños folículos en crecimiento (figura 58). En los ovarios de los animales de GL se evidenciaron diferencias significativas en la expresión, siendo en general menor que en los ovarios de GC. Los folículos en crecimiento: primarios, secundarios y terciarios presentaron una menor expresión con respecto a las mismas categorías de folículos de los animales control (figuras 60 a 62). Los folículos quísticos presentaron la menor expresión de RE β que todas las otras categorías de folículos de ambos grupos (figura 63). Los resultados se encuentran en la tabla 15.

Tabla 15. Porcentaje de área inmunomarcada con RE β en la granulosa de la pared folicular en las diferentes categorías de folículos en crecimiento en GC y GL (Media +/-DE).

GC	Granulosa
Folículos primarios	38,27 \pm 14,18 ^a
Folículos secundarios pequeños	53,78 \pm 10,92 ^b
Folículos secundarios medianos	60,69 \pm 12,71 ^c
Folículos secundarios grandes	67,07 \pm 7,69 ^c
Folículos terciarios	65,20 \pm 10,73 ^c
Folículos atrésicos I	48,10 \pm 19,1 ^b
Folículos atrésicos II	22,45 \pm 11,80 ^d
Folículos atrésicos III	4,77 \pm 2,81 ^{eg}
Folículos atrésicos III avanzados	42,74 \pm 11,98 ^b
GL	
Folículos primarios	21,12 \pm 15,20 ^d
Folículos secundarios pequeños	36,26 \pm 19,08 ^a
Folículos secundarios medianos	26,23 \pm 20,40 ^d
Folículos secundarios grandes	26,83 \pm 18,55 ^d
Folículos terciarios	18,80 \pm 11,35 ^f
Folículos quísticos	0,85 \pm 1,06 ^g
Folículos atrésicos I	29,39 \pm 9,96 ^a
Folículos atrésicos II	7,11 \pm 8,11 ^c
Folículos atrésicos III	5,23 \pm 4,92 ^{eg}
Folículos atrésicos III avanzados	44,74 \pm 19,11 ^b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

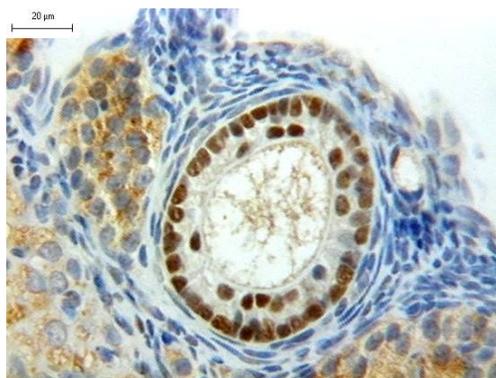


Figura 56. Folículo secundario pequeño de un animal del GC marcado para RE β.

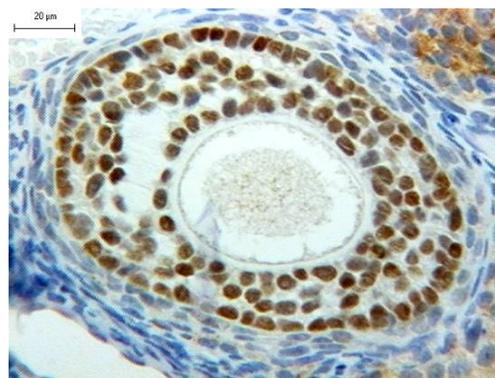


Figura 57. Folículo secundario mediano de un animal del GC marcado para RE β.

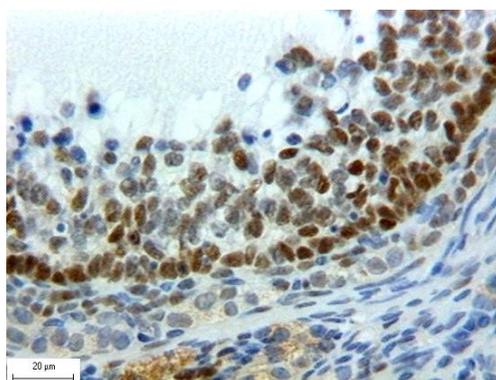


Figura 58. Folículo atrésico de un animal del GC marcado para RE β.

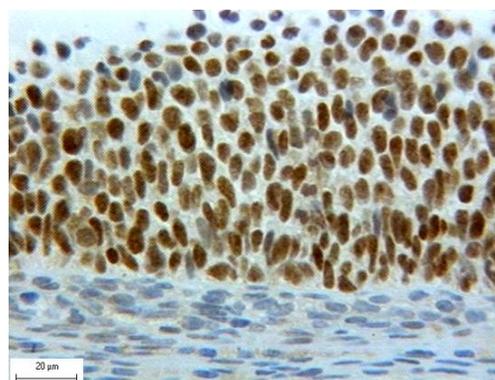


Figura 59. Pared de un folículo terciario de un animal del GC marcado para RE β.

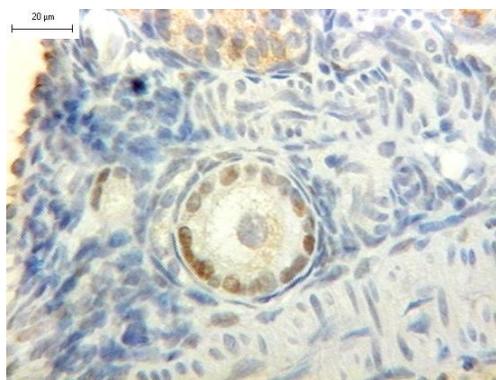


Figura 60. Folículo primario de un animal del GL marcado para RE β.

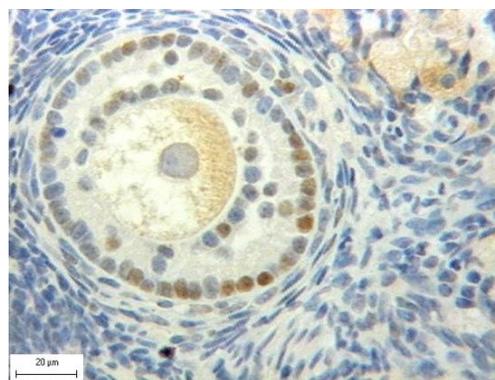


Figura 61. Folículo secundario pequeño de un animal del GL marcado para RE β.

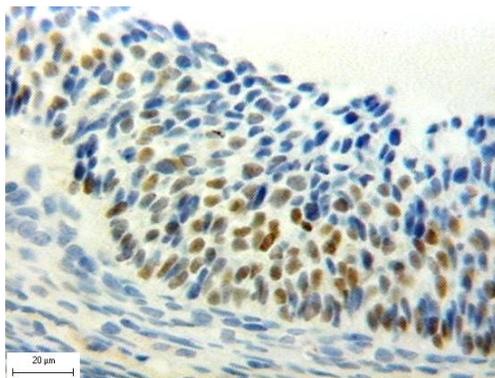


Figura 62. Pared folicular de un folículo terciario de un animal del GL marcado para RE β .

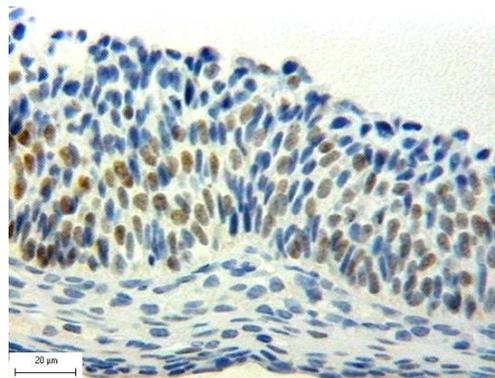


Figura 63. Pared de un folículo quístico de un animal del GL marcado para RE β .

IV.6.1.2.2. Western blot

La inmunomarcación de las membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo anti-RE β mostró una banda única a nivel de 56 kDa. Hubo una mayor expresión en las muestras del GC con respecto a las muestras de animales de GL ($p < 0,05$) (figura 64).

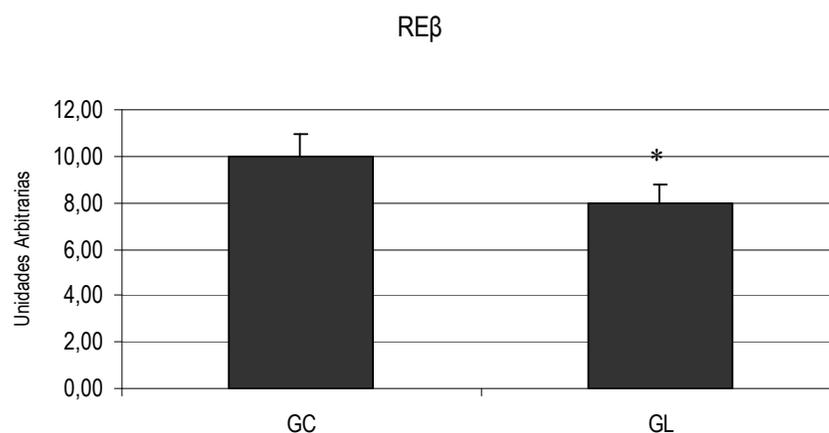


Figura 64. Niveles de marcación con RE β por inmunoblotting en muestras de ovarios completos de animales del GC y de GL.*Diferencias significativas $p < 0,05$.

IV.6.2. Receptores de progesterona.

IV.6.2.1. Inmunohistoquímica

El anticuerpo utilizado permitió detectar células que expresan RP en el ovario de animales del GC como GL (tabla 16). La expresión fue detectada tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todos los folículos que integran el ovario, en la teca externa y el estroma se detectó una leve marcación en algunas células. También se marcaron las células de las glándulas intersticiales, células luteales, y de la cubierta ovárica. La marcación fue homogénea en todas las categorías de folículos del GC, encontrándose una mayor expresión en los tipos de folículos atrésicos mas avanzados.

Tabla 16. Porcentaje de área inmunomarcada con RP en la pared folicular en las diferentes categorías de folículos en crecimiento en GC y GL (Media +/-DE).

	Granulosa	Teca Interna
GC		
Folículos primarios	17,86 ± 14,78 ^{ac}	-
Folículos secundarios pequeños	1,86 ± 1,46 ^{ac}	-
Folículos secundarios medianos	26,40 ± 19,10 ^{ac}	1,99 ± 1,86 ^d
Folículos secundarios grandes	36,93 ± 23,67 ^{ac}	6,13 ± 6,92 ^{de}
Folículos terciarios	35,45 ± 17,67 ^a	10,29 ± 6,35 ^e
Folículos atrésicos I	39,32 ± 15,93 ^{ac}	1,59 ± 1,37 ^d
Folículos atrésicos II	20,27 ± 16,15 ^{ac}	1,40 ± 1,67 ^d
Folículos atrésicos III	22,35 ± 15,73 ^{ac}	4,25 ± 2,66 ^d
Folículos atrésicos III avanzados	36,71 ± 14,42 ^{ac}	10,18 ± 9,01 ^e
GL		
Folículos primarios	0,01 ± 0,01 ^c	-
Folículos secundarios pequeños	0,19 ± 0,10 ^c	-
Folículos secundarios medianos	57,87 ± 16,35 ^b	1,08 ± 1,18 ^d
Folículos secundarios grandes	29,38 ± 23,24 ^{ac}	1,89 ± 1,75 ^{de}
Folículos terciarios	17,24 ± 18,58 ^c	2,43 ± 2,71 ^d
Folículos quísticos	7,47 ± 9,96 ^c	2,85 ± 3,35 ^d
Folículos atrésicos I	24,64 ± 10,68 ^{ac}	7,15 ± 5,39 ^{de}
Folículos atrésicos II	17,59 ± 15,61 ^{ac}	9,54 ± 5,93 ^{de}
Folículos atrésicos III	15,43 ± 17,36 ^c	2,25 ± 2,44 ^d
Folículos atrésicos III avanzados	65,79 ± 17,48 ^b	19,71 ± 14,49 ^f

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Las células de la granulosa de los folículos secundarios medianos del GL presentaron una intensa marcación la cual fue superior a la presentada por todos los folículos en crecimiento del GC (figura 65). Los folículos en crecimiento terciarios del GC presentaron una mayor expresión que los folículos terciarios y quísticos del GL (figura 66 y 68). Los folículos atrésicos de tipo III avanzados presentaron una intensa marcación en ambos grupos (figura 67).

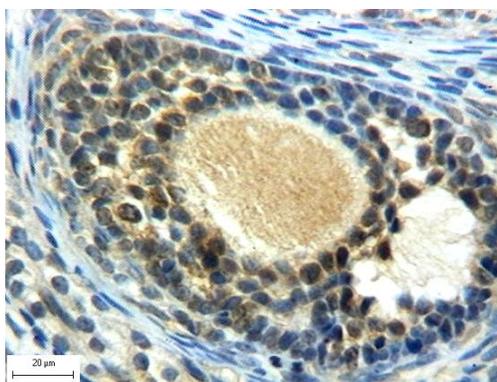


Figura 65. Folículo secundario mediano de un animal control marcado para RP.

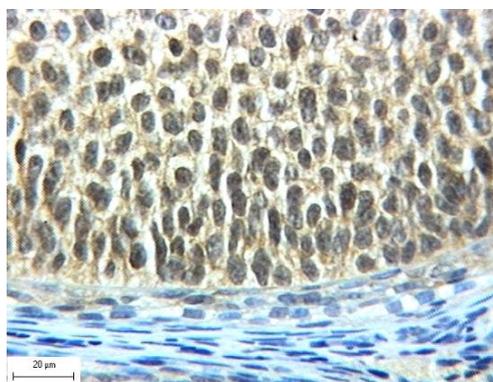


Figura 66. Pared de un folículo terciario de un animal control marcado para RP.

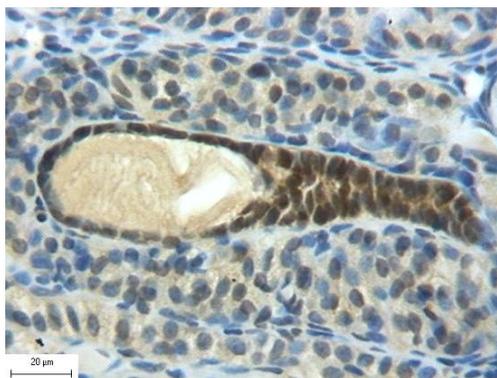


Figura 67. Folículo atrésico tipo III avanzado de un animal control marcado para PR.

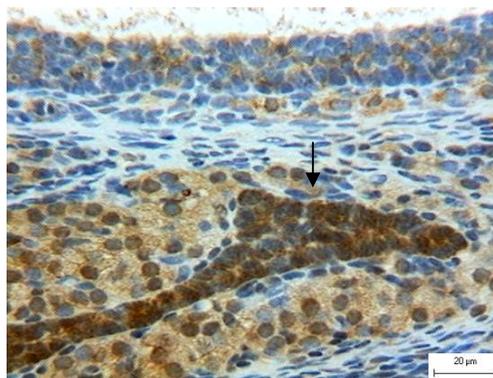


Figura 68. Pared de un folículo quístico de un animal con COD marcado para RP. Se observa un folículo atrésico tipo III intensamente marcado (flecha).

Las células de la teca interna de los folículos terciarios mostraron una mayor inmunomarcación que las células de los folículos terciarios y quísticos de los animales tratados. Los folículos atrésicos tipo III avanzados del grupo COD presentaron la mas

alta marcación con respecto al resto de las categorías foliculares de ambos grupos. Todos los datos se detallan en la tabla 16.

IV.6.2.2. Western blot

El análisis de las membranas de nitrocelulosa inmunomarcadas con el anticuerpo anti-PR demostró diferencias significativas entre ambos grupos de animales.

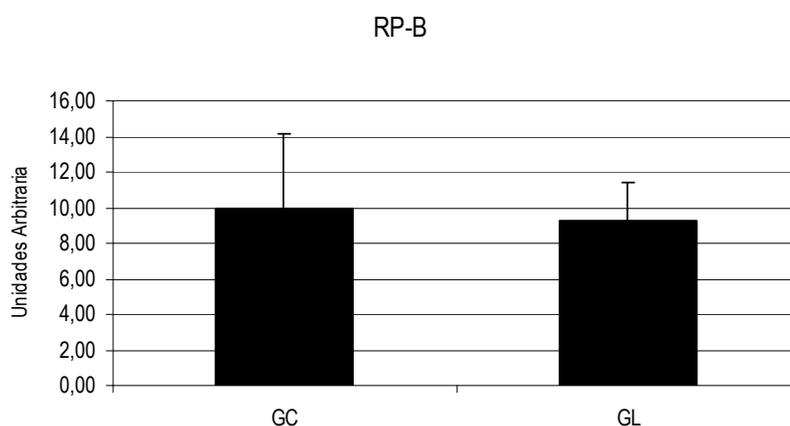


Figura 69. Niveles de marcación para PR-B por inmunoblotting en muestras de ovarios completos de animales del GC y de GL.

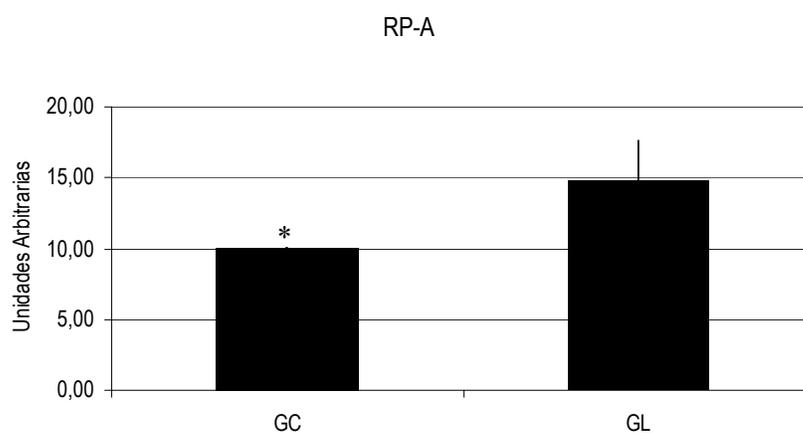


Figura 70. Niveles de marcación para PR-A por inmunoblotting en muestras de ovarios completos de animales del GC y de GL. *Diferencias significativas $p < 0,05$.

La isoforma correspondiente al RP-B no evidenció diferencias entre los grupos (Figura 69). Sin embargo, las otras dos isoformas mostraron diferencias, siendo mayor la expresión de RP-A (figura 70) y menor la de PR-C en el GL (figura 71) con respecto al GC.

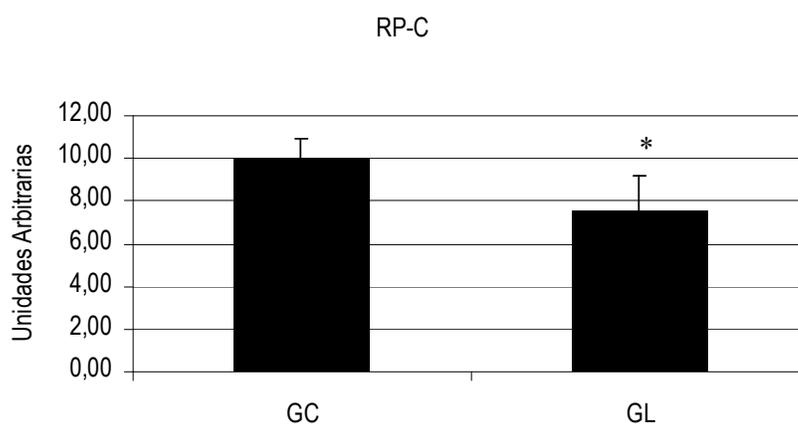


Figura 71. Niveles de marcación para PR-C por inmunoblotting en muestras de ovarios completos de animales del GC y de GL.*Diferencias significativas $p < 0,05$.

IV.6.3. Proteína de Golpe de calor 70 (HSP70)

IV.6.3.1. Inmunohistoquímica

La HSP70 se expresó intensamente en todas las células que integran el ovario, tanto en el citoplasma como en el núcleo. La expresión en los folículos ováricos de los animales de GC fue mayor en aquellos que presentaban algún grado de atresia siendo mayor la intensidad en la expresión en los folículos atresícos tipo I y II (figura 74). Las células de la granulosa fueron las que presentaron mayor expresión, siguiendo el patrón indicado anteriormente. En los folículos de los animales de GL se observó una intensa marcación en los folículos quísticos, así como también en los folículos atresícos de tipo II (figuras 73-75). Los folículos atresícos de tipo II y III del GC mostraron una menor

inmunomarcación que los mismos del GL. Las células de las tecas de los folículos en crecimiento y atrésicos del GC presentaron una muy baja área inmunomarcada.

Tabla 17. IHCSA con HSP70 en las distintas capas de la pared folicular en folículos de diferentes categorías en los GC y GL (Media +/- DE).

	Granulosa	Teca Interna	Teca Externa
GC			
Folículos primarios	5,02 ± 6,37 ^{abc}	-	-
Folículos secundarios pequeños	0,62 ± 0,59 ^a	-	-
Folículos secundarios medianos	2,00 ± 2,10 ^{ab}	0,44 ± 0,32 ^e	0,60 ± 0,83
Folículos secundarios grandes	0,96 ± 1,01 ^a	0,93 ± 0,89 ^e	0,10 ± 0,12
Folículos terciarios	4,15 ± 1,87 ^{ab}	1,73 ± 1,02 ^e	0,51 ± 0,43
Folículos atrésicos I	9,32 ± 3,51 ^{abc}	4,21 ± 3,70 ^{efgh}	0,29 ± 0,24
Folículos atrésicos II	9,60 ± 6,41 ^{abc}	3,78 ± 1,96 ^{efg}	0,27 ± 0,16
Folículos atrésicos III	0,38 ± 0,12 ^a	3,22 ± 1,83 ^{ef}	0,18 ± 0,11
Folículos atrésicos III avanzados	5,09 ± 4,83 ^{abc}	5,78 ± 4,89 ^{efgh}	0,16 ± 0,16
GL			
Folículos primarios	8,51 ± 4,32 ^{abc}	-	-
Folículos secundarios pequeños	5,24 ± 3,27 ^{abc}	-	-
Folículos secundarios medianos	5,90 ± 3,87 ^{abc}	2,31 ± 2,05 ^e	0,38 ± 0,42
Folículos secundarios grandes	2,09 ± 1,25 ^{ab}	3,06 ± 2,00 ^{ef}	0,18 ± 0,23
Folículos terciarios	8,89 ± 5,29 ^{abc}	7,03 ± 4,53 ^{efgh}	0,62 ± 0,46
Folículos quísticos	13,84 ± 6,90 ^c	13,49 ± 3,29 ^{hi}	0,72 ± 0,38
Folículos atrésicos I	10,82 ± 4,02 ^{bc}	9,38 ± 1,59 ^{efgh}	1,39 ± 0,64
Folículos atrésicos II	22,60 ± 14,06 ^d	12,81 ± 4,96 ^{ghi}	1,36 ± 0,68
Folículos atrésicos III	11,40 ± 5,46 ^{bc}	12,30 ± 3,41 ^{fghi}	0,90 ± 0,66
Folículos atrésicos III avanzados	6,30 ± 5,87 ^{abc}	20,35 ± 7,29 ⁱ	0,09 ± 0,10

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La teca interna de los folículos terciarios, quísticos y atrésicos presentó una mayor inmunomarcación en los animales del GL con respecto al GC. No hubo diferencias en la teca externa entre ambos grupos (tabla 17).

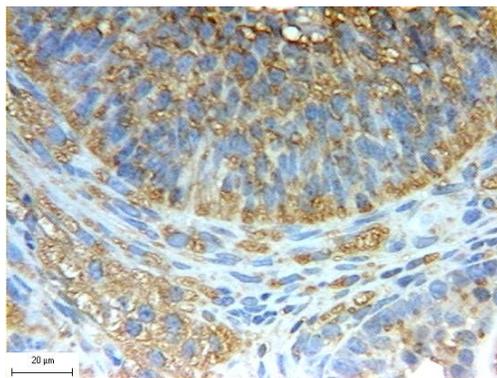


Figura 72. Folículo secundario mediano de un animal control marcado para HSP-70.

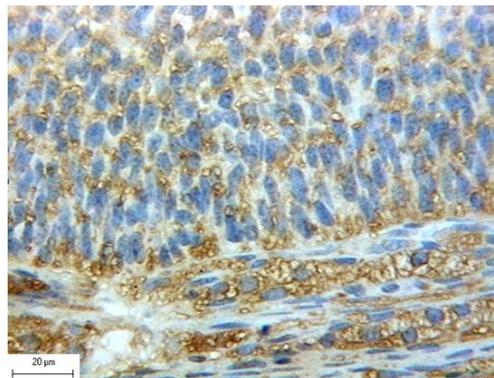


Figura 73. Pared de un folículo terciario de un animal control marcado para HSP-70.

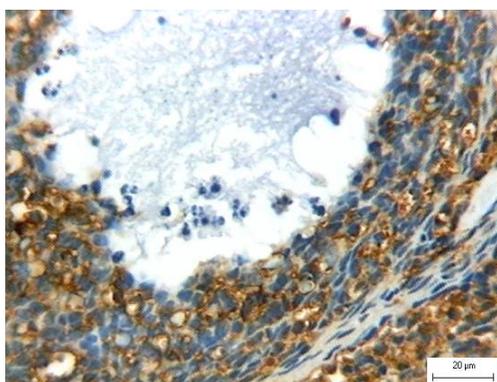


Figura 74. Folículo atrésico tipo II de un animal con COD marcado para HSP-70.

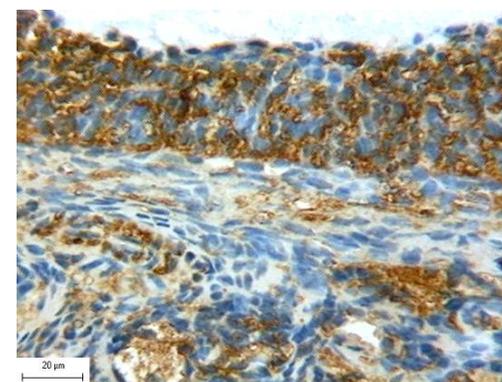


Figura 75. Pared de un folículo quístico de un animal con COD marcado para HSP-70.

IV.6.3.2. Western blot

Las membranas de nitrocelulosa se marcaron con el anticuerpo HSP70 en la zona esperada para las proteínas de 70 kDa. Se identificaron dos bandas nítidas correspondientes a la HSC70 y a HSP70. Hubo una marcación mas intensa en las muestras correspondientes a los animales GC con respecto a los animales GL (figura 76).

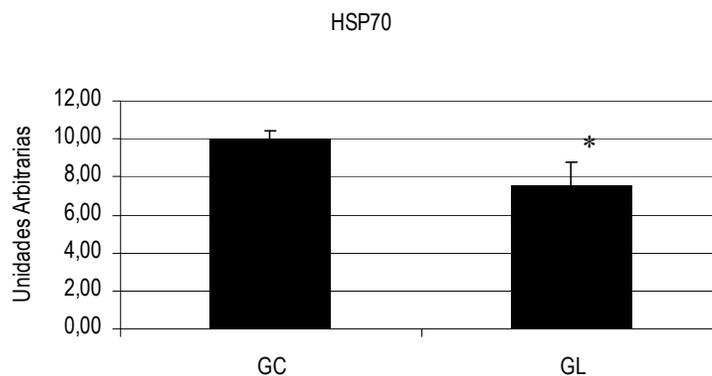


Figura 76. Niveles de marcación para HSP70 por inmunoblotting en muestras de ovarios completos de animales del GC y de GL.*Diferencias significativas $p < 0,05$.

IV.7. Niveles Hormonales

IV.7.1. LH

Los niveles séricos de LH fueron similares entre los animales del GC en proestro ($0,66 \pm 1,20$ pg/ml) con respecto a los animales del GL ($1,01 \pm 0,57$ pg/ml) (figura 77).

IV.7.2. FSH

La concentración de FSH detectada en los animales de los dos grupos no evidenció diferencias como se detalla en la figura 77. El GC mostró valores promedios de $4,10 \pm 3,70$ ng/ml con respecto al GL: $5,65 \pm 3,45$ ng/ml.

IV.7.3. Estrógenos

Los niveles de estrógenos séricos no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos. El GC mantuvo los niveles en $29,66 \pm 5,94$ pg/ml y el GL los mantuvo en $23,52 \pm 23,33$ pg/ml (figura 78).

IV.7.4. Progesterona

La progesterona no mostró diferencias significativas manteniendo sus niveles en $42,27 \pm 21,97$ pg/ml en los animales en proestro y en $33,37 \pm 15,00$ pg/ml en los animales tratados (figura 78).

IV.7.5. Testosterona

Se encontraron diferencias significativas en los valores séricos de testosterona. El GC mostró valores mucho mayores ($454,79 \pm 95,6$ pg/ml) con respecto al GL ($175,21 \pm 117,94$ pg/ml), (figura 79)

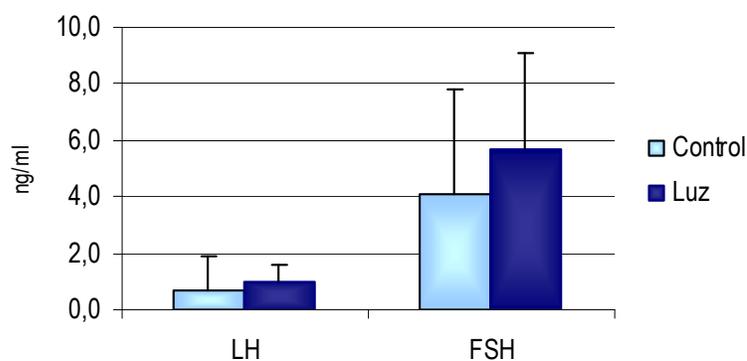


Figura 77. Niveles séricos de hormonas gonadotrópicas (LH y FSH) en animales del GC y del GL.

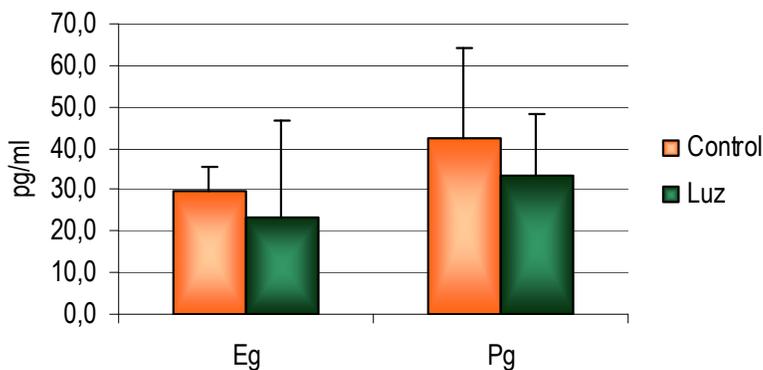


Figura 78. Niveles séricos de hormonas esteroides (estrógenos y progesterona) en animales del GC y del GL.

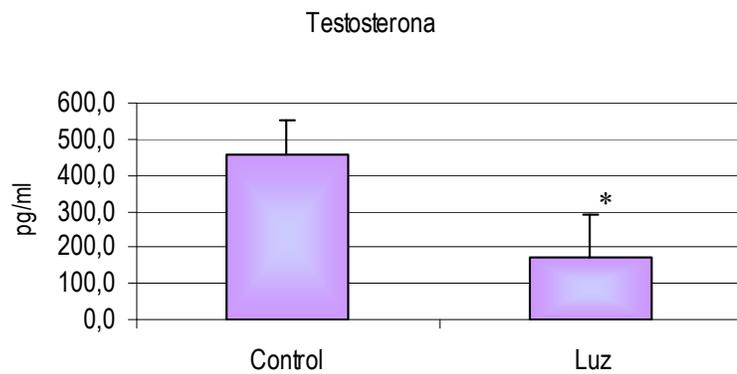


Figura 79. Niveles séricos de testosterona en animales del GC y del GL.

V- DISCUSIÓN

V- DISCUSIÓN

V.1. Inducción de la COD en ratas

La exposición a luz permanente de las ratas durante el período de 15 semanas fue efectiva para inducir la enfermedad en el 100% de los animales. Este tratamiento es poco invasivo y permite estudiar cambios a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-ovárico, lo que no es del todo posible con otros modelos en los cuales se utilizan tratamientos hormonales ya que estos pueden afectar de manera permanente dicho eje resultando en datos poco confiables (Salveti et al., 2004). Los animales mostraron ciclos irregulares que al cabo de las 13 semanas se convirtieron en estro continuo. Los datos sobre la inducción de la enfermedad coinciden con los encontrados en la bibliografía (Singh, 1969), aunque es nuestro caso, demostramos que se trata de un modelo reversible (Salveti et al., 2004). Las características anatómicas de los ovarios quísticos resultantes de este modelo son similares a los que se hallan en la enfermedad que se presenta en humanos y otras especies, y, de acuerdo a la bibliografía, conservan la habilidad de responder a los estímulos de la FSH/LH, y GnRH (Mahajan, 1988; Baldissera et al, 1991).

V.2. Cambios en la matriz extracelular ovárica en los quistes foliculares

Las fibras colágenas de tipo I se localizaron en todas las capas que integran el folículo, sin embargo solo en la teca externa se observaron diferencias siendo mayor la cantidad de este tipo de colágeno en los animales con COD. No hubo diferencias en la cantidad de colágeno encontrado en la capa de células de la granulosa. Cabe destacar que este tipo de colágeno ha sido encontrado normalmente en la membrana granulosa

(Ben-Ze'ev y Amsterdam, 1986). Huet et al., (2001) demostraron en células de la granulosa ovinas que la presencia de colágeno tipo I promueve la secreción de estradiol, e inhibe paralelamente la secreción de progesterona así como también la proliferación y supervivencia celular. Sin embargo otros autores encontraron diferencias en el tipo de esteroide secretado por las células en cultivo con colágeno I, estas diferencias podrían deberse al estadio de diferenciación de las células en el momento de la recolección (Ben-Rafael et al., 1988; Carnegie et al., 1988; Luck et al., 1991). Los autores arriba mencionados proponen que el contacto aumentado de las células de la granulosa con el colágeno tipo I que ocurre durante la maduración folicular tardía podría jugar un papel importante en la inducción y/o mantenimiento de la diferenciación celular así como en la inhibición de la proliferación y en el aumento de la producción de estradiol (Ben-Ze'ev y Amsterdam, 1986).

En cuanto a la cantidad y tipos de GAGs encontrados en la capa granulosa, no hubo diferencias entre los grupos experimentales. En los folículos clasificados como atrésicos mediante criterios morfológicos y niveles hormonales, las concentraciones de proteoglicanos dentro de esta capa y en el líquido folicular son mayores que en los folículos sanos (Huet et al., 1997). La atresia folicular ocurre como resultado del proceso apoptótico de las células de la granulosa principalmente debido a la falta de un apropiado estímulo de las gonadotropinas para generar AMPc. Altas concentraciones de GAGs en el medio de cultivo de células granulosas de rata inhibe la unión de estas a las gonadotropinas y previenen la estimulación de la adenilato ciclasa. De este modo, la regulación positiva de la síntesis de proteoglicanos podría participar indirectamente promoviendo la muerte de las células de la granulosa mediante la inhibición de la acción de las gonadotropinas. En adición, el AMPc puede ejercer su acción directamente sobre

la supervivencia celular mediante el incremento en la síntesis de: factores de crecimiento, los cuales pueden suprimir la muerte celular a través de una acción autocrina (FGF-2; TGF- α), o indirectamente mediante señales parácrinas (IGF-1) para que las células de la teca incrementen su producción de factores de crecimiento que permitan la supervivencia celular (Hsueh et al., 1994). La escasa cantidad de GAGs encontrados en la membrana granulosa de los folículos quísticos podrían estar relacionados con los bajos niveles de apoptosis encontrados en estos folículos con respecto a los folículos atrésicos. Probablemente, la falta de estas moléculas estimule la supervivencia de estas células más allá de lo normal, promoviendo la unión a las gonadotropinas que actúan estimulando a la adenilato ciclasa y por lo tanto la supervivencia celular. Por otra parte, la intensa reacción con PAS y alcian blue observada en la teca externa podría explicarse por los carbohidratos y GAGs asociados con el colágeno (Kiviranta et al., 1985).

V.3. Diferenciación celular en los folículos quísticos de animales con COD

Los resultados sobre la expresión de filamentos intermedios muestran un patrón similar para vimentina y citoqueratinas en los folículos quísticos y atrésicos, con diferencias significativas respecto a los folículos terciarios, en la membrana granulosa. No hubo diferencias en las otras capas celulares como así tampoco con los otros marcadores de componentes del citoesqueleto usados.

En ovarios humanos, Czernobilski et al. (1985) mostraron que, las células de la superficie epitelial se marcaron con anticuerpos contra citoqueratinas y vimentina. Las células de la granulosa de los folículos en todos los estadios fueron también positivas para citoqueratinas y vimentina. En la medida que el folículo madura, el contenido de

citoqueratinas parece disminuir, mientras que la vimentina permanece sin cambios (Czernobilski et al., 1985; Santini et al., 1993; Khan-Dawood et al., 1996, 1997; Löffler et al., 2000). Löffler et al., (2000) estudiando la expresión de citoqueratinas a lo largo del desarrollo folicular en ovarios humanos fetales y adultos encontraron que, si bien las citoqueratinas no se expresaban en los folículos en crecimiento preantrales, comenzaban a hacerlo en los folículos con antro y preovulatorios. Inclusive, en los folículos con avanzado estado de atresia se observaba una intensa marcación para esta proteína.

Van den Hurk et al. (1995), en estudios hechos sobre ovarios bovinos, encontraron que solo parte de la población de células de la granulosa, denominada por ellos “células granulosa atípicas” se marcaban con anticuerpos anti-vimentina, y consideraron esto como una prueba de atresia (van den Hurk y Dijkstra, 1992; van den Hurk et al., 1995). Marettova y Maretta, (2002) mostraron en ovarios de ovejas, un patrón de distribución similar para desmina y vimentina que el descrito por van den Hurk (1995).

Anderson y Lee (1997) mostraron en un modelo de COD en ratas tratadas con DHEA, que la capa basal de células de la granulosa de los quistes reduce gradualmente la presencia de vimentina y comienza a expresar citoqueratinas. Estos autores concluyeron que este cambio corresponde a una epitelización durante el proceso de cystogénesis y que es un ejemplo de transformación mesenquimo-epitelial asociado a los procesos patológicos. Por otra parte, Ortega et al., (2007) estudiando quistes ováricos bovinos encontraron diferencias similares a las encontradas en nuestro trabajo en cuanto a la expresión de citoqueratinas y vimentina en la capa de células de la granulosa.

Los filamentos de vimentina se encuentran normalmente en una amplia variedad de células de origen mesenquimal, aunque también en células de origen neurogénico, miogénico e incluso en células en cultivo de diferentes orígenes. Por lo tanto es

concebible que en ciertos procesos patológicos, los filamentos de vimentina se expresen en virtualmente cualquier tipo celular. Se han observado incrementos en este tipo de filamentos en muchas enfermedades. La idea de que un incremento en los filamentos intermedios es un cambio degenerativo esta también sostenida por una amplia gama de reportes (Ghadially y Roy, 1969; Ghadially y Mehta, 1971; Ghadially et al., 1970, 1971, 1978; Pieraggi et al., 1984). Tal vez uno de los argumentos mas poderosos de que la acumulación de filamentos representa un cambio regresivo o degenerativo proviene del estudio de tales filamentos en las neuronas en donde se ha tomado bastante acertadamente el término “degeneración neurofibrilar” para describir este fenómeno. En general se ha sugerido que este filamento intermedio es una proteína común en las células incoherativas (Takahashi et al., 1991). Sin embargo, en los quistes ováricos, los fenómenos de proliferación están disminuidos, por lo cual probablemente las modificaciones que tienen lugar durante el desarrollo de quistes ováricos estén relacionadas con lo que ocurre durante el proceso de atresia folicular incluyendo cambios degenerativos (Isobe y Yoshimura, 2000a y b, Baravalle et al., 2006). De hecho se ha documentado que la atresia esta asociada con la degeneración de algunas células de la capa granulosa (Hay et al., 1976; Hirshfield y Midgley, 1978), fragmentación de la lámina basal (Bagavandoss et al., 1983), reducción de la síntesis de ADN (Hirshfield y Midgley, 1978, Greenwald, 1989), disminución de la producción de estrógenos (Uilenbroek et al., 1980; Terranova, 1981; Maxon et al., 1985) y disminución de la unión de gonadotrofinas a las células de los folículos atrésicos (Carson et al., 1979, Uilenbroek et al., 1980, Terranova, 1981, Maxon et al., 1985). Además está asociado con el desarrollo de apoptosis en las células de los folículos (Tilly et al., 1991, 1992; Palumbo y Yeh, 1994; Johnson, 2003). De hecho, el

empaquetamiento ordenado y la disposición del contenido celular durante la apoptosis son importantes en la eliminación de la reacción inflamatoria en las células que mueren. La ruptura de los filamentos intermedios durante la muerte celular refleja la eliminación ordenada de proteínas estructurales relativamente insolubles de la célula. Dentro de las moléculas que son blanco para las enzimas que intervienen en el proceso de apoptosis, las caspasas, se encuentran los distintos componentes del citoesqueleto. Las láminas nucleares son uno de los blancos más caracterizados de las caspasas, ya que muchos estímulos resultan en el clivaje de estas proteínas que producen entonces el colapso nuclear, propio de la apoptosis (Caulín et al., 1997; Oshima et al., 2002). Por otra parte, durante la apoptosis, la caspasa-3 activa ha sido colocalizada en grandes agregados junto con la citoqueratina 18 clivada, y es posible que esta queratina proporcione algún tipo de protección contra la digestión de la caspasa-3 limitando la disponibilidad de la forma activa de esta enzima. La vimentina también es sustrato de las caspasas y se cree que su clivaje produce una proteína truncada que induce la amplificación de las señales de muerte celular en las cuales intervienen las caspasas (Byun et al., 2001; Dinsdale et al., 2004).

De este modo, la expresión de estos filamentos intermedios podría ser parte del repertorio necesario o asociado con los procesos de apoptosis/supervivencia celular en el proceso de cigotogénesis.

V.3. Balance proliferación/apoptosis en los folículos ováricos quísticos.

La proliferación celular cuantificada mediante la inmunodetección de PCNA fue mayor en las células de la granulosa de los folículos terciarios en los animales control que en los terciarios y quísticos de los animales con la enfermedad. En ambas tecas, el

porcentaje de proliferación fue menor en los quistes que en los folículos terciarios de los dos grupos. Estas diferencias también fueron observadas por Isobe y Yoshimura (2000a) quienes encontraron un bajo índice de proliferación en todas las capas foliculares de quistes bovinos. 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.

Se sabe que las células de la granulosa proliferan incluso antes de que comiencen a influir las hormonas gonadotropicas llegando a altos grados de mitosis en ausencia total de estas hormonas. Sin embargo, el desarrollo final previo a la ovulación es exclusivamente dependiente de gonadotropinas (Hirshfield, 1985). Hay reportes que indican que la proliferación celular en la membrana 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 gonadotropinas en las células foliculares, principalmente LHr. Estudios realizados en quistes ováricos de ratas 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 et al., 2007). Otro factor de crecimiento que estimula la proliferación celular, principalmente de las tecas, es el FGF-2, el cual también se encuentra disminuido en las capas foliculares de los quistes ováricos en rata (Ortega et al., 2007).

Por otra parte, la presencia de moléculas de adhesión (cadherinas) en los folículos está correlacionada con la diferenciación y con los procesos de proliferación/apoptosis en el ovario. La expresión de estas moléculas dependientes de Ca^{++} está estimulada por los estrógenos. La intensa unión entre células de la granulosa si bien inhibe los procesos de apoptosis, también lo hace con los procesos de proliferación celular. Las cadherinas que se expresan en las células de la granulosa son la N-cadherina y la E-cadherina (Harandian y Farookhi, 1998; Makrigiannakis et al., 1999, Sundfeldt et al., 2000). Estudios recientes han demostrado que estas moléculas se expresan intensamente en la capa granulosa de los folículos en crecimiento y quísticos en ratas con COD inducida, lo cual coincide con los niveles bajos de proliferación y de apoptosis encontrados en este estudio. (Baravalle et al., 2006).

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 et al., 1994). Como se detalla previamente, muchas moléculas tienen este tipo de acción en las células ováricas, siendo las mas importantes dentro de las proapoptóticas: bax, bcl-xs, bad y dentro de las antiapoptóticas: bcl-2 y bcl-xl. Por otra parte, algunas HSP actúan como factores protectores y por lo tanto antiapoptóticos en células que han sido sometidas a un estímulo estresante. La respuesta a la activación de los estímulos inductores de muerte celular es la activación de la cascada de caspasas. 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 todos los tipos de ambos grupos, para todas las capas foliculares. La HSP70 se encontró elevada

en la capa granulosa y en la teca interna de los folículos quísticos del grupo tratado con respecto al control. Por el contrario, las moléculas proapoptóticas Bax y Caspasa-3, así como las células apoptóticas detectadas *in situ* se expresaron por debajo de los niveles encontrados en los folículos atrésicos tanto en la granulosa como en la teca interna. Los folículos atrésicos más avanzados presentaron menores niveles de expresión que los de tipo I y II, y esto podría deberse a que en este punto la mayoría de las células que estaban destinadas a la muerte celular ya han sido eliminadas y solo quedan algunas remanentes. Isobe y Yoshimura (2000b), 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. Por otro lado, Anderson y Lee (1997) encontraron, en ratas tratadas con 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 expresar vimentina a citoqueratinas, como ejemplo de cambio mesenquimal-epitelial. Estos resultados coinciden parcialmente con lo encontrado por nosotros en este estudio.

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 hs y que además, administrando esas gonadotropinas de manera exógena, pueden rescatarse los folículos de la atresia temprana. 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 et al., 1994). En las ratas con COD, los niveles de gonadotropinas se mantienen constantes a lo largo del tiempo, sin ondas preovulatorias; 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 et al., 1993; Hsueh et al., 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 aromatasa 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. Las ratas con COD demostraron tener niveles séricos de testosterona menores que los animales control, con iguales niveles de estrógenos, lo cual puede contribuir a inhibir los procesos de muerte celular programada a nivel de ovárico.

V.4. Expresión de receptores hormonales y proteínas relacionadas.

En los ovarios normales, la expresión de los receptores estudiados coincidió con la descrita en la bibliografía. El RE β se localizó en la capa de células de la granulosa en todas las categorías foliculares. 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. El receptor de progesterona se halló en la granulosa y teca interna de todos los folículos. La inmunomarcación de las membranas de nitrocelulosa obtenidas por western blot también fue coincidente con la bibliografía. El RE α marcó una banda en la zona correspondiente a los 65 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 116 kDa (RP-B), 94 kDa (RP-A) y 60 kDa (RP-C).

Es sabido que la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona es inducida por las gonadotropinas y cambia de acuerdo a los niveles hormonales (Rosenfeld et al., 2001). Si bien las ratas con COD inducida por exposición prolongada a luz constante no presentaron variaciones hormonales con respecto a los animales en proestro utilizados como control, es probable que los niveles no pulsátiles y constantes (aunque no por sobre la media) de gonadotropinas influyan sobre la expresión de los receptores hormonales en el ovario como así también a nivel del eje hipotálamo-hipofisario (Taft et al., 1996).

Los animales con COD presentaron una mayor expresión en el RP-A y una menor expresión del RP-C en sus ovarios con respecto a los animales control, sin variaciones en el RP-B. 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 et al., 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 et al., 2002; Schams et al., 2003; Goldman et al., 2005).

Si consideramos la regulación hormonal en la rata, 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 et al., 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 anormalidades 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 ovarios provenientes de animales con COD los niveles de RP-A fueron superiores a los encontrados en los animales control, lo que podría también explicar una menor proliferación en estos ovarios debido a la actividad inhibitoria de la isoforma A sobre RP-B.

Por otra parte, encontramos diferencias en la expresión de ambos subtipos de RE entre los animales con COD y los controles tanto con inmunohistoquímica como con western blot. Algunos estudios llevados a cabo en distintas especies, incluyendo seres humanos y bovinos, 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 et al., 1999; Jakimiuk et al., 2000; Salvetti et al., 2007). Odore et al. (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 et al. (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*. Jakimiuk et al. (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 COD y normales respectivamente. Ellos mostraron, por RT-PCR y western blot 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, lo cual coincide parcialmente con los resultados obtenidos en esta tesis.

Es sabido que las gonadotropinas (Byers et al., 1997) y los estrógenos (Sharma et al., 1999) regulan negativamente la expresión del RE β en las células de la granulosa. Ambos receptores de estrógenos muestran una tendencia hacia la regulación positiva en paralelo al aumento de los niveles de estrógenos en el líquido folicular y esto se correlaciona con la “up-regulation” en los receptores de LH y de FSH (Berisha et al., 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 et al., 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. Las consecuencias de estos cambios todavía no están claras, pero debido a que ambos subtipos tienen distinta afinidad por el 17- β -estradiol y además existe la posibilidad de la formación de heterodímeros cruzados entre los dos tipos de RE, aún pequeños cambios en la relación RE α /RE β pueden alterar la normal foliculogénesis (Mosselman et al., 1996; Pettersson et al., 1997). Así, los efectos del estradiol en estas condiciones pueden producir alteraciones en el balance proliferación/apoptosis (Isobe y Yoshimura, 2000a y b), en las concentraciones de receptores para gonadotrofinas (Calder et al., 2001), en las acciones de las enzimas y en el metabolismo celular (Calder et al., 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 con el gen RE α deletado (ratones RE α KO) exhiben un fenotipo similar al de los animales con COD, con niveles de LH aumentados, y ovarios caracterizados por la presencia de múltiples folículos quísticos y hemorrágicos sin evidencias de ovulación (Couse et al., 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 et al., 2004; Emmen et al., 2005). Los autores que 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 et al., 2004; Emmen et al., 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 receptores en otros niveles del eje hipotálamo-hipofisario con la consecuente disrupción en los mecanismos de retroalimentación.

Por último, la HSP70 se expresó intensamente en las capas granulosa y teca interna de los folículos quísticos así como en los atrésicos avanzados del grupo tratado con respecto a los folículos en crecimiento de todas las categorías del grupo control. Sin embargo, mediante la técnica de western blot, la marcación fue mayor en los ovarios control con respecto a los tratados. Esto puede deberse a la presencia en los ovarios control de cuerpos lúteos en regresión, los cuales se sabe que expresan intensamente esta proteína (Khanna et al., 1995). Cabe destacar que no se encontraron trabajos que indiquen la expresión normal de esta proteína en los folículos ováricos de los mamíferos. En este sentido, HSP70, así como otras proteínas de la familia, tienen, por un lado, la capacidad de unirse a receptores esteroides y de modular su función y por otro, proteger a las células frente al estrés celular (Koshiyama et al., 1995; Pratt y Toft, 1997; Neuer et al., 2000). Trabajos realizados en útero mostraron que durante la fase proliferativa, las glándulas endometriales mostraron escasa expresión de HSP70 mientras que durante la fase secretoria la expresión de esta proteína aumentaba tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células. En este mismo trabajo, los autores encontraron que la HSP70 se correlacionó con la disminución concomitante en la

expresión de RE y RP como así también con una disminución en la proliferación celular de las células glandulares (Koshiyama et al., 1995). Por otra parte, Edwards et al., (1992) encontraron en células cancerosas que la sobreexpresión de HSP70 debida a shock térmico resultaba en una marcada reducción en la concentración de receptores para progesterona. Estos hallazgos sugieren que la sobreexpresión de HSP70 se relaciona estrechamente con mecanismos de regulación negativa en la expresión de receptores hormonales esteroides.

VI- CONCLUSIONES

VI- 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 animales con COD presentaron alteraciones en la MEC con respecto a los animales normales, observándose una disminución en la cantidad de GAGs presentes en la membrana granulosa y un incremento en el colágeno tipo I presente en la teca externa. Los cambios en la forma y contacto celulares mediados por los constituyentes de la MEC y los cambios en la expresión génica del citoesqueleto son alteraciones programadas que podrían estar involucradas en la regulación de los subsecuentes procesos de diferenciación celular. La MEC podría jugar un rol importante en estos eventos así como también en los procesos de proliferación y muerte celular.

2-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.

3-Las proteínas del citoesqueleto, vimentina y citoqueratinas, se expresaron de en mayor medida en la membrana granulosa de los quistes foliculares con respecto a los folículos terciarios normales; con similitud en los valores hallados a los folículos

atrésicos. Estos resultados podrían mostrar que estos folículos están sufriendo algunos procesos degenerativos propios del proceso de oostrogenesis.

4-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 estuvo aumentada 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.

5-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 RPA se encontró aumentado en los ovarios de los animales tratados y el RPC se encontró disminuido en su expresión; sin diferencias en el RPB. 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.

6-La HSP70 se expresó de manera significativamente superior en los folículos quísticos de los animales con la enfermedad en relación con los folículos en crecimiento de los animales control. Esta proteína está asociada a los procesos de estrés celular

permitiendo la supervivencia celular y probablemente se asocie con los eventos antiapoptóticos encontrados en los folículos de los animales con COD.

7. Las similitudes halladas entre este modelo experimental desarrollado en ratas, 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.

VII- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; SVOBODA, M.E.; VAN WYK, J.J. (1986). Follicle-stimulating hormone enhances somatomedin C binding to cultured rat granulosa cells. Evidence for cAMP dependence. *J. Biol. Chem.* 25:3923-3926.
- AGARWAL, S.K.; SHANKAR, U. (1998). Clinical response, related progesterone profile and subsequent fertility after gonadotropin releasing hormone administration in crossbred cows with ovarian cyst. *Ind. Vet. J.* 75:127-130.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. New York and London, Garland Publishing Inc, pp 787-861.
- ANDERSON, E.; LEE, G.; O'BRIEN, K. (1997). Polycystic ovarian condition in the dehydroepiandrosterone- treated rat model: Hyperandrogenism and the resumption of meiosis are major initial events associated with cystogenesis of antral follicles. *Anat. Rec.* 249:44-53.
- ANDERSON, E.; 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.
- BAGAVANDOSS, P.; MIDGLEY, A.R. JR.; WICH, M. (1983). Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 31:633-640.

- BAKER, J.; HARDY, M.P.; ZHOU, J.; BONDY, C.; LUPU, F.; BELLVE, A.R.; EFSTRATIADIS, A. (1996). Effects of an Igfl gene null mutation on mouse reproduction. *Mol. Endocrinol.* 10:903–918.
- BALDISSERA, S.F.; MOTTA, L.D.C.; ALMEIDA, M.C.; ANTUNES-RODRIGUEZ, J. (1991). Proposal of an experimental model for the study of polycystic ovaries. *Brazilian J. Med. Res.* 24:747-751.
- BARAVALLE, C.; SALVETTI, N.R. ; MIRA, G.A. ; LORENTE, J.A. ; 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.
- 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.
- BEATO, M.; KLUG, J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Hum. Reprod. Update.* 6: 225-236.
- BEERE, H.M. (2004). "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Sci.* 117:2641-2651.
- BEERE, H.M. (2005). Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J. Clin. Invest.* 115:2633-2639.
- BELLIN, M.E.; VELDHUIS, J.D.; AX, R.L. (1987). Follicular fluid glycosaminoglycans inhibit degradation of low-density lipoproteins and

- progesterone production by porcine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 37:1179-1184.
- BEN-RAFAEL, Z.; BENADIVA, C.A.; MASTROIANNI, L.; GARCIA, C.J.; MINDA, J.M.; IOZZO, R.V.; FLICKINGER, G.L. (1988) Collagen matrix influences the morphologic features and steroid secretion of human granulosa cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 159: 1570-1574.
- BEN-ZE'EV, A.; AMSTERDAM, A. (1986). Regulation of cytoskeletal proteins involved in cell contact formation during differentiation of granulosa cells on extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:2894-2880.
- BERISHA, B.; PFAFFL, M.; SCHAMS, D. (2002). Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrous cycle and pregnancy. *Endocrine* 17:207-214.
- BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; 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.
- BILLIG, H.; FURUTA, I.; HSUEH, A.J. (1993). Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology.* 133:2204-2212.
- BJÖRNSTRÖM, L.; SJÖBERG, M. (2005). Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes *Mol. Endocrinol.* 19:833-842.
- BRAWER, J.R.; MUNOZ, M.; FAROOKHI, R. (1986) Development of the polycystic ovarian condition in the estradiol valerate-treated rat. *Biol. Reprod.* 35:647-655.

- 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 gonadotropins. *Mol. Endocrinol.* 11:172-182.
- BYUN, Y.; CHEN, F.; CHANG, R.; TRIVEDI, M.; GREEN, K.J.; CRYNS, V.L. (2001). Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ.* 8:443-450.
- CALDER, M.D.; MANIKKAM, M.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S.; LUBAHN, D.B.; LAMBERSON, W.R.; GARVERICK, H.A. (2001). Dominant bovine ovarian follicular cysts express increased levels of messenger RNAs for luteinizing hormone receptor and 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase $\delta(4)$, $\delta(5)$ isomerase compared to normal dominant follicles. *Biol. Reprod.* 65:471-476.
- CALDER, M.D.; SALFEN, B.E.; BAO, B.; YOUNGQUIST, R.S.; 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.
- CARNEGIE, J.A.; BYARD, R.; DARDICK, I.; TSANG, B.K. (1988). Culture of granulosa cells in collagen gels: the influence of cell shape on steroidogenesis. *Biol. Reprod.* 38: 881-890.

- CASIDA, L.E.; 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.; MEYER, R.K. (1944). Effects of an unfractionated pituitary extract upon cystic ovaries and nymphomania in cows. *J. Anim. Sci.* 3:273-282.
- CAULIN, C.; SALVESEN, G.S.; OSHIMA, R.G. (1997). Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J. Cell. Biol.* 38:1379-1394.
- CHRISTOPHER, C.; DEVANATHAN, T.G. (1997) Incidence of Cystic Ovarian Degeneration in crossbred cows. *Ind. Vet. J.* 74:184-184.
- CONNELLY, O.M. (2001). Perspective: female steroid hormone action. *Endocrinology* 142:2194-2199.
- 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.
- 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.
- CZERNOBILSKY, B.; MOLL, R.; LEVY, R.; FRANKE, W.W. (1985). Co-expression of cytokeratins and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cells of the human ovary. *Eur. J. Cell. Biol.* 37: 175-190.

- DELLMANN, H.D.; EURELL, J.A. (1998). Textbook of veterinary histology, 5th ed., London: Williams & Wilkins. p. 252.
- DINSDALE, D.; LEE, J.C.; DEWSON, G.; COHEN, G.M.; PETER, M.E. (2004). Intermediate filaments control the intracellular distribution of caspases during apoptosis. *Am. J. Pathol.* 164:395-407.
- DOLEZEL, R.; CECH, S.; ZAJIC, J. (1998). Follicular development during the progesterone therapy of ovarian acyclicity and ovarian cysts in cows. *Vet. Med.* 43:145-151.
- DOUTHWAITE, R.; 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.
- DRUMMOND, A.E.; BRITT, K.L.; DYSON, M.; JONES, M.E.; KERR, J.B.; O'DONNELL, L.; SIMPSON, E.R.; 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.
- EDWARDS, D.P.; ESTES, P.A.; FADOK, V.A. (1992). Heat shock alters the composition of heteromeric steroid receptor complexes and enhances receptor activity in vivo. *Biochemistry.* 31:2482-2491.
- 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.; PELTO-HUIKKO, M.; GRANDIEN, K.; LAGERCRANTZ, S.; LAGERCRANTZ, J.; FRIED, G.; NORDENSKJOD, M.; GUSTAFSSON, J.A. (1997). Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:4258-4265.
- ERB, H.N.; MARTIN, S.W. (1980) Interrelationships between production and reproductive diseases in Holstein cows. Age and seasonal patterns. *J. Dairy Sci.* 63:1918-1924.
- EYESTONE, W.H.; 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.; MITCHELL, B.F. (2002). Messenger RNA for progesterone receptor isoforms in the late-gestation rat uterus. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:E1167-1172.
- FITZPATRICK, S.I.; FUNKHOUSER, J.M.; SINDONI, D.M.; STEVIS, P.E.; DEECHER, D.C.; BAPAT, A.R.; MERCHENTHALER, I.; FRAIL, D.E. (1999). Expression of Estrogen Receptor- β Protein in Rodent Ovary. *Endocrinology* 140:2581-2591.
- GABAI, V.L.; MABUCHI, K.; MOSSER, D.D.; SHERMAN, M.Y. (2002). Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 22:3415-3424.
- GARM, O. (1949). A study of bovine nymphomania with special reference to etiology and pathogenesis. *Acta Endocrinol. (Suppl 3)*:1-144.
- GARTNER, L.P.; 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.
- GASSE, H.; PEUKERT-ADAM, I.; SCHWARZ, R.; GRUNERT, E. (1984). Place of follicle-lutein cysts in the estrus cycle of cows: histological, cytological and hormone analysis studies. *Zentralbl. Veterinarmed.* 31:548-556.
- 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.
- GHADIALLY F.N.; FULLER, J.A.; KIRKALDY-WILLIS, W.H. (1971) Ultrastructure of full-thickness defects in articular cartilage. *Arch. Pathol.* 92: 356-369.
- GHADIALLY F.N.; MEHTA, P.N. (1971). Multifunctional mesenchymal cells resembling smooth muscle cells in ganglia of the wrist. *Ann Rheum Dis* 30: 31-42.
- GHADIALLY, F.N.; JANZEN, H.K.; MEHTA P.N. (1970) Synovial membrane in experimental lipoarthritis. *Arch. Pathol.* 89: 291-301.
- GHADIALLY, F.N.; LALONDE, J.M.; DICK C.E. (1978) A mechanism of formation of desmosome-like structures between synovial intimal cells. *Experientia* 34: 1212-1213.

- GHADIALLY, F.N.; ROY S. (1969) Ultrastructural changes in the synovial membrane in lipohaemarthrosis. *Ann. Rheum. Dis.* 28:529-536.
- GOLDMAN, S.; WEISS, A.; ALMALAH, I.; 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.; CHARALABOPOULOS, K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int. J. Clin. Pract.* 58:1134-1141.
- GRAHAM, J.D.; CLARKE, C.L. (1997). Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocr. Rev.* 18:502-519.
- GREENWALD, G.S. (1989) Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia. *Biol. Reprod.* 41:175-181.
- GREENWALD, G.S.; 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.
- GROHN, Y.T.; EICKER, S.W.; HERTL, J.A. (1995) The association between previous 305-day milk yield and disease in New York State dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:1693-1702.
- GROHN, Y.T.; HERTL, J.A.; HARMAN, J.L. (1994) Effect of early lactation milk yield on reproductive disorders in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 55:1521-1528.
- GRUNERT, E.; BERCHTOLD, M. (1988). *Infertilidad en la vaca*. 1º edición. - Editorial Hemisferio Sur.

- HARANDIAN, F.; FAROOKHI, R. (1998). Contact-dependent cell interactions determine hormone responsiveness and desensitization in rat granulosa cells. *Endocrinology*. 139:1700-1707.
- HAY, M.F.; CRAN, D.G.; MOOR R.M. (1976) Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. *Cell Tissue Res*. 169:515-529.
- HEUER, C.; SCHUKKEN, Y.H.; 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). Gonadotropic 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.; 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. (1988). Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. *Biol. Reprod*. 38:1181-1188.
- HIRSHFIELD, A.N. (1991). Development of the follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol*. 124:43-101.
- HIRSHFIELD, A.N.; A.R. MIDGLEY (1978). The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat. *Biol. Reprod*. 19:606-611.

- HSUEH, A.J.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev.* 15:707-724.
- HUET, C.; MONGET, P.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. (1997). Changes in extracellular matrix components and steroidogenic enzymes during growth and atresia of antral ovarian follicles in the sheep. *Biol. Reprod.* 56:1025-1034.
- HUET, C.; PISSELET, C.; MANDON-PEPIN, B.; MONGET, P.; MONNIAUX, D. (2001). Extracellular matrix regulates ovine granulosa cell survival, proliferation and steroidogenesis: relationships between cell shape and function. *J. Endocrinol.* 169:347-360.
- ISOBE, N., YOSHIMURA, Y. (2000b). Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: a DNA-end labeling histochemical study. *Theriogenology* 53:897-904.
- ISOBE, N.; YOSHIMURA, Y. (2000a). Immunocytochemical study of cell proliferation in the cystic ovarian follicles in cows. *Theriogenology* 54:1159-1169.
- JAKIMIUK, A.J.; WEITSMAN, S.R.; YEN, H.W.; BOGUSIEWICZ, M.; 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.D.; ULBERG, L.C. (1967). Influence of exogenous progesterone on follicular cysts in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 50:758-761.
- JOHNSON, A.L. (2003). Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 78:185-201.

- JONASSEN, J.A.; RICHARDS, J.S. (1980). Granulosa cell desensitization: effects of gonadotropins on antral and preantral follicles. *Endocrinology* 106:1786-1794.
- JONES, H.M.; VERNON, M.W.; RUSH, M.E. (1987) Systematic studies invalidate the neonatally androgenized rat as a model for polycystic ovary disease. *Biol. Reprod.* 36:1253-1265.
- KALRA, S.P.; KALRA, P.S. (1983) Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocr. Rev.* 4:311-351.
- 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.; GARVERICK, H.A. (1982). Ovarian follicular cysts in dairy cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 55:1147-1159.
- KHAN-DAWOOD, F.S.; DAWOOD, M.Y.; TABIBZADEH S. (1996) Immunohistochemical analysis of the microanatomy of primate ovary. *Biol. Reprod.* 54:734-742.
- KHAN-DAWOOD, F.S.; YANG, J.; DAWOOD, Y. (1997). Immunohistochemical localization and expression of α -Actin in the Baboon (*Papio anubis*) corpus luteum. *J. Histochem. Cytochem.* 45:71-77.
- KHANNA, A.; ATEN, R.F.; BEHRMAN, H.R. (1995). Heat shock protein-70 induction mediates luteal regression in the rat. *Mol. Endocrinol.* 9:1431-1440.
- KIVIRANTA, I.; TAMMI, M.; JURVELIN, J.; SAAMANEN, A.M.; HELMINEN, H.J. (1985). Demonstration of chondroitin sulphate and glycoproteins in

- articular cartilage matrix using periodic acid-Schiff (PAS) method. *Histochemistry* 83:303-306.
- KOSHIYAMA, M.; KONISHI, I.; NANBU, K.; NANBU, Y.; MANDAI, M.; KOMATSU, T.; YAMAMOTO, S.; MORI, T.; FUJII, S. (1995). Immunohistochemical localization of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in the human endometrium: correlation with sex steroid receptors and Ki-67 antigen expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:1106-1112.
- KUIPER, G.G.; ENMARK, E.; PELTO-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.
- LAKHANI, K.; SEIFALIAN, A.M.; ATIOMO, W.U.; MRCOG, M.D.; HARDIMAN, P.; FRCOG, M.D. (2002). Polycystic ovaries. *Brit. J. Radiol.* 75: 9-16.
- LIU, Y.; MARRACCINO, R.L.; KENG, P.C. (1989) Requirement for proliferating cell nuclear antigen expression during stages of the Chinese hamster ovary cell cycle. *Biochemistry* 28:2967-2974.
- LÖFFLER, S.; HORN, L.C.; WEBER, W.; SPANEL-BOROWSKI K. (2000). The transient disappearance of cytokeratin in human fetal and adult ovaries. *Anat. Embryol.* 201:207-215.

- LONG, J.; EVANS, H. (1922) The oestrus cycle in the rat and its associated phenomena. Mem. Univ. Calif. 6:1-48.
- LUCK, M.R. (1994) The gonadal Extracellular Matrix. Oxford Rev. Reprod. Biol. 16: 34-85.
- LUCK, M.R.; MÜNKER, M.; PRAETORIUS, C. (1991). Autocrine control of phenotype by extracellular matrix proteins in luteinizing granulosa cells. Journal of Reproduction and Fertility 43:101-102.
- LYDON, J.P.; DEMAYO, F.J.; FUNK, C.R.; MANI, S.K.; HUGHES, A.R.; MONTGOMERY, JR. C.A.; SHYAMALA, G.; CONNEELY, O.M.; O'MALLEY, B.W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. Genes Dev. 9:2266-2278.
- MAHAJAN, D.K. (1988) Polycystic ovarian disease: animals models. Endocrinol. Metab. Clin. North. Am. 17:705-732.
- MAHESH, V.B.; MILLS, T.M.; BAGNELL, C.A.; CONWAY, B.A. (1987). Animal models for study of polycystic ovaries and ovarian atresia. In regulation of ovarian and testicular function Mahesh, V.B.; Dhindsa, D.S.; Anderson, E. and Kalra, S.P.; eds Plenum, New York, pp 237-258.
- MAKRIGIANNAKIS, A.; COUKOS, G.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; GOUR, B.J.; RADICE, G.L.; BLASCHUK, O.; COUTIFARIS, C. (1999). N-cadherin-mediated human granulosa cell adhesion prevents apoptosis: a role in follicular atresia and luteolysis? Am. J. Pathol. 154:1391-1406.
- MARETTOVA, E.; MARETTA, M. (2002) Demonstration of intermediate filaments in sheep ovary. Acta Histochem 104:431-434.

- MARTINI, L. (1982). New findings in neuroendocrinology. *Acta Physiol. Lat. Am.* 32:205-218.
- MASON, A.J.; HAYFLICK, J.S.; ZOELLER, R.T.; YOUNG, W.S.; PHILLIPS, H.S.; NIKOLICS, K.; SEEBURG, P.H. (1986a). A deletion truncating the gonadotropin-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.; 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.; YAJIMA, A. (1999). Oestrogen receptor α and β mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol. Human Reprod.* 5:559-564.
- MAXON, W.S.; HANEY, A.F.; SCHOMBERG D.W. (1985). Steroidogenesis in porcine atretic follicles: loss of aromatase activity in isolated granulosa and theca. *Biol. Reprod.* 33:495-501.
- MCGEE, E.A.; 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.; HILLIER, S.G. (1996). Modulation of granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and differentiation by activin. *Endocrinology* 137:464-468.

- MONNIAUX, D.; HUET, C.; BESNARD, N.; CLEMENT, E.; BOSCH, M.; PISSELET, C.; MONET, P.; MARIANA, J.C. (1997). Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51: 3-23.
- MONTES G.S.; E.H. LUQUE (1988). Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat.* 133: 192-199.
- MONTES, G.S. (1992). Distribution of oxytalan, elanin and elastic fibres in tissues. *J. Braz. Assoc. Adv. Sc.* 44: 224-233.
- MONTES, G.S. (1996). Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol. Intern.* 20: 17-27.
- MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C.U. (1988). Histochemical localization of collagen and of proteoglycans in tissues. In: *Collagen*. Vol. 2 (Nimni ME, ed). pp.41-72. CRC Press: Boca Raton.
- MORENO, S.; ACOSTA RODRÍGUEZ, J.M.; GONZÁLEZ DE BULNES, A.; CASTRILLO ZUBIRIA, I.; PÉREZ MARÍN, C.; LÓPEZ SEBASTIÁN, A. (1999). Evaluación Ecográfica De La Enfermedad Quística Ovárica En Pequeños Rumiantes. *Arch. Zootec.* 48:157-165.
- MOSSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. (1996). ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 392:49-53.
- MOSSER, D.D.; CARON, A.W.; BOURGET, L.; DENIS-LAROSE, C.; MASSIE, B. (1997). Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol* 17:5317-5327.
- MOSSER, D.D.; CARON, A.W.; BOURGET, L.; MERIIN, A.B.; SHERMAN, M.Y.; MORIMOTO, R.I.; MASSIE, B. (2000). The chaperone function of hsp70 is

- required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 20:7146-7159.
- MULAC-JERICEVIC, B.; CONNEELY, O.M. (2004). Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction.* 128:139-146.
- NAKAO, T.; NUMATA, Y.; KUBO, M.; YAMAUCHI, S. (1978). Treatment of cystic ovarian disease in dairy cattle. *Cornell Vet.* 68:161-178.
- NANDA, A.S.; WARD, W.R.; 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.
- NANDA, AS.; WARD, W.R.; WILLIAMS, P.C.W.; DOBSON, H. (1988). Retrospective analysis of the efficacy of different hormone treatments of cystic ovarian disease in cattle. *Vet. Rec.* 122:155-158.
- NATRAJ, U.; 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.
- NEUER, A.; SPANDORFER, S.D.; GIRALDO, P.; DIETERLE, S.; ROSENWAKS, Z.; WITKIN, S.S. (2000). The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum. Reprod. Update.* 6:149-159.
- NILSSON, S.; MAKELA S.; TREUTER, E.; TUJAGUE, M.; THOMSEN, J.; ANDERSSON, G.; ENMARK, E.; PETTERSSON, K.; WARNER, M.; 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.
- NRC (National Research Council) (1996) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, National Academy Press.
- ODORE, R.; RE, G.; BADINO, P.; DONN, A.; VIGO, D.; BIOLATTI, B.; GIRARDI, C. (1999). Modifications of receptor concentrations for adrenaline, steroid hormones, prostaglandin F₂ α and gonadotropins in hypophysis and ovary of dairy cows with ovarian cysts. *Pharmacol. Res.* 39:297-304.
- OGLE, T.F. (2002). Progesterone-action in the decidual mesometrium of pregnancy. *Steroids* 67:1-14
- OKADA, A.; SATO, T.; OHTA, 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.; MIJTEN, P.; CORYN, M.; DEKRUIF, A. (1996). Post-partum anoestrus in dairy cows. *Vet. Quart.* 18:68-75.
- 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.; PALOMAR, M.M.; ACOSTA, J.C.; SALVETTI, N.R.; DALLARD, B.E.; LORENTE, J.A.; BARBEITO, C.; GIMENO, E.J. (2007). Insulin-like

- growth factor I in ovarian follicles and follicular fluid from cows with spontaneous and induced Cystic Ovarian Disease. Res. Vet. Sci. En prensa.
- OSHIMA, R.G. (2002). Apoptosis and keratin intermediate filaments. Cell Death Differ. 9:486-492.
- PAECH, K.; WEBB, P.; KUIPER, G.G.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.; KUSHNER, .PJ.; SCANLAN, T.S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. Science. 277:1508-1510.
- PALUMBO, A.; YEH, J. (1994). *In situ* localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. Biol. Reprod. 51:888-895.
- PAN, J.; AUERSPERG, N. (1998). Spatiotemporal changes in cytokeratin expression in the neonatal rat ovary. Biochem. Cell. Biol. 76:27-35.
- PEDERSON, T. (1970). Follicular kinetics in the ovary of the cyclic mouse. Acta Endocrinol. 64:304-323.
- PELLETIER, G.; LABRIE, C.; LABRIE, F. (2000). Localization of oestrogen receptor α , oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs J. Endocrinol. (2000) 165:359-370.
- 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.
- PIERAGGI, M.T.; JULIAN, M.; BOUISSOU H. (1984). Fibroblast changes in cutaneous ageing. Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol. 402: 275-287.
- PRATA LIMA, M.F.; BARACAT, E.C.; SIMOES, M.J. (2004). Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats:

- similarity with polycystic ovary syndrome. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37:987-995.
- PRATT, W.B.; TOFT, D.O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18:306-360.
- QUANDT, L.M.; HUTZ, R.J. (1993). Induction by Estradiol-17 β of Polycystic Ovaries in the Guinea Pig. *Biol. Reprod.* 48:1088-1094.
- QUIRK, S.M.; COWAN, R.G.; HARMAN, R.M.; HU, C.L.; 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.; RICHARDS, J.S. (1978). Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation. *Cell* 14:71-78.
- RIBADU, A.Y.; NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; ZHANG, W.C.; TANAKA, Y.; NAKAO, T. (2000). The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 64:21-31.
- 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.
- 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.; HEDIN, L.; CASTON, L.(1986). Differentiation of rat ovarian cells: evidence for functional luteinization. *Endocrinology* 118:1660-1668.
- 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.
- ROBKER, R.L.; RICHARDS, J.S.(1998). Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27^{KIP1}. *Mol. Endocrinol.* 12: 924-940.
- ROSENFELD, C.S.; WAGNER, J.S.; ROBERTS, R.M.; LUBAHN, D.B. (2001). Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction* 122:215-226.
- ROSS, M.H.; KAYE, G.I.; PAWLINA, W. (2005). *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular.* 4ta Edición. Pp 863.
- 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.
- SALUSTRI, A.; CAMAIONI, A.; DI GIACOMO, M.; FULOP, C.; HASCALL, V.C. (1999). Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Hum. Reprod. Update.* 5:293-301.
- SALUSTRI, A.; YANAGISHITA, M.; UNDERHILL, C.B.; LAURENT, T.C.; HASCALL, V.C. (1992). Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev. Biol.* 151:541-551.

- SALVETTI, N.R.; CANAL, A.M.; GIMENO, E.J.; ORTEGA, H.H. (2004). Polycystic Ovarian Syndrome: temporal characterization of the induction and reversion process in an experimental model. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 41:389-395.
- SALVETTI, N.R.; MULLER, L.A.; ACOSTA, J.C.; GIMENO, J.E.; ORTEGA, H.H. (2007). Estrogen Receptors α and β and Progesterone Receptors in Ovarian Follicles of Cows with Cystic Ovarian Disease. *Vet. Pathol.* En Prensa.
- SANTINI, D.; CECCARELLI, C.; MAZZOLENI, G.; PASQUINELLI, G.; JASONNI, V.M.; MARTINELLI G.N. (1993). Demonstration of cytokeratin intermediate filaments in oocytes of the developing and adult human ovary. *Histochemistry* 99: 311-319.
- SAUNDERS, P.T.K.; MAGUIRE, S.M.; GAUGHAN, J.; MILLAR, M.R. (1997). Expression of oestrogen receptor beta (ERb) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J. Endocrinol.* 154:R13-R16.
- SCHAMS, D.; KOHLENBERG, S.; AMSELGRUBER, W.; BERISHA, B.; PFAFFL, M.W.; 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.
- SELSTAM, G.; NILSSON, I.; MATTSON M.O. (1993). Changes in the ovarian intermediate filaments desmin during the luteal phase of the adult pseudopregnant rat. *Acta Physiol. Scand.* 147:123-129.
- SHARMA, S.C.; CLEMENS, J.W.; PISARSKA, M.D.; 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.
- SILVIA, W.J.; HATLER, T.B.; NUGENT, A.M.; LARANJA DA FONSECA, L.F. (2002). Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23:167-177.
- SILVIA, W.J.; MCGINNIS, A.S.; HATLER, T.B. (2005). A comparison of adrenal gland function in lactating dairy cows with or without ovarian follicular cysts. *Reprod. Biol.* 5:19-29.
- SINGH, R.B. (1969). Persistent estrus: An experimental model of the polycystic ovary syndrome. *Obstet. Gynecol.* 24:2-17.
- SLOT, K.A.; VOORENDT, M.; DE BOER-BROUWER, M.; VAN VUGT, H.H.; 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.
- SUNDFELDT, K.; PIONTKIEWITZ, Y.; BILLIG, H., HEDIN, L. (2000). E-cadherin-catenin complex in the rat ovary: cell-specific expression during folliculogenesis and luteal formation. *J. Reprod. Fertil.* 118:375-385.
- SVENSSON, E.C.; MARKSTROM, E.; ANDERSSON, M.; BILLIG H. (2000). Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotropin. *Biol. Reprod.* 63:1457-1464.
- TAFT, R.; AHMAD, N.; INSKEEP, E.K. (1996). Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *J. Anim. Sci.* 74:2985-2991.

- TAKAHASHI, H.; FUJITA, S.; OKABE H. (1991). Immunohistochemical characterization of basal cell adenomas of the salivary gland. *Pathol. Res. Pract.* 187: 145-156.
- TERRANOVA, P.F. (1981). Steroidogenesis in experimentally induced atretic follicles of the hamster: a shift from estradiol to progesterone synthesis. *Endocrinology* 108: 1885-1890.
- TILLY, J.L.; KOWALSKI, K.I.; JOHNSON, A.L.; HSUEH A.J.W. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129:2799-2801.
- TILLY, J.L.; KOWALSKI, K.I.; SCHOMBERG, D.W.; HSUEH A.J.W (1992). Apoptosis in atretic follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology* 131:1670-1676.
- TUNG, L.; MOHAMED, M.K.; HOEFFLER, J.P.; TAKIMOTO, G.S.; 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.T.; WOUTERSEN, P.J.; VAN DER SCHOOT P. (1980). Atresia of preovulatory follicles: gonadotrophin binding and steroidogenic activity *Biol. Reprod.* 23:219-229.
- UILENBROEK, J.TH.J.; RICHARDS, J.S. (1979). Ovarian follicular development during the rat estrous cycle: gonadotropin receptors and follicular responsiveness. *Biol. Reprod.* 20:1159-1165.

- 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. (2002) Cell-specific Distribution of Oestrogen Receptor-alpha in the Bovine Ovary. *Reprod. Dom. Anim.* 37: 291-293
- VAN DEN HURK, R.; DIJKSTRA, G. (1992). An immunohistochemical study of bovine antral follicles, with special attention to nonatretic follicles with and without atypical granulosa cells. *Vet. Quart.* 14:148-151.
- VAN DEN HURK, R.; DIJKSTRA, G.; VAN MIL, F.N.; HULSHOF, S.C.; VAN DEN INGH, S.G.A.M.TH. (1995). Distribution of the intermediate filament proteins vimentin, keratin, and desmin in the bovine ovary. *Mol. Reprod. Dev.* 41:459-467.
- VEGETO, E.; SHABAZ, M.M.; WEN, D.X.; GOLDMAN, M.E.; O'MALLEY, B.W.; 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.; ERIKSSON, H.; 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, H.; MASIRONI, B.; ERIKSSON, H.; SAHLIN, L. (1999). A comparative study of estrogen receptors α and β in the rat uterus. *Biol. Reprod.* 61:955-964.

- WEI, L.L.; 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. ; 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.; 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.; 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.
- XIONG, Y.; CONNOLLY, T.; FUTCHER, B.; BEACH, D. (1991). Human D-type cyclin. *Cell* 65:691-99.
- XIONG, Y.; ZHANG, H.; BEACH, D. (1992). D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71:505-514.
- YANG, P.; KRIATCHKO, A.; SHYAMAL, R. (2002). Expression of ER- α and ER- β in the Hamster Ovary: Differential Regulation by Gonadotropins and Ovarian Steroid Hormones. *Endocrinology* 143:2385-2398.
- YOSHIOKA, K.; IWAMURA, S.; 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.

ZWIJSEN, R.M.L.; WIENTJENS, E.; KLOMPMAKER, R.; VAN DER SMAN, J.;
BERNARDS, R.; MICHALIDES, R.J.A.M. (1997). CDK-independent
activation of estrogen receptor by cyclin D1. Cell 88:405-415.