



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR APLICADA
ICIVET LITORAL UNL-CONICET

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE ELEMENTOS
DE RESPUESTA A ESTRÉS EN EL OVARIO Y
SU IMPLICANCIA EN LA PATOGENIA DE LA
ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA
EN BOVINOS**

AUTORA: LIC. AYELEN N. AMWEG

DIRECTOR: DR. HUGO H. ORTEGA

Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo, involúcrame y lo aprendo...

B. Franklin

Dedico este trabajo...

A mis padres Miriam y Ricardo, mis ejemplos a seguir día a día.

A Leandro, por tomarme de la mano y transitar juntos el camino de la vida.

A Luca, mi infinita felicidad.

Agradecimientos...

A mis padres y hermanos (Eve, Jesi y Exe), por el apoyo incondicional en cada uno de mis pasos, por su amor y contención. Por enseñarme que los pilares fundamentales se construyen en la familia.

A Leandro y Luca por hacerme feliz día a día con tanto amor.

Al Doctor Hugo Ortega, por brindarme la posibilidad de seguir creciendo en este ámbito, por todos sus conocimientos transmitidos y por ser ejemplo de perseverancia en las metas a alcanzar.

A las Doctoras Natalia Salvetti, Florencia Rey y Bibiana Dallard, por su infinita paciencia y dedicación en cada una de mis inquietudes.

A todos mis compañeros y amigos de trabajo: Celina Baravalle, Fernanda Rodríguez, Ma. Sol Renna, Carolina Panzani, Belkis Marelli, Carolina Andreotti, Valentina Matiller, Ma. Eugenia Baravalle, Elizabet Pereyra, Melisa Velázquez, Natalia Alfaro, Mónica Cadoche, Antonela Stassi, Marcelo Zayas, Pablo Díaz, Gustavo Hein, Matías Belotti, Pablo Siroski, Matías Stangaferro, Leandro Neme, Emilia Huber, Natalia Gareis, Magalí Colombero, Germán Benítez, Paula Silvestrini, Andrea Duré, Ma. Belén Peralta, Adrián Perri, Lucas Monje, por los lindos momentos compartidos día a día dentro y fuera del laboratorio. Por cada uno de sus consejos, enseñanzas y cariños.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, por brindarme el marco académico para el desarrollo de la presente tesis.

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

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

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

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS UTILIZADAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Histofisiología del ovario.....	2
1.1.1 Foliculogénesis.....	2
1.1.2 Endocrinología del crecimiento folicular y la ovulación.....	6
1.1.3 Ciclo estral en bovinos.....	10
1.1.4 Ondas foliculares.....	12
1.1.5 Atresia folicular.....	15
1.1.6 Ovulación y formación del cuerpo lúteo.....	16
1.2 Efectos del estrés sobre la reproducción.....	17
1.3 Mecanismos de respuesta al estrés.....	20
1.3.1 Receptores de Melanocortinas (MCRs) y sus funciones.....	21
1.3.1.1 <i>MC2R y su interacción con ACTH</i>	24
1.4 Mecanismo de acción de los glucocorticoides.....	24
1.4.1 Acción de los glucocorticoides (GC) a nivel ovárico.....	25
1.4.2 Enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11BHSD).....	26
1.4.2.1 <i>Expresión de las isoformas 11βHSD en ovario</i>	28
1.4.3 Receptor de glucocorticoides (GR).....	30
1.4.3.1 <i>Mecanismo de acción del GR</i>	32
1.4.3.2 <i>El GR en la reproducción</i>	34
1.5 Enfermedad Quística Ovárica (del inglés Cystic Ovarian Disease: COD).....	35
1.5.1 Definición.....	36
1.5.2 Factores predisponentes en la formación de quistes.....	36
1.5.2.1 <i>Factores generales</i>	36
1.5.2.2 <i>Factores específicos</i>	38
1.5.3 Etiología y Patogenia.....	39
1.5.3.1 <i>Disfunción hipotálamo-hipofisaria</i>	40
1.5.3.2 <i>Disfunción ovárica/folicular</i>	41
2. OBJETIVOS	44
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1 Procedimientos llevados a cabo con animales.....	48

3.1.1 Diagnóstico y obtención de muestras provenientes de casos de COD espontánea identificados a campo.....	48
3.1.1.1 Aspiración folicular guiada por ecografía.....	48
3.1.1.2 Ovariectomía bilateral mediante abordaje transvaginal.....	49
3.1.2 Inducción experimental de COD.....	51
3.1.2.1 Animales.....	51
3.1.2.2 Grupos experimentales.....	52
3.1.2.3 Monitoreo de los cambios ováricos.....	53
3.1.2.4 Ovariectomía bilateral mediante abordaje por el flanco.....	53
3.1.2.5 Procesamiento de las muestras.....	54
3.1.3 Obtención y procesamiento de muestras obtenidas en la playa de faena.....	55
3.2 Cultivos de tejidos.....	56
3.2.1 Obtención y procesamiento de las muestras.....	56
3.2.2 Tratamiento hormonal de los cultivos de tejidos.....	57
3.3 Determinaciones hormonales.....	58
3.4 Obtención y cuantificación de ARNm correspondiente a 11 β HSD, GR y MCRs.....	58
3.4.1 Extracción de ARN total.....	58
3.4.2 Transcripción Reversa para la síntesis del ADN copia (ADNc).....	59
3.4.3 Diseño de cebadores específicos para las enzimas 11 β HSD, los receptores MCRs y GR, y otros genes.....	60
3.4.4 PCR de punto final.....	62
3.4.5 PCR en tiempo real.....	63
3.4.6 Secuenciación Nucleotídica.....	65
3.5 Detección y cuantificación de las proteínas 11 β HSD y GR.....	65
3.5.1 Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas.....	65
3.5.2 Inmunohistoquímica.....	65
3.5.3 Procesamiento de las muestras para la técnica de Western Blot.....	68
3.5.4 Western Blot.....	69
3.6 Análisis digital de imágenes.....	71
3.7 Evaluación estadística.....	72
4. RESULTADOS.....	74
4.1 Resultados de procedimientos realizados con animales.....	75
4.1.1 Diagnóstico y obtención de muestras provenientes de casos con COD espontánea identificados a campo.....	75
4.1.2 Inducción de la enfermedad quística ovárica.....	76
4.1.3 Efecto de la ACTH sobre los niveles de hormonas esteroides.....	78
4.1.4 Concentración de las hormonas esteroides en suero y líquido folicular en el momento de la ovariectomía.....	80
4.2 Cultivo de tejidos.....	81
4.2.1 Efectos de la ACTH sobre la secreción de hormonas esteroides.....	81
4.2.2 Efectos de la estimulación con ACTH sobre la expresión de las 11 β HSD en la pared folicular.....	82
4.2.2.1 Evaluación de la expresión proteica de 11 β HSD1 por Western Blot.....	83
4.2.2.2 Evaluación de la expresión proteica de 11 β HSD2 por Western Blot.....	84
4.3 Caracterización y evaluación de las enzimas 11 β HSD en animales controles y con COD.....	84

4.3.1 Caracterización y evaluación de la enzima 11 β HSD1.....	85
4.3.1.1 Evaluación de la expresión de la enzima 11 β HSD1 mediante PCR en tiempo real en muestras de frigorífico.....	85
4.3.1.2 Evaluación de la expresión de la enzima 11 β HSD1 mediante Western Blot en muestras de frigorífico.....	86
4.3.1.3 Evaluación de la expresión de la enzima 11 β HSD1 mediante inmunohistoquímica indirecta.....	87
4.3.2 Caracterización y evaluación de la enzima 11 β HSD2.....	91
4.3.2.1 Evaluación de la expresión de la enzima 11 β HSD2 mediante PCR en tiempo real en muestras de frigorífico.....	91
4.3.2.2 Evaluación de la expresión de la enzima 11 β HSD2 mediante Western Blot en muestras de frigorífico.....	92
4.3.2.3 Evaluación de la expresión de la enzima 11 β HSD2 mediante inmunohistoquímica indirecta.....	92
4.4 Caracterización y evaluación del GR.....	96
4.4.1 Evaluación de la expresión del GR mediante PCR en tiempo real en muestras de frigorífico.....	96
4.4.2 Evaluación de la expresión del GR mediante inmunohistoquímica indirecta.....	97
4.5 Caracterización y evaluación de los MCRs.....	101
4.5.1 Evaluación de la expresión de los MCRs mediante PCR en muestras de frigorífico.....	101
4.5.2 Evaluación de la expresión del MC2R mediante PCR en tiempo real en muestras de frigorífico.....	104
5. DISCUSIÓN.....	106
5.1 Inducción experimental de la enfermedad quística ovárica y relación con los hallazgos en la enfermedad que se presenta de manera espontánea en bovinos.....	107
5.2 Efectos de la ACTH sobre la secreción de esteroides <i>in vitro</i>	110
5.3 Expresión de los MCRs y su relación con la función de la ACTH en el ovario...	111
5.4 Expresión de las enzimas 11 β HSD en el ovario bovino de animales con COD y su implicancia en el metabolismo de los GC.....	114
5.5 Expresión del GR en el ovario bovino con COD.....	118
6. CONCLUSIONES.....	120
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
8. PUBLICACIONES.....	153

ABREVIATURAS UTILIZADAS

°C	Grado centígrado
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
11βHSD	11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
11βHSD1	11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
11βHSD2	11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADH	Hormona antidiurética
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina sérica bovina
CaCl₂	Cloruro de calcio
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CL	Cuerpo lúteo
CO₂	Dióxido de carbono
COD	Enfermedad quística ovárica
Ct	Ciclo umbral (del inglés: Cycle thershold)
CYP17A1	Enzima citocromo P450 17α-hidroxilasa/17,20-liasa
CYP19A1	Enzima citocromo P450 aromatasa
DAB	3,3-Diaminobencidina
DEPC	Dietil pirocarbonato
dl	Decilitro

dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EIA	Enzimoimmunoanálisis
ERG	Elementos de respuesta a glucocorticoides
FSH	Hormona folículo estimulante
FSHR	Receptor de hormona folículo estimulante
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GC	Glucocorticoides
GFG	Globulinas fijadoras de glucocorticoides
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GR	Receptor de glucocorticoides
GRα	Receptor de glucocorticoides isoforma α
GRβ	Receptor de glucocorticoides isoforma β
HSP90	Proteína de golpe térmico 90KDa
IGF	Factor de crecimiento análogo a la insulina
IgY	Inmunoglobulina Y
IL-1β	Interleuquina 1 β
IL-6	Interleuquina 6
KCl	Cloruro de potasio
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
KH₂PO₄	Fosfato ácido de potasio
LH	Hormona luteinizante
LHR	Receptor de hormona luteinizante
mA	Miliamperes
MC1R	Receptor de melanocortina tipo 1
MC2R	Receptor de melanocortina tipo 2
MC3R	Receptor de melanocortina tipo 3
MC4R	Receptor de melanocortina tipo 4

MC5R	Receptor de melanocortina tipo 5
MCRs	Receptores de melanocortinas
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramo
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MgSO₄	Sulfato de magnesio
MHz	Megahercios
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mm Hg	Milímetro de mercurio
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MR	Receptor de mineralcorticoides
MRAP	Proteína accesoria del MC2R
MSH	Hormona estimulante de melanocitos
NaCl	Cloruro de sodio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
ng	Nanogramo
nM	Nanomolar
O₂	Oxígeno
pb	Pares de bases
PBS	Buffer Fosfato Salino
PGF2α	Prostaglandina F2 α
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramo
PM	Peso molecular
POMC	Proopiomelanocortina
RE	Retículo endoplasmático
SDS	Dodecil sulfato de sodio

SEM	Error típico de la media
SNC	Sistema nervioso central
TBS-T	Buffer tris salino-Tween
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
UI	Unidades internacionales
V	Voltio
W	Vatio
α-MSH	Hormona estimulante de melanocitos α
β-MSH	Hormona estimulante de melanocitos β
γ-MSH	Hormona estimulante de melanocitos γ

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación morfológica de folículos ováricos más empleada para bovinos (Braw-Tal y Yossefi, 1997; Fortune, 2003; Palma, 2008; Aerts y Bols, 2010a).	5
Tabla 2	Cebadores sentido y antisentido específicos para bovino y condiciones de la PCR de punto final.	61
Tabla 3	Cebadores sentido y antisentido específicos para cada ADNc bovino y condiciones de la PCR en tiempo real.	61
Tabla 4	Condiciones utilizadas en PCR tiempo real para los diferentes genes evaluados.	64
Tabla 5	Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.	66
Tabla 6	Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de Western Blot.	70
Tabla 7	Tejidos controles utilizados para analizar la expresión de los ARNm de los MCRs en diferentes tejidos bovinos.	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Desarrollo folicular. Esquema de un corte longitudinal de ovario adulto en el cual se observan las distintas categorías de folículos en crecimiento, la ovulación, cuerpo lúteo y cuerpo blanco (Modificado de Enciclopedia Británica, 2007).	4
Figura 2	Principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento con sus componentes (Adaptado de Ross y col. 2004).	5
Figura 3	Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipófisis y el ovario. (Gartner y Hiatt, 1997).	6
Figura 4	Biosíntesis de esteroides en el ovario. Adaptado de Drummond, 2006.	10
Figura 5	Diagrama del ciclo estral bovino, en un modelo de 2 ondas foliculares, mostrando los niveles hormonales en cada una de las de las fases folicular y luteal (Adaptado de Enciclopedia Bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM).	12
Figura 6	Fases de reclutamiento, selección y dominancia en un patrón de crecimiento de 3 ondas durante un ciclo estral bovino en un modelo de 3 ondas. Adaptado de Aerts y Bols, 2010b.	15
Figura 7	Procesamiento post-traducciona l de la molécula precursora proopiomelanocortina (POMC). En la figura se muestran los sucesivos productos del clivaje de POMC. Adaptado de M.W. King (1997).	22
Figura 8	Interconversión de cortisol y cortisona por la oxidación o reducción enzimática en el carbono 11 (C11), catalizada por las isoformas de 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 β HSD). Adaptado de Michael y col., 2003.	28
Figura 9	Estructura funcional del receptor de glucocorticoides (GR). La proteína del GR tiene 3 dominios: el amino terminal, el de unión al ADN (DBD, de DNA binding domain) y el carboxilo terminal para unión a la hormona. También se muestran las zonas de unión independiente del ligando (AF-1) y dependiente del ligando (AF-2) relacionadas con las funciones de activación transcripcional (www.fotosimagenes.org).	31
Figura 10	Organización genómica del gen del receptor de glucocorticoides (GR) y las diferentes isoformas que genera. Las secuencias de los exones que se traducen se muestran como áreas oscuras, mientras que los extremos 5' y 3' no traducidos de los exones 1 y 9 se muestran como zonas más claras. Los intrones se representan como líneas. (Cosío y col., 2005).	32

Figura 11	Mecanismo de acción del receptor de glucocorticoides (GR): en la sangre, los glucocorticoides (GC) se encuentran ligados a las globulinas fijadoras de glucocorticoides (GFG). En el citoplasma celular se une a su receptor específico (GR), se produce la dimerización y translocación al núcleo donde ejercen su acción sobre el ADN. Allí se une a secuencias específicas de bases, denominadas elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG) y de esta manera, actúa sobre el gen promotor, e induce la síntesis de ARN mensajero. Éste sale al citoplasma y es traducido en los ribosomas, para formar proteínas que son secretadas o permanecen dentro de la misma célula (Adaptado de Gómez Ordóñez y col., 2007).	34
Figura 12	Técnica de aspiración folicular guiada por ecografía.	49
Figura 13	Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje transvaginal.	50
Figura 14	Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes ováricos foliculares mediante administración de ACTH.	52
Figura 15	Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje por flanco izquierdo.	54
Figura 16	Ovarios provenientes de playa de faena. A: ovarios sanos con folículos terciarios grandes y CL. B: ovarios con estructura quística de diámetro superior a 30 mm en uno de ellos.	55
Figura 17	Esquema ilustrativo del protocolo general de cultivo de tejidos de diferentes folículos terciarios grandes (n=6) y folículos quísticos (n=6) de ovarios bovinos.	57
Figura 18	Marcadores de PM para SDS-PAGE, amplio espectro (Rainbow™, RPN800E, GE Healthcare).	69
Figura 19	(A) Imagen ecográfica de un quiste espontáneo en el momento de la aspiración folicular guiada por ecografía. (B) Ovarios de una vaca con COD espontánea obtenidos mediante ovariectomía bilateral.	75
Figura 20	Características morfológicas de los folículos preovulatorios y los quistes en el momento de la ovariectomía. Se muestran las imágenes de ultrasonografía seleccionadas y las características histológicas. Los valores están representados como la media \pm SEM. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$). G: granulosa; TI: teca interna, TE: teca externa.	77
Figura 21	Concentraciones séricas de estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en animales tratados con ACTH y controles durante el protocolo experimental. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Se analizaron los datos obtenidos de muestras recolectadas durante el tratamiento con ACTH y hasta una semana después de la finalización del mismo. D: efecto de días del experimento; T: efecto del tratamiento; D*T: efecto de interacción entre días y tratamiento. Los valores con superíndices indican diferencias (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$) entre los grupos tratados y control.	79

- Figura 22** Concentraciones de estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en suero y líquido folicular en el momento de la ovariectomía. Las barras representan la media \pm SEM para cada hormona en el suero y en el líquido folicular. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 80
- Figura 23** Efectos de la ACTH sobre la secreción de estradiol, progesterona, testosterona y cortisol sobre la pared de folículos terciarios y folículos quísticos. Las barras representan la media \pm SEM. Las diferencias relativas a la secreción basal se indican como * $p < 0,05$. Las diferencias en la secreción basal entre folículos terciarios y quísticos se indican como † $p < 0,01$. 82
- Figura 24** Efectos de la ACTH sobre la expresión de 11 β HSD1 analizada por Western Blot en la pared de folículos terciarios grandes y quísticos cultivados in vitro. Los valores se representan como la media \pm SEM. Las diferencias en la expresión basal y estimulada con ACTH entre folículos terciarios grandes y quísticos se indican como: ## $p < 0,01$. Las diferencias relativas a la condición basal se indican como: * $p < 0,05$. 83
- Figura 25** Efectos de la ACTH sobre la expresión de 11 β HSD2 analizada por Western Blot en la pared de folículos terciarios grandes y quísticos cultivados. Los valores se representan como la media \pm SEM. Las diferencias en la secreción basal y estimulada con ACTH entre folículos terciarios grandes y quísticos se indican como: # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$. Las diferencias relativas a la secreción basal se indican como: * $p < 0,05$. 84
- Figura 26** Cuantificación relativa del ARNm de la enzima 11 β HSD1 por PCR en tiempo real en células de la teca de folículos terciarios pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles y en folículos quísticos (FQ). Los valores $2^{-\Delta\Delta C_t}$ se representan como la media \pm SEM. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 86
- Figura 27** Expresión proteica de 11 β HSD1 en muestras de pared completa de folículos terciarios pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (FQ), de ovarios provenientes de frigorífico, mediante Western Blot. Los valores de densidad óptica están representados como la media \pm SEM. Las diferencias significativas entre la expresión del monómero (34KDa) y el dímero de la proteína (68KDa) en todas las categorías foliculares se indican como: ** $p < 0,01$. 87
- Figura 28** Imágenes representativas de la inmunomarcación de 11 β HSD1 en folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos del grupo control, y en folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de los grupos con COD espontánea e inducida con ACTH. Con diaminobencidina se marcan los citoplasmas de las células de la granulosa y de la teca interna de los distintos folículos. X40. 88

- Figura 29** Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11 β HSD1 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos del grupo control. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$). 89
- Figura 30** Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11 β HSD1 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de los animales con COD espontánea. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$). 89
- Figura 31** Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11 β HSD1 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de los animales con COD inducida con ACTH. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$). 90
- Figura 32** Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11 β HSD1 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y atrésicos (FA) del grupo control, y además en folículos quísticos (FQ) de animales con COD espontánea e inducida con ACTH. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras entre cada categoría folicular tienen diferencias significativas ($p < 0,05$). Las diferencias relativas de la expresión en folículos quísticos con relación a la expresión en los folículos terciarios controles se indican como: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. 91
- Figura 33** Expresión de 11 β HSD2 en muestras de pared completa de folículos terciarios pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (FQ), de ovarios provenientes de frigorífico, por Western Blot. Los valores de densidad óptica están representados como la media \pm SEM. 92
- Figura 34** Imágenes representativas de la inmunomarcación de 11 β HSD2 en folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos del grupo control, y en folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de los grupos con COD espontánea e inducida con ACTH. Con diaminobencidina se marcan los citoplasmas de las células de la granulosa y la teca interna de los distintos folículos. X40. 93
- Figura 35** Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11 β HSD2 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos del grupo control. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$). 94

Figura 36	Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11 β HSD2 en células de la granulosa y la teca interna de folículos ováricos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de animales con COD espontánea. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).	94
Figura 37	Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11 β HSD2 en células de la granulosa y la teca interna de folículos ováricos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de animales con COD inducida con ACTH. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).	95
Figura 38	Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11 β HSD2 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y atrésicos (FA) del grupo control, y además en folículos quísticos (FQ) de animales con COD espontánea e inducida con ACTH. Los valores están representados como la media \pm SEM.	95
Figura 39	Cuantificación relativa del ARNm del GR por PCR en tiempo real en células de la granulosa de folículos terciarios pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles y en folículos quísticos (FQ). Los valores $2^{-\Delta\Delta C_t}$ están representados como la media \pm SEM.	96
Figura 40	Cuantificación relativa del ARNm del GR por PCR en tiempo real en células de la teca de folículos terciarios pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles y en folículos quísticos (FQ). Los valores $2^{-\Delta\Delta C_t}$ están representados como la media \pm SEM.	97
Figura 41	Placa radiográfica representativa de un Western Blot que muestra la expresión de GR en la pared folicular de folículos terciarios medianos (FM) y grandes (FG) provenientes de material de frigorífico.	97
Figura 42	Imágenes representativas de la inmunomarcación del GR en folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos del grupo control, y en folículos primarios, secundarios, preovulatorios, atrésicos y quísticos de los grupos con COD espontánea e inducida con ACTH. Con diaminobencidina se marcan los núcleos de las células de la granulosa y de la teca interna de los distintos folículos. X40.	98
Figura 43	Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) del GR en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos de animales controles. Los valores están representados como la media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).	99

- Figura 44** Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) del GR 99 en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de animales con COD espontánea. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).
- Figura 45** Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) del GR 100 en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de animales con COD inducida con ACTH. Los valores están representados como la media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).
- Figura 46** Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) del GR 101 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y atrésicos (FA) de ovarios controles y además en folículos quísticos (FQ) de ovarios con COD espontánea e inducida con ACTH. Los valores están representados como la media \pm SEM. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las diferencias relativas de la expresión en folículos quísticos con relación a la expresión en los folículos terciarios controles se indican como: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.
- Figura 47** Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos específicos de PCR de 102 punto final mostrando la expresión de los MCRs y genes controles en los componentes ováricos bovinos y en tejidos controles. FP: folículo pequeño; FM: folículo mediano; FG: folículo grande; G: granulosa; T: teca; CL: cuerpo lúteo; E: estroma; H: hígado; B: bazo; ME: médula espinal; L: linfocitos; A: adrenal.
- Figura 48** Expresión relativa de los receptores de melanocortina (ARNm MCRs/ ARNm 103 GAPDH) en las diferentes estructuras ováricas bovinas y en tejidos control. FP: folículo pequeño; FM: folículo mediano; FG: folículo grande; G: granulosa; T: teca; CL: cuerpo lúteo; E: estroma. Los valores están representados como la media \pm SEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

RESUMEN

La enfermedad quística ovárica (COD) es una importante causa de infertilidad en bovinos, y el estrés uno de los principales factores que influyen en su presentación. La hormona adrenocorticotrópica (ACTH), principal hormona relacionada al estrés, ha sido implicada en mecanismos relacionados con la ovulación, la esteroidogénesis y la función luteal a través de los receptores de melanocortinas (MCRs). El presente estudio fue diseñado para determinar la acción del estrés en la COD mediante la evaluación de la influencia de la ACTH *in vitro* e *in vivo* sobre la esteroidogénesis, los patrones de expresión de los MCRs, las isoformas de la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 β HSD) y los receptores de glucocorticoides (GR), comparándolo con lo que ocurre en animales que presentan la enfermedad de forma espontánea. Mediante RT-PCR pudo detectarse ARNm para los cinco tipos de MCRs en el ovario bovino y específicamente para el MC2R en las células de la teca. La estimulación *in vitro* con ACTH produjo un incremento en los niveles de cortisol y testosterona y en la expresión de 11 β HSD1 en folículos terciarios y quísticos, y una disminución en la expresión de 11 β HSD2 en quistes. La estimulación *in vivo* indujo un incremento en ambas enzimas a medida que los folículos maduraban. Además, los quistes espontáneos e inducidos mostraron un aumento en los niveles de expresión de 11 β HSD1 en la granulosa en relación a los folículos terciarios controles. Por otro lado, la expresión del GR en la granulosa fue mayor en folículos terciarios y quísticos de animales con COD, en relación a los folículos terciarios de animales sanos. Estos resultados indican que la ACTH, a través de su efecto estimulante sobre la secreción de esteroides, puede estar directamente implicada en los mecanismos regulatorios de la función ovárica, y en este contexto se atribuiría un rol importante al cortisol en el desarrollo de la patogenia de la COD, dada la exposición de los quistes foliculares a altas concentraciones de glucocorticoides activos.

ABSTRACT

Cystic ovarian disease (COD) is an important cause of infertility in cattle, and stress is one of the main factors that influence their presentation. The adrenocorticotrophic hormone (ACTH), principal hormone associated with stress, has been implicated in mechanisms associated with ovulation, and the luteal steroidogenesis function through melanocortin receptors (MCRs). The present study was designed to determine the action of stress in the COD by evaluating the *in vitro* and *in vivo* influence of ACTH on steroidogenesis, the expression patterns of MCRs, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) isoforms and glucocorticoid receptor (GR), compared to what happens in animals with spontaneous disease presentation. By RT-PCR, mRNA could be detected for the five types of MCRs in the bovine ovary and MC2R specifically for theca cells. The *in vitro* stimulation with ACTH resulted in increased levels of cortisol and testosterone hormones and 11 β HSD1 expression in cystic and tertiary follicles, and a decrease in 11 β HSD2 expression in cysts. The *in vivo* stimulation induced an increase in both enzymes while follicles were maturing. Furthermore, spontaneous and induced cysts showed increased expression levels in granulosa 11 β HSD1 relative to controls tertiary follicles. On the other hand, the GR expression in granulosa tertiary follicles was greater in animals with cystic and COD, in relation to the tertiary follicles of healthy animals. These results indicate that the ACTH, through its stimulating effect on the secretion of steroids, could be directly involved in the regulatory mechanisms of the ovarian function, and in this context an important role could be attributed to cortisol in the development of the COD pathogenesis, given the follicular cysts exposure to high concentrations of active glucocorticoids.

1. Introducción

1.1 Histofisiología del ovario

El ovario es una combinación de glándula exocrina y endocrina, por producir tanto ovocitos (“secreción” exocrina) como hormonas ováricas, principalmente estrógenos y progesterona (secreción endocrina). La estructura del ovario normal varía de acuerdo con la especie, la edad y la fase del ciclo sexual. En el bovino, su forma es ovoide y está dividido en una corteza exterior y una médula interior. La médula es el área en la que están contenidos los nervios, un gran número de vasos sanguíneos y los vasos linfáticos. Consta de tejido conectivo laxo y hebras de tejido muscular liso, que se continúan con las del mesovario (Dellmann y col., 1993). La corteza es el área en la que se encuentran los folículos en diferentes estadios de desarrollo y atresia, así como el cuerpo lúteo (Dellmann y col., 1993; Geneser, 2005).

El folículo es la estructura que permite al ovario cumplir su doble función de gametogénesis y esteroidogénesis (Hafez y Hafez, 2000). Es una unidad fisiológica equilibrada cuyo funcionamiento y morfología dependen de factores extracelulares como las gonadotropinas, y de un complejo sistema de relaciones intrafoliculares que actúan sobre sus diversos componentes: el ovocito, granulosa y teca.

1.1.1 Foliculogénesis

Los *folículos primordiales* (unilaminares, preantrales y en reposo) se componen de un único ovocito primario rodeado por una capa simple circundante de células epiteliales aplanadas, las células foliculares. Estos folículos surgen prenatalmente, como consecuencia de la proliferación mitótica de las masas celulares epiteliales internas de la corteza ovárica (Dellmann y col., 1993). La célula central de este acúmulo formado se denomina ovogonia y crece hasta formar el ovocito primario. A medida que el ovocito primario se diferencia, las células que lo rodean forman una monocapa de células planas foliculares. Los ovocitos primarios empiezan la primera división meiótica antes del nacimiento, pero la profase no se completa hasta el momento de la ovulación. En el momento del nacimiento puede haber en el ovario de las diferentes especies, hasta un millón de ovocitos potenciales. La mayoría de

ellos regresionan antes o después del nacimiento y solamente unos cientos son ovulados durante un periodo de vida reproductiva de la hembra.

Los *folículos primarios* (unilaminares, preantrales y en crecimiento) se componen de un ovocito primario rodeado por un epitelio de células foliculares que puede ser de cuboidal simple a cilíndrico simple. En ovinos y bovinos además pueden encontrarse folículos denominados *de transición* en los cuales pueden observarse algunas células foliculares planadas y otras cuboidales dentro de la misma estructura (Braw-Tal y Yossefi, 1997).

Los *folículos secundarios* (multilaminares, preantrales y en crecimiento) se componen de un ovocito primario rodeado por un epitelio estratificado de células foliculares poliédricas denominado células de la granulosa. Los folículos secundarios se caracterizan por el desarrollo de la zona pelúcida, una capa glicoproteica de 3 a 5 μm de grosor, que se sitúa alrededor de la membrana plasmática del ovocito. A medida que el desarrollo del folículo continúa se forman pequeñas áreas, llenas de líquido, entre las células de la granulosa. Hacia el final de la fase del folículo secundario comienza a formarse alrededor de las células de la granulosa una capa multilaminar vascularizada de células en forma de huso, las células de la teca.

Los *folículos terciarios* (multilaminares, antrales y en crecimiento) también llamados folículos de *de Graaf*, se componen de un ovocito primario rodeado por un epitelio estratificado de células de la granulosa denominado cúmulo ovígero. En los folículos terciarios grandes 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). El antro folicular, que caracteriza a los folículos terciarios, se forma cuando las áreas rellenas de líquido, originadas entre las células de la granulosa de los folículos secundarios, se funden para formar una gran cavidad única que contiene el líquido folicular. Las células de la granulosa que forman el estrato granuloso están separadas de las células de la teca por la lámina basal. La mayoría de las células de la granulosa son poliédricas, pero las de la lámina basal pueden ser cilíndricas.

Las células de la teca se diferencian en dos capas, la teca interna que es vascular y la teca externa que es de soporte. Estas células tienen forma de huso y están localizadas en una red de fibras. En la teca interna hay capilares sanguíneos y linfáticos, pero éstos no penetran en el estrato granuloso. La teca externa consiste en una fina capa de tejido conjuntivo laxo con fibroblastos dispuestos concéntricamente alrededor de la teca interna (Figuras 1 y 2).

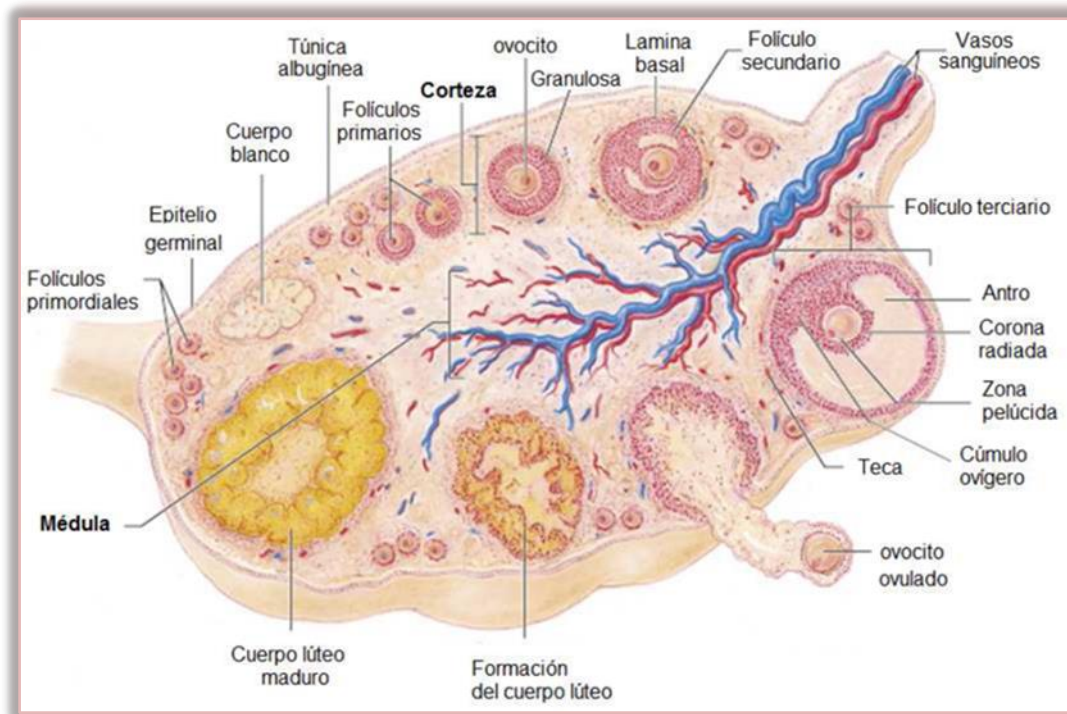


Figura 1: Desarrollo folicular. Esquema de un corte longitudinal de ovario adulto en el cual se observan las distintas categorías de folículos en crecimiento, la ovulación, cuerpo lúteo y cuerpo blanco (Modificado de Enciclopedia Británica, 2007).

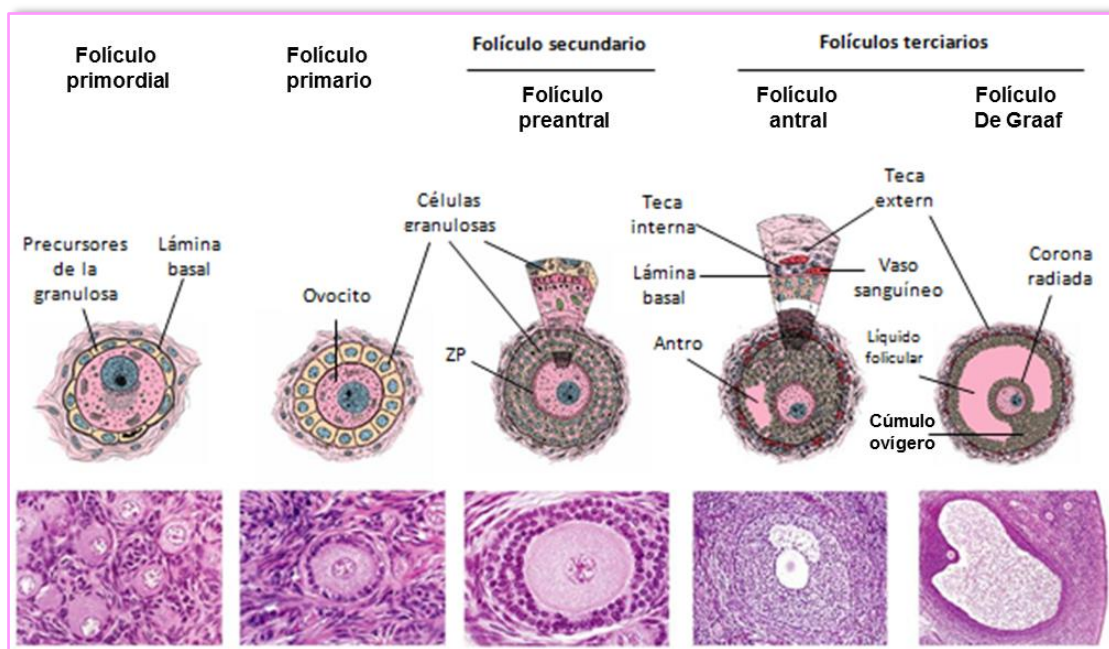


Figura 2: Principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento con sus componentes (Adaptado de Ross y col. 2004).

Todas las características mencionadas anteriormente (forma y capas de células de la granulosa, aparición de zona pelúcida, desarrollo de la teca folicular, etc.), constituyen los parámetros utilizados por los distintos investigadores para obtener una clasificación morfológica de los folículos ováricos (Tabla 1).

Clasificación	Capas de la granulosa	Nº de Células granulosa	Diámetro folicular (μm)	Diámetro ovocito (μm)	Zona pelúcida	Teca interna
Primordial (tipo 1)	1	<10 planas	<40	30	NO	NO
Primario (tipo 2)	1-1,5	10-40 Cúbicas	40-80	31	NO	NO
Preantral pequeño (Secundario) (tipo 3)	2-3	41-100	81-130	49	NO	NO
Preantral grande (Secundario) (tipo 4)	4-6	101-250	131-250	69	+	+
Antral (Terciario) (tipo 5)	>6	>250	250-500	93	++	++

Tabla 1: Clasificación morfológica de folículos ováricos más empleada para bovinos (Braw-Tal y Yossefi, 1997; Fortune, 2003; Palma, 2008; Aerts y Bols, 2010a).

1.1.2 Endocrinología del crecimiento folicular y la ovulación

El proceso reproductivo de los mamíferos está regulado por una combinación de actividades del sistema nervioso central (SNC), el sistema endocrino, ciertos tejidos secretores de mensajeros químicos (factores de crecimiento), tejidos diana y la presencia de sistemas de regulación autocrina/paracrina dentro de las gónadas. La regulación de la actividad ovárica es un proceso integrado que abarca señales extraováricas y factores intrafoliculares (Webb y col., 2004). El ciclo estral está regulado por la interacción hormonal regida por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Figura 3).

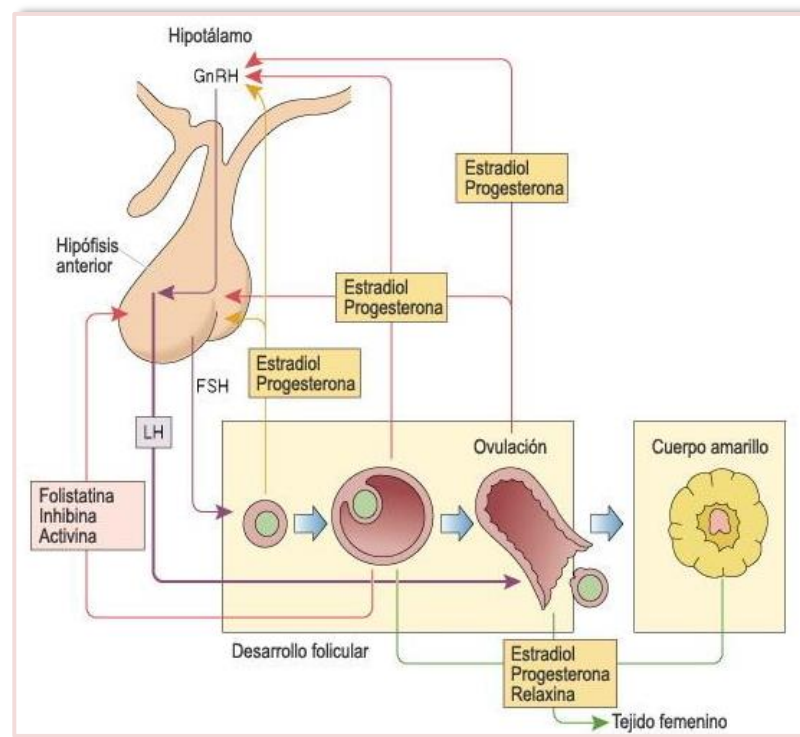


Figura 3: Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipófisis y el ovario. (Gartner y Hiatt, 1997).

El hipotálamo se encuentra en la base del cerebro, y sus neuronas producen la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). La GnRH es un decapeptido sintetizado en los núcleos neurales del hipotálamo, y luego transportada a través de sus axones terminales a la eminencia media y desde aquí difunde a los capilares del sistema porta hipofisario y

por último a las células de la adenohipófisis. La GnRH estimula la síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH). A su vez, algunos péptidos gonadales estimulan (activinas) o inhiben (inhibinas, folicustatina) la secreción de FSH a nivel de la hipófisis.

La FSH y la LH son hormonas glicoproteicas; cada una de ellas está formada por dos subunidades diferentes α y β . La subunidad α es idéntica en las dos hormonas y la subunidad β es diferente y otorga especificidad biológica. Para que la hormona tenga acción biológica es necesaria la presencia de las dos subunidades y su mecanismo de acción se ejerce a través de la unión de la hormona a receptores ubicados en la membrana celular. Los receptores para FSH (FSHR) están sólo presentes en las células de la granulosa, mientras que los receptores para LH (LHR) están localizados tanto en las células de la granulosa como de la teca de los folículos antrales (Hafez y Hafez, 2000; Adams y col., 2008).

La FSH y la LH cumplen un papel fundamental en el control neuroendocrino del ciclo estral. La FSH tiene una función importante en el inicio de la formación del antro. Es responsable del crecimiento y maduración del folículo de *de Graaf*. Además, la FSH induce la sensibilidad de las células de la granulosa hacia la LH al incrementar el número de receptores para esta hormona. La LH es responsable de la ovulación y de la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo (CL).

La secreción de las hormonas FSH y LH hacia la circulación se realiza en forma de pulsos regulados por dos sistemas: tónico y cíclico. El sistema tónico regula el nivel basal circulante de hormonas hipofisarias, que permite el desarrollo de los elementos germinales y endocrinos de las gónadas. El sistema cíclico opera por sólo 12 a 24 horas en cada uno de los ciclos reproductivos de la hembra y tiene por función desencadenar el pico preovulatorio de LH y, en consecuencia, la ovulación (Hafez y Hafez, 2000; Hillier, 2001).

La liberación de LH y FSH es inducida, como se mencionó anteriormente, por pulsos de GnRH desde el hipotálamo; pero a su vez las concentraciones tónicas de LH y de FSH son controladas por retroalimentación negativa desde las gónadas. La frecuencia y amplitud de los pulsos de FSH y LH están influenciadas por las concentraciones circulantes

de progesterona y estradiol. Además, el ovario produce y secreta factores moduladores de la actividad gonadotrópica a nivel celular. Estos moduladores locales incluyen factores de la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), como por ejemplo inhibina y activina, y el factor de crecimiento análogo a la insulina (IGF). La Inhibina y la activina son secretadas por las células de la granulosa. La inhibina, junto con el estradiol, actúa como supresor de FSH en la glándula pituitaria, mediante un sistema de retroalimentación negativa. La inhibina suprime la liberación de FSH sin alterar la liberación de LH, por lo que puede ser, en parte, responsable de la liberación diferencial de FSH y LH desde la hipófisis. La activina estimula la proliferación celular, la expresión del FSHR, la secreción de FSH y la producción de estradiol (Hafez y Hafez, 2000; Knight y Glister, 2001; Aerts y Bols, 2010a).

Recientemente se ha documentado que una familia de péptidos estrechamente relacionados entre sí, las Kisspeptinas, son los inductores más potentes de la liberación de GnRH/ gonadotropinas conocidos a la fecha (Roa y col., 2009), en varias especies (Pinilla y col., 2012, Navarro y Tena-Sempere, 2012; Witchel y Tena-Sempere, 2013). Las Kisspeptinas, también conocidas como metastinas, son neuropéptidos hipotalámicos producto de la transcripción y traducción del gen *Kiss1*. Su procesamiento post-traducciona l puede dar lugar a una serie de péptidos de 54, 14, 13 y 10 aminoácidos, los cuales poseen una actividad similar, dado que comparten los 10 aminoácidos en los que reside su actividad biológica. Este sistema *Kiss1* está fisiológicamente involucrado también, en un grado variable dependiendo de la especie, en el proceso de diferenciación sexual cerebral, en el momento de la pubertad, en la transmisión de los efectos de la retroalimentación positiva y negativa de los esteroides sexuales, en la generación del pico preovulatorio de gonadotropinas y en la modulación de la función reproductiva por la señales ambientales, como el fotoperiodo y el estrés (García-Galiano y col, 2012). La expresión del gen *Kiss1* y/o de las proteínas Kisspeptinas, y del GPR45 se ha demostrado en el ovario humano, de rata y de mono (Castellano y col., 2006; Gaytan y col., 2009), expresándose específicamente en células de la granulosa, la teca (Ricu y col., 2012) y en CL (Castellano y col., 2006). Además, se mostró que la expresión del ARNm de

Kisspeptina en el ovario aumenta con la aparición de la pubertad y varía en el ciclo estral, siendo mayor su expresión en proestro tardío. Este aumento se podría explicar por la acción de la LH que estimula la expresión del ARNm para kisspeptina (Castellano y col., 2006).

La FSH, como se mencionó anteriormente, tiene una función importante en el inicio de la formación de la cavidad antral. Los folículos preantrales en su etapa tardía así como los folículos antrales tempranos, expresan receptores para dicha hormona. Esta gonadotropina, estimula la mitosis de las células de la granulosa, la formación de líquido folicular y la actividad esteroidogénica del folículo maduro, que depende de la acción de FSH y LH sobre las células de la granulosa y de la teca. La concentración sérica basal de LH muestra oscilaciones cada hora aproximadamente. La LH, en los folículos terciarios, interacciona con los LHR de las células de la teca interna y junto con la enzima citocromo P450 17A1 (CYP17A1) son los responsables de la producción de andrógenos y pequeñas cantidades de estrógenos (principalmente 17β -estradiol) (Hafez y Hafez, 2000; Drummond, 2006; Palma, 2008). Los andrógenos son secretados a los capilares o bien atraviesan la lámina basal para alcanzar la capa de células de la granulosa. Los FSHR expresados por células de la granulosa interaccionan con la FSH, activando una cascada de señalización que culmina con la síntesis de la enzima aromatasa P450 (CYP19A1). Esta enzima es responsable de la aromatización de los andrógenos tecales (testosterona) en estrógenos, que luego son secretados al líquido folicular y los capilares (Figura 4). Además, los niveles basales de LH actúan conjuntamente con FSH en la estimulación de la secreción de estrógenos por parte del folículo ovárico dominante, ya que las células de la granulosa de folículos maduros son inducidas por la FSH a expresar progresivamente LHR. De esta manera, los folículos maduros aumentan su sensibilidad a la onda preovulatoria de dicha hormona. Además, dicho incremento de los LHR, prepara al folículo para el proceso de luteinización posterior a la ovulación (Hafez y Hafez, 2000; Wiltbank y col., 2002; Mihm y Austin, 2002).

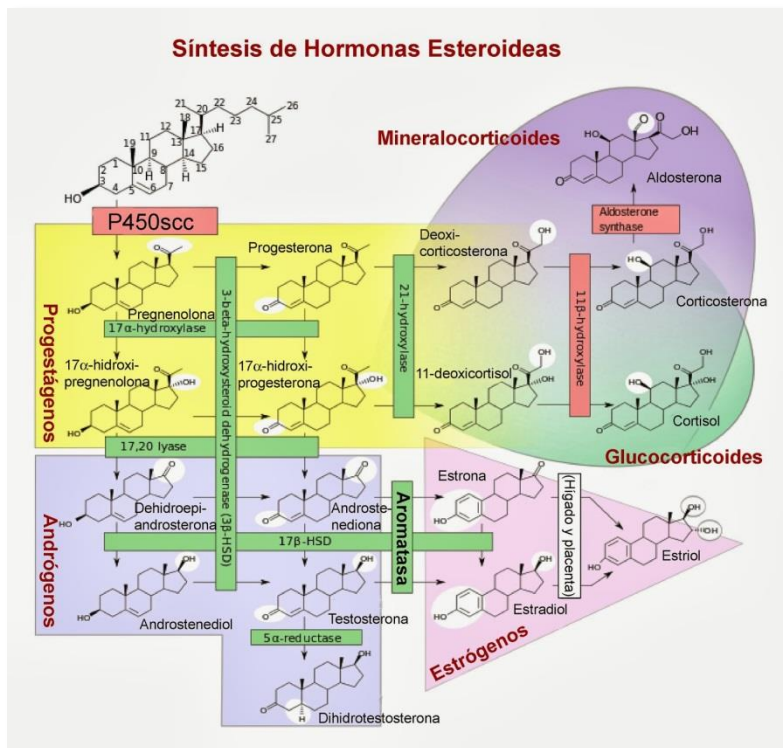


Figura 4: Adaptado de http://es.wikipedia.org/wiki/Hormona_esteroide

La liberación en oleadas de LH y FSH induce las etapas finales de la maduración del ovocito a la Metafase II, justo antes de la ovulación. En este sistema de retroalimentación positiva, concentraciones crecientes de una hormona causan incrementos subsiguientes de la otra. Esto es, un aumento en la concentración de estrógeno circulante tiene un efecto de retroalimentación positiva en el centro cíclico del hipotálamo, induciendo una onda repentina de liberación de GnRH, la cual se acompaña por la onda preovulatoria de LH y FSH. En consecuencia, los niveles de estradiol disminuyen inmediatamente después de la liberación cíclica de estas dos gonadotropinas (Hafez y Hafez, 2000).

1.1.3 Ciclo estral en bovinos

El ciclo estral representa el patrón cíclico de la actividad ovárica que permite a la hembra pasar de un periodo reproductivo no receptivo a uno receptivo, permitiendo el apareamiento y la consecuente preñez. El comienzo de la madurez sexual ocurre en la pubertad. En las vaquillonas, la pubertad comienza alrededor de los 6-12 meses de edad, generalmente con un peso de 200-250 kg. (Forde y col., 2011).

Las hembras bovinas tienen un comportamiento poliéstrico continuo y muestran conducta de celo cada 21 días aproximadamente (18-24 días). El ciclo estral está regulado por las hormonas del hipotálamo (GnRH, Kisspeptina), la glándula hipófisis (FSH y LH), los ovarios (progesterona, 17β -estradiol e inhibinas) y el útero (prostaglandina $F2\alpha$ -PGF 2α). Estas hormonas funcionan a través de un sistema de retroalimentación positiva y negativa para gobernar el ciclo estral en los bovinos (Roche, 1996; Forde y col., 2011; Endo y col., 2012).

En el bovino, el ciclo estral consiste en dos etapas generales: la fase luteal (14-18 días) y la fase folicular (4-6 días). La fase luteal es el periodo que sigue a la ovulación cuando se forma el CL, y generalmente se divide en metaestro y diestro. Durante esta fase, las concentraciones de progesterona secretadas por el CL regulan el desarrollo folicular por un mecanismo de retroalimentación negativa de la frecuencia pulsátil de liberación de LH (Kinder y col., 1996; Endo y col., 2012). La fase folicular, por otro lado, es la fase que continúa a la desaparición del CL (luteólisis) hasta la ovulación, y generalmente se la designa como proestro y estro. Durante la fase folicular, en la mayoría de las especies tienen lugar la maduración final y la ovulación del folículo ovulatorio, donde el ovocito es liberado dentro del oviducto permitiendo la posterior fecundación (Forde y col., 2011). Sin embargo en el bovino la ovulación tiene lugar en metaestro. (Figura 5).

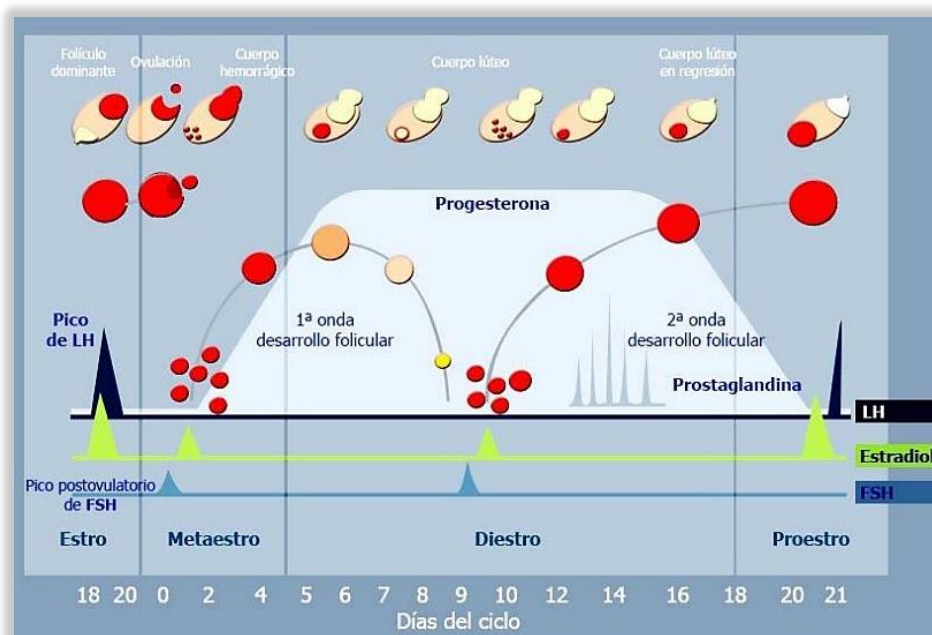


Figura 5: Diagrama del ciclo estral bovino, en un modelo de 2 ondas foliculares, mostrando los niveles hormonales en cada una de las de las fases folicular y luteal (Adaptado de Enciclopedia Bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM).

1.1.4 Ondas foliculares

En el bovino existen varios miles de folículos ováricos, pero sólo un ovocito es liberado en cada ciclo estral. El proceso de crecimiento continuo y regresión de folículos antrales que conduce al desarrollo del folículo preovulatorio se conoce como dinámica folicular y se refiere al crecimiento de dichas estructuras en oleadas o grupos. Las ondas de crecimiento ocurren durante los ciclos estrales, pero aparecen también en las terneras pre-púberes (Evans y col., 1994), durante la gestación (Ginther y col., 1989), en el periodo postparto y en la lactancia (Savio y col., 1990), y en los periodos de anestro (Bossis y col., 2000).

La introducción de la ultrasonografía en medicina veterinaria permitió el monitoreo del crecimiento de folículos con un diámetro mayor a 2mm, como así también de la atresia, y la confirmación que los folículos crecen en patrones con formas de ondas (Pierson y Ginther, 1984; Pierson y Ginther, 1988; Adams y col., 2008; Perry, 2012).

El ciclo estral bovino generalmente consiste en dos o tres ondas foliculares, y cada onda comienza con el reclutamiento de una cohorte de folículos antrales pequeños de un

pool de folículos antrales pequeños en crecimiento. Un folículo es subsecuentemente seleccionado de esta cohorte para continuar su crecimiento y convertirse en dominante, mientras que el resto de los folículos se convierten en atrésicos y regresionan. Bajo la influencia de la progesterona (diestro), el folículo dominante de una onda no ovulatoria sufre atresia y da lugar al inicio de una nueva onda folicular. El folículo dominante presente en el comienzo de la luteólisis se convierte en el folículo ovulatorio, y la emergencia de la siguiente onda folicular se retrasa hasta el día de la ovulación (Adams y col., 2008; Perry, 2012).

Cada onda de crecimiento puede ser subdividida en una fase de reclutamiento, selección y dominancia, seguidas por la atresia u ovulación del folículo dominante (Aerts y Bols, 2010b; Forde y col., 2011) (Figura 6).

Reclutamiento: El inicio del desarrollo folicular está caracterizado por la emergencia de una cohorte de folículos antrales, que no sufren apoptosis debido a los niveles incrementados de FSH circulante. En la vaca, una cohorte en desarrollo típicamente consiste de 5-20 folículos mayores a 5mm (Adams y col., 1992; Sunderland y col., 1994), o 8-41 folículos de 3-4mm de diámetro (Adams y col., 2008; Forde y col., 2011; Perry, 2012). Esto marca el principio de la dependencia, en el crecimiento folicular, de FSH con la expresión de FSHR, localizados en las células de la granulosa de los folículos el día 3 de la onda folicular (Camp y col., 1991; Evans y Fortune, 1997). Este incremento transitorio en las concentraciones de FSH también conduce a un incremento, en las células de la granulosa, de la actividad de la enzima CYP19A1, que cataliza la conversión de andrógenos en estrógenos (Hillier, 1994; Bao y col., 1997). La regresión del folículo dominante durante una onda de crecimiento, o la ovulación al final de un ciclo estral, causa una elevación transiente de FSH circulante. La pérdida del folículo dominante está acompañada por una disminución de los niveles de las hormonas sintetizadas por el folículo, como por ejemplo estrógeno e inhibina, resultando a través de un mecanismo de retroalimentación negativa en un incremento temporario de la secreción de FSH por la hipófisis. La FSH actúa como un factor de supervivencia para los folículos antrales tempranos, etapa en la cual la mayoría de los folículos bajo condiciones fisiológicas se

atresian (Chun y col., 1996). En consecuencia, la FSH es principalmente responsable del reclutamiento de una cohorte pequeña de folículos antrales para la próxima onda de crecimiento (Aerts y Bols, 2010b).

Selección y Dominancia: es el proceso por el cual un único folículo es seleccionado de una cohorte de folículos reclutados para seguir creciendo y convertirse en dominante, mientras que el resto de los folículos sufren atresia y se denominan subordinados. El folículo dominante crece a una tasa constante (Ginther y col., 2001), y los folículos subordinados crecen a una velocidad menor y posteriormente dejan de hacerlo (Fortune y col., 1991; Ginther y col., 1996). A este fenómeno se lo denomina desviación (Ginther y col., 1997) y tiene lugar 2-3 días después de la emergencia de una onda folicular, cuando el folículo dominante tiene un diámetro promedio de 8mm (Fortune y col., 1991; Ginther y col., 1996). Antes de la desviación, todos los folículos en crecimiento conservan la capacidad para convertirse en dominante; luego de la desviación el folículo más grande se convierte en dominante, mientras que los otros regresionan. La producción y secreción de 17β -estradiol e inhibina por los folículos en desarrollo resulta en la supresión de la liberación de FSH. Con la disminución de las concentraciones circulantes de FSH, el folículo dominante cambia su dependencia de FSH a LH (Ginther y col., 1996). Esta dependencia hacia LH se debe a la presencia de LHR en las células de la granulosa del folículo dominante. A medida que el folículo crece, los LHR de las células de la teca aumentan y las células de la granulosa adquieren también LHR, lo cual sería importante para el crecimiento continuo del folículo seleccionado (Bao y col., 1997). Ginther y col. (2001) reportaron que los LHR emergen en las células de la granulosa de un folículo dominante 8 horas antes del comienzo de la desviación. Luego de la selección y la dominancia de un folículo, el reclutamiento de una nueva cohorte folicular se retrasa hasta que ocurre la pérdida de la dominancia o tiene lugar la ovulación.

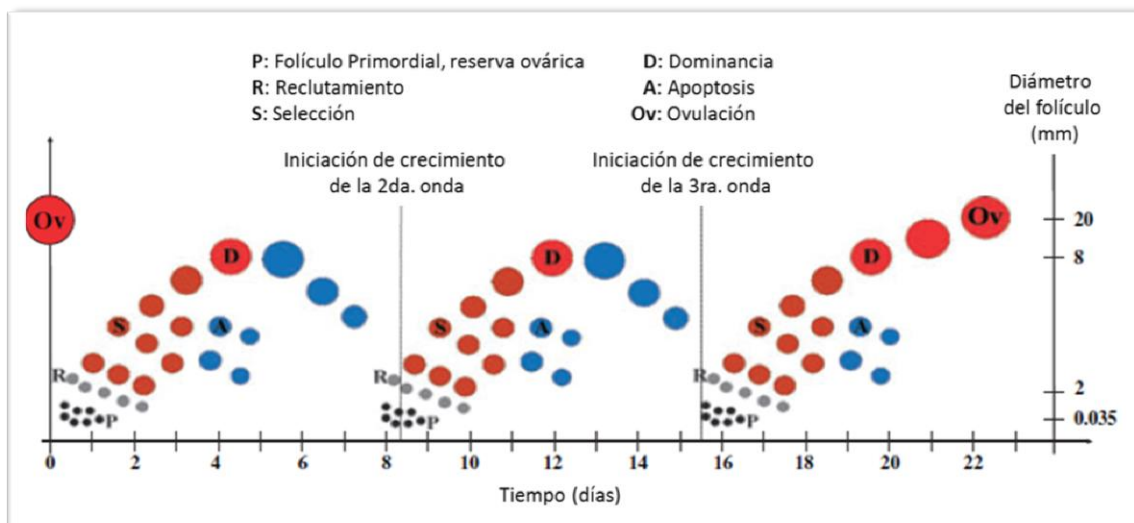


Figura 6: Fases de reclutamiento, selección y dominancia en un patrón de crecimiento de 3 ondas durante un ciclo estral bovino, en un modelo de 3 ondas. Adaptado de Aerts y Bols, 2010b.

1.1.5 Atresia Folicular

El desarrollo del folículo ovárico es un proceso regulado por varios factores endocrinos, paracrinos y autocrinos, que actúan coordinadamente para seleccionar folículos para la ovulación. La gran mayoría de los folículos (más del 99%) no alcanza la etapa preovulatoria (Matsuda y col., 2012) y sólo uno de los folículos que inician el desarrollo en una onda folicular llega hasta la etapa final de la ovulación, por lo que la mayor parte de ellos degenera, experimentando su regresión en diferentes momentos de su desarrollo. Esta regresión recibe el nombre de atresia folicular y puede ocurrir en cualquiera de las etapas del crecimiento folicular y se caracteriza por cambios degenerativos no inflamatorios que llevan a la pérdida del ovocito, de células de la granulosa y de receptores hormonales. Si bien la atresia es un evento que culmina con la muerte de las células involucradas, también se trata de un proceso celular activo en donde ocurren la reabsorción de los folículos como producto de la infiltración de macrófagos y la fagocitosis; la migración de fibroblastos tecales y la producción de colágeno (Rodgers y Irving-Rodgers, 2010).

El estradiol e IGF-1, factores secretados por las células de la granulosa, son esenciales para el crecimiento y desarrollo folicular. Si estos factores claves son deplecionados, las células de la granulosa no sólo pierden sus funciones sino también

sufren muerte celular. Se ha demostrado que en las células de la granulosa aisladas cultivadas, en medio libre de suero y en ausencia de factores de crecimiento, comienza la activación de los caminos de la apoptosis endógena dentro de dichas células y la consecuente atresia folicular (Matsuda y col., 2012). Morfológicamente, la apoptosis es inducida, en las etapas tempranas de la atresia, en las células de la granulosa localizadas en la superficie interna de la capa de la granulosa, pero no en las células del cúmulo o en las capas de la teca interna o externa (Inoue y col., 2011). La privación de factores claves promotores de la supervivencia, como son por ejemplo estradiol, IGF, FSH, factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), interleuquina 1 β (IL-1 β) e interleuquina 6 (IL-6) (Tilly y col., 1992; Chun y col., 1995; Hsu y Hsueh, 1997; Guthrie y col., 1998; Lynch y col., 2000; Mao y col., 2004; Maeda y col., 2007), o la estimulación por factores de muerte celular, como son por ejemplo el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y los ligandos Fas y FasL (Matsuda y col., 2006), son la principal causa de apoptosis de las células de la granulosa. En este sentido, se ha demostrado que los glucocorticoides pueden atenuar la apoptosis inducida por TNF α en las células de la granulosa luteinizadas humanas y de ratas, y por lo tanto pueden desempeñar funciones importantes en el proceso de cicatrización del tejido después de la ovulación, la ruptura folicular y la formación del CL (Sasson y col., 2002).

1.1.6 Ovulación y formación del cuerpo lúteo

Luego de la liberación cíclica de LH, tiene lugar la ovulación, en la cual el folículo se rompe, el ovocito es liberado y en consecuencia el folículo se colapsa y se retrae cuando la presión del líquido folicular se reduce. En el folículo preovulatorio, de 15-20 mm, minutos antes de la ovulación se forma *el estigma*, una pequeña zona donde se detiene la irrigación sanguínea y la túnica albugínea, la teca y la capa de la granulosa son más delgadas. En el momento de la ovulación, el estigma se rompe y el líquido folicular fluye junto con el ovocito y la corona radiada que lo rodea. La ruptura del estigma ocurre debido a la producción de un activador de plasminógeno por las células de la granulosa y de la teca, para activar la enzima degradante de proteínas plasmina, que también estimula la

producción de colagenasas. Ambas enzimas degradan la matriz de tejido conectivo hasta debilitarla. La estructura remanente se denomina cuerpo hemorrágico debido a que la sangre puede llenar el antro. Después de la ovulación, la capa de células de la granulosa se vasculariza por la invasión de los vasos sanguíneos desde la teca interna. Las células de la granulosa aumentan de tamaño después de la ovulación, se luteinizan y contribuyen a formar la población de células luteínicas del CL. En la mayoría de las especies, las células de la teca interna también contribuyen a la formación del CL. El aumento de tamaño del CL se debe principalmente a la hipertrofia de las células luteínicas. En bovinos, un pigmento amarillo, la luteína, aparece en las células luteínicas; el CL está totalmente desarrollado y vascularizado a los nueve días de la ovulación, pero continúa creciendo hasta el día 12, en el que alcanza, aproximadamente, un diámetro de 25mm. Las células luteínicas producen progesterona durante el final del metaestro y la mayor parte del diestro, siendo esta secreción muy notable en la última fase del diestro, poco antes de comenzar la regresión del CL. Estas células también producen estrógenos y relaxina. El primer signo de regresión del CL se produce al final del diestro y se caracteriza por la condensación del pigmento luteínico seguido por la fibrosis. La cicatriz de tejido conjuntivo que persiste después de la regresión luteal se denomina *corpus albicans* (Dellmann y col., 1993).

1.2 Efectos del estrés sobre la reproducción

Los procesos fisiológicos normales se mantienen gracias a un equilibrio dinámico y complejo denominado homeostasis, el cual constantemente es desafiado por los estresores. Estos factores actúan interna o externamente sobre el organismo induciendo un esfuerzo adicional para mantener un estado de equilibrio con su medio interno y también con el ambiente externo. Los estresores alteran la homeostasis, provocando una respuesta conocida como estrés (Charmandari y col., 2005; Möstl y Palme, 2002), caracterizada por la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Ante situaciones de estrés, el organismo de la mayoría de los mamíferos reacciona activando una serie de mecanismos fisiológicos y conductuales, y cuando dichos mecanismos resultan inadecuados (por prolongados o excesivos) se pueden presentar consecuencias negativas sobre otras funciones fisiológicas

importantes como por ejemplo la reproducción (Chrousos y col., 1998; Dobson y Smith, 2000; Dobson y col., 2001; Charmandari y col., 2005).

Para lograr que el pico de LH se produzca en el momento adecuado, una serie de eventos, ajustadamente controlados deben ocurrir en el hipotálamo y la hipófisis. Una vez removida la actividad inhibitoria de la progesterona durante la luteólisis, se incrementa la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH, para culminar con el pico peovulatorio de LH en respuesta al efecto de retroalimentación positiva del 17β -estradiol sobre el eje hipotálamo-hipofisario. Los estresores reducen la fertilidad por interferir con los mecanismos que regulan el cronograma de estos eventos dentro de la fase folicular del ciclo estral. Esto ocurre principalmente a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, donde se reducen los pulsos de GnRH y LH por acciones tanto en la hipófisis como en el hipotálamo, privando al ovario de adecuados niveles de LH (Jordan, 2003). Además, en respuesta a situaciones de estrés, la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) estimula la liberación de cortisol y progesterona. Esta última actúa inhibiendo la liberación de GnRH en el hipotálamo, mientras que el cortisol ejerce un efecto inhibitorio directo en el ovario sobre la secreción de estradiol y sobre el contenido de LHR. Consecuentemente falla el mecanismo de retroalimentación positiva de estrógenos, suprimiendo el pico preovulatorio de LH, bloqueando la ovulación, con la consiguiente persistencia del folículo dominante y el desarrollo de quistes foliculares (Kawate y col., 1993; Kawate y col., 2001). A esto deben sumarse acciones locales en la cascada de enzimas relacionadas al metabolismo de los glucocorticoides que también interferirían en la ovulación (Thurston y col., 2003a).

Dentro de los estresores, se ha demostrado que el transporte (un estresor agudo) produce un incremento en la presentación de ovulaciones silenciosas en ovejas, prolongando el ciclo estral y provocando alteraciones ováricas (Braden y Moule, 1964). Se ha comprobado que el transporte de 4 horas interrumpe el pico de LH durante la fase folicular en ovejas (Dobson y col., 1999) y en vacas (Nanda y col., 1990), al interferir con su secreción pulsátil y la producción folicular de estradiol.

En bovinos se ha encontrado una reducción en la tasa de gestaciones cuando la inseminación artificial y los muestreos sanguíneos se realizan en ambientes no familiares,

en contraste con lo observado después de un proceso de adaptación a dicho manejo (Dobson y Smith, 2000; Smith y col., 2003). En primates, la exposición a situaciones de estrés como el reagrupamiento de animales en las fases lútea y folicular tiene efectos negativos sobre la producción de progesterona por el CL y prolonga la fase folicular del siguiente ciclo (Xiao y col., 2002).

En algunas situaciones, como ocurre durante el estrés crónico debido a laminitis o fiebre, la frecuencia pulsátil de GnRH/LH puede ser más lenta, de modo tal que el desarrollo folicular comienza, pero no puede continuar a estadios avanzados donde se necesita la mayor frecuencia de liberación. De esta manera, el animal no es capaz de desarrollar ciclos estrales normales y se produce anestro. Esta situación ha sido descrita por nuestro grupo de trabajo en animales expuestos a luz permanentes durante más de 10 semanas (Palomar y col., 2007). En otros casos, la frecuencia del pulso de GnRH/LH puede ser suficiente para soportar el desarrollo folicular pero con alteraciones en la liberación de GnRH o la sensibilidad de la hipófisis al estradiol. De esta forma, se genera una liberación inadecuada de LH, incapaz de producir la ovulación y luteinización, ocasionando la persistencia folicular y el desarrollo de quistes foliculares (Dobson y Smith, 1995).

El tratamiento de bovinos con ACTH exógena, lo cual incrementa la secreción de cortisol endógeno, induce el desarrollo de quistes foliculares (Ribadu y col., 2000; Ortega y col., 2008), mientras que en cerdas durante el proestro prolonga la duración del ciclo y promueve la formación de quistes foliculares luteinizados (Lang y col., 2004). En vacas, estudios *in vitro* han confirmado que el cortisol afecta negativamente la función folicular, especialmente a nivel de las células de la teca, inhibiendo la producción de andrógenos (Spicer y Chamberlain, 1998). *In vitro*, el cortisol inhibe la secreción de estradiol por las células de la granulosa bovina y porcina, al tiempo que reduce el número de LHR (Kawate y col., 1993; Viveiros y Liptrap, 1999).

1.3 Mecanismos de respuesta al estrés

Generalmente, un estresor activa dos sistemas neuroendocrinos de protección, que son los encargados de mediar en forma bidireccional las adaptaciones de los organismos a situaciones potencialmente peligrosas.

Uno de ellos es el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en el cual el núcleo paraventricular del hipotálamo sintetiza y secreta hormona liberadora de corticotropina (CRH) y hormona antidiurética (ADH). Estos neuropéptidos son secretados dentro del sistema porta hipofisario para estimular la producción de péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC), ACTH, β -endorfinas y hormonas estimulantes de melanocitos (MSH), en la *pars distalis* de la adenohipófisis. La ACTH actúa sobre la corteza de las glándulas adrenales para estimular la síntesis y secreción de glucocorticoides (GC) (Engelmann y col., 2004; Xing y col., 2010), lo cual induce una retroalimentación negativa del sistema e inhibe la secreción de hormonas desde el hipotálamo y la hipófisis. Esto reduce la secreción de CRH y la ADH, y también reduce directamente la escisión de POMC en ACTH y β -endorfinas (Engelmann y col., 2004).

El segundo sistema es el simpático-adrenérgico: la estimulación de este sistema implica la activación de los núcleos del tronco cerebral, el nervio vago y la médula adrenal. La adrenalina y noradrenalina se producen en la médula adrenal a través de la estimulación simpática y los efectos locales del cortisol. Estas hormonas producen una retroalimentación positiva a nivel de la hipófisis e incrementan de esa manera la transformación de la POMC en ACTH y β -endorfinas (Engelmann y col., 2004).

La secreción de esteroides ováricos, la maduración folicular y la ciclicidad estral están reguladas por el sistema nervioso simpático en conjunto con el sistema endocrino. En este sentido, durante el estrés crónico (debido a la alta producción láctea, la sobrealimentación, etc.) ocurre la activación del sistema simpático, lo cual causa una exposición crónica de las vacas a bajas concentraciones de catecolaminas, con la consiguiente alteración de la actividad reproductiva (Sciorsci y col., 2000; D'Ottavio y col., 2002; Rizzo y col., 2011). Se ha demostrado que la inducción de quistes foliculares en ratas está precedida por una hiperactivación de las neuronas simpáticas que inervan al ovario y

que la sección del nervio ovárico superior recupera la ciclicidad estral y normaliza la respuesta a gonadotropinas (Lara y col., 1993, Barria y col., 1993). Además, la administración de un agonista β -adrenérgico es capaz de desarrollar enfermedad quística ovárica (COD) en ratas, efecto que es revertido al administrar el antagonista β -adrenérgico propranolol (Lara y col., 2002). En el ovario bovino, se ha descrito que la pared de los quistes foliculares presenta una mayor liberación basal de noradrenalina y que se observa una mayor concentración de ésta en el líquido folicular, lo que se relaciona con una mayor secreción de testosterona en estas estructuras ováricas (Paredes y col., 2007; Paredes y col., 2011).

1.3.1 Receptores de Melanocortinas (MCRs) y sus funciones

La ACTH y las hormonas estimulantes de melanocitos α , β y γ (α -, β - y γ - MSH) son hormonas derivadas del procesamiento post-traducciona l de la molécula precursora POMC (Catania y col., 2004). Estos productos, en conjunto, se llaman péptidos de melanocortinas o melanocortinas (Figura 7). La principal fuente de melanocortinas es la glándula pituitaria, pero el gen POMC además es expresado en algunas regiones del cerebro como así también en tejidos periféricos, particularmente la piel (Schiöt y Watanobe, 2002).

Las melanocortinas naturales y sintéticas actúan por unión a receptores específicos en la superficie celular denominados receptores de melanocortinas (MCRs) (Catania y col., 2004; Getting, 2006). En la actualidad se han caracterizado 5 receptores (MC1R-MC5R), los cuales pertenecen a la familia de receptores unidos a proteína G que median el señalamiento de los péptidos derivados de la POMC (ACTH y MSH), y se encuentran ampliamente distribuidos en una gran variedad de tejidos donde cumplen diferentes funciones (Getting, 2006).

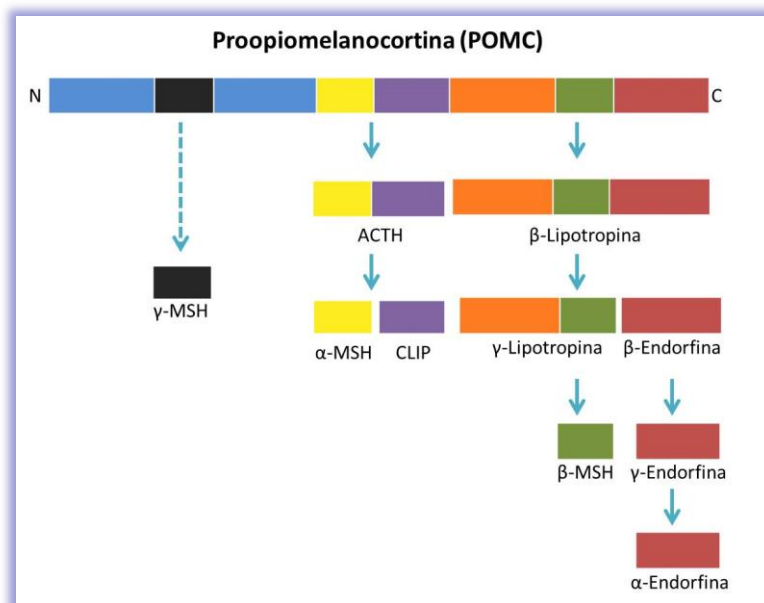


Figura 7: Procesamiento post-traduccional de la molécula precursora proopiomelanocortina (POMC). En la figura se muestran los sucesivos productos del clivaje de POMC. CLIP (del inglés: *corticotropin-like intermediate peptide*). Adaptado de King (1997).

El reconocimiento y el clonado de los MCRs permitieron comprender las interacciones entre las células blanco y los péptidos. Los MCRs han sido clonados y se denominan MC1R, MC2R, MC3R, MC4R y MC5R. Todos ellos median sus efectos principalmente por activación del camino de señalización dependiente del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Catania y col., 2004). La interacción entre las melanocortinas y la reproducción ha sido claramente establecida, en diferentes procesos relacionados con el metabolismo, el estrés, la inmunidad y los caminos de señalamiento neuroendocrinos (Hohmann y col., 2000; Schiöth y Watanobe, 2002). Varios de estos receptores han sido estudiados en bovinos (Liakos y col., 1998), siendo los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo los primeros documentados sobre la localización los MCRs en el ovario bovino (Amweg y col., 2011).

El MC1R se expresa en una gran variedad de tejidos y células, incluidos los melanocitos, folículos pilosos, monocitos humanos, neutrófilos, células endoteliales, fibroblastos, mastocitos, linfocitos y neuronas (Getting, 2006; Ramachandrapa y col., 2013). La α -MSH es el ligando más activo para MC1R, seguido por la ACTH (Abdel-Malek, 2001). Debido a su amplia distribución, el MC1R está implicado en un número de

funciones que incluyen la pigmentación y acciones antiinflamatorias y anti-piréticas. La proteína del MC1R ha sido localizada en el ovario de ratón (Labbe y col., 1994; Thörnwall y col., 1997).

El MC2R es específico para ACTH. Este receptor se expresa principalmente en la corteza adrenal donde media los efectos de ACTH sobre la secreción de esteroides (Beuschlein y col., 2001). Además, el MC2R se expresa en la piel (Slominski y col., 1996), en los adipocitos de ratón (Boston y Cone, 1996), y se ha demostrado que está implicado en la lipólisis en respuesta a ACTH (Boston, 1999; Cooray y Clark, 2011). Se ha demostrado la expresión de MC2R en ovarios de peces (Aluru y Vijayan, 2008; Alsop y col., 2009) y de ratón (Nimura y col., 2006).

El MC3R es activado por γ -MSH con una potencia similar a α -MSH, β -MSH y ACTH (Cooray y Clark, 2011). MC3R se expresa en el sistema nervioso central, en tejidos periféricos y en las células del sistema inmune. Es expresado en varias regiones del cerebro, principalmente en el hipotálamo (Klovins y col., 2004) y también en placenta, estómago y páncreas (Gantz y col., 1993a). Se ha postulado un rol potencial para MC3R en el metabolismo energético (Butler y col., 2000) como así también en la función cardiovascular (Guarini y col., 2002; Getting y col., 2004a) y en la modulación de la respuesta inflamatoria (Getting y col., 2004b).

El MC4R es expresado en algunas regiones del cerebro, como el hipotálamo y la corteza y médula espinal (Mountjoy y Wild, 1998; Klovins y col., 2004). La activación de este receptor ocurre mediante su unión a la ACTH o la α -MSH. El MC4R está implicado en la disfunción eréctil (Martin y Mac Intyre, 2004), en el dolor (Starowicz y Przewlocka, 2003) y en la regulación de la homeostasis energética (Huszar y col., 1997; Klovins y col., 2004).

MC5R es específico para ACTH y α -MSH (Hoogduijn y col., 2002). Se expresa en una gran variedad tejidos y células, incluidos el hígado, pulmón, timo, testículos, glándulas mamarias, células adiposas blancas y pardas, linfocitos, piel, músculo esquelético, glándulas lagrimales, glándulas sebáceas, estómago y duodeno (Catania y col., 2004). Se ha demostrado que MC5R cumple un rol en la regulación inmune (Taylor y Namba, 2001) y

ha sido identificado en ovarios humanos (Chhajlani, 1996) y en adrenales bovinas (Liakos y col., 2000).

1.3.1.1 MC2R y su interacción con ACTH

La unión de ACTH al MC2R da lugar a un incremento del AMPc y la activación de la protein-quinasa A, desencadenando la cascada de señalización interna que es esencial para la expresión de las enzimas esteroideogénicas y la producción de cortisol (Novoselova y col., 2013). El MC2R se expresa en todas las zonas de la corteza adrenal, pero la ACTH actúa principalmente en la zona *fasciculata* estimulando la secreción de cortisol (Mountjoy y col., 1992). La acción de la ACTH sobre las células de la zona *reticularis* estimula la producción de andrógenos adrenales (Weber y col., 1997). Se ha demostrado que el MC2R se localiza en el retículo endoplasmático (RE) y que una proteína accesoria, denominada proteína accesoria del MC2R (MRAP) es esencial para la conducción del MC2R a la superficie celular y su función (Metherell y col., 2005). Se ha postulado que MRAP forma un homodímero antiparalelo en el RE y que éste interactúa con MC2R, contribuyendo al correcto plegado del receptor. Luego de una modificación post-traducciona en RE y aparato de Golgi, la estructura heterotrimérica es conducida a la superficie celular, donde es capaz de reconocer y responder a ACTH (Webb y Clark, 2010). El tratamiento con ACTH de células adrenales humanas en cultivo confirmó que esta hormona es un potente activador que incrementa la capacidad de las células adrenales para producir hormonas esteroideas debido a un aumento de la expresión de las enzimas esteroideogénicas. Por otra parte el tratamiento de células adrenales con ACTH aumentó la expresión del MC2R y la MRAP, y la producción de cortisol por dichas células (Xing y col., 2010).

1.4 Mecanismo de acción de los glucocorticoides

Los GC endógenos, hormonas inducidas por estrés, son sintetizados bajo el control de eje HHA. En respuesta a una gran variedad de estresores, la CRH hipotalámica estimula la liberación de ACTH desde la hipófisis, y ésta induce la síntesis de GC en las células de la zona *fasciculada* de la corteza adrenal. Los GC son altamente lipofílicos y son

transportados en la sangre, unidos predominantemente a globulinas de unión a corticoesteroides. Los GC son capaces de atravesar la membrana plasmática e interactuar en el citoplasma con receptores citoplasmáticos específicos, transferirse al núcleo y mediar la transcripción de ciertos genes y la síntesis de proteínas específicas que afectan a la acción biológica de las hormonas adrenales.

Los GC ejercen diversas acciones básicamente como mediadores importantes en el metabolismo intermedio. Uno de los efectos específicos de estos esteroides es la estimulación de la gluconeogénesis hepática. El resultado final es un aumento del glucógeno hepático y una tendencia a la elevación de la glucemia. El efecto directo de los GC en el tejido adiposo es incrementar la tasa de lipólisis y redistribuir la grasa en el hígado y en el abdomen. Asimismo, estas hormonas inhiben la síntesis de proteínas, favoreciendo el catabolismo proteico, con la consiguiente liberación de aminoácidos. Este proceso apoya la gluconeogénesis hepática. Los GC también tienen importantes efectos clínicos, principalmente la inhibición de la respuesta inflamatoria. Una de las vías por las que estas hormonas llevan a cabo esta inhibición es mediante la supresión de la formación de sustancias que promueven la inflamación, como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Cunningham, 2003).

Los GC son agentes antiinflamatorios que actúan para modular la producción y acción de las citoquinas y prostaglandinas necesarias para la ovulación, luteólisis, implantación embrionaria, crecimiento fetal y desarrollo de la placenta (Duong y col., 2012).

1.4.1 Acción de los GC a nivel ovárico

Las funciones de los GC en el ovario se han descrito en varias especies, e incluyen tanto efectos estimulantes como inhibitorios sobre las funciones ováricas (Tetsuka y col., 2010). Los GC actúan directamente sobre las células ováricas inhibiendo la acción de las gonadotropinas y la síntesis de esteroides (Michael y col., 2003; Acosta y col., 2005; Sunak y col., 2007). Se ha demostrado en estudios *in vitro* que la acción de cortisol sobre las células de la granulosa bovina aumenta la producción de oxitocina (Luck y Junglas,

1988) y la síntesis de progesterona (Kawate y col., 1993) mientras que estímulos con FSH incrementan la producción de andrógenos en cultivos de células de la teca (Kawate y col., 1993; Spicer y Chamberlain, 1998). Además, se ha demostrado que los corticoides suprimen la actividad de la CYP19A1 y disminuyen el número de LHR en ratas (Hsueh y Erickson, 1978; Schoonmker y Erickson, 1983), vacas (Kawate y col., 1993) y cerdas (Danisová y col., 1987). En el ovario humano, el cortisol aumenta su concentración en el líquido folicular luego del pico preovulatorio de LH en los folículos ovulatorios (Hillier y Tetsuka, 1998). Como la ovulación es un evento inflamatorio caracterizado por un incremento en la síntesis de citoquinas y prostaglandinas, el aumento de los GC antiinflamatorios alrededor del periodo ovulatorio puede representar un mecanismo fisiológico para limitar el daño causado por la ovulación. En este sentido, el entorno de GC en la pared folicular se ajusta a nivel local en los folículos ovulatorios bovinos. Este mecanismo de defensa puede proteger a los folículos de los efectos adversos de los GC, previniendo el exceso de reacciones inflamatorias asociadas con la ovulación por un incremento temporal de las concentraciones locales de los GC, constituyendo de esta manera una parte integral del mecanismo regulatorio de la fisiología ovárica (Acosta y col., 2005).

1.4.2 Enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 β HSD)

Los GC no son producidos *per se* en el ovario, y las acciones de los GC son reguladas a nivel ovárico por la expresión relativa de dos enzimas 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas (11 β HSD): una 11 β HSD tipo 1 (11 β HSD1) bi-direccional que principalmente activa los GC transformando la cortisona en cortisol en bovinos y humanos, y la 11 dihidrocorticosterona en corticosterona en roedores; y una 11 β HSD tipo 2 (11 β HSD2) que inactiva el cortisol transformándolo en cortisona (Krozowski y col., 1999).

Las enzimas 11 β HSD1 y 11 β HSD2 son productos de distintos genes (Michael y col., 2003), y las dos isoformas han sido clonadas. Aunque ambas tienen sitios activos similares, con una triada catalítica que comprende tirosina, serina y lisina (Pennig, 1997), la 11 β HSD1 actúa como un dímero o tetrámero mientras que la 11 β HSD2 parece ser sólo

activa en su forma monomérica. 11β HSD2 tiene un requerimiento absoluto de la forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) como un cofactor enzimático, mientras que 11β HSD1 utiliza preferentemente nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$).

11β HSD1 fue aislada originalmente de hígado (Lakshmi y Moender, 1988), donde actúa como una reductasa dependiente de NADPH para generar GC activos a partir de 11-cetoesteroides inertes (Figura 8). Luego del clonado de 11β HSD1 (Agarwal y col., 1989; Tannin y col., 1991), esta isoforma mostró estar ampliamente expresada, colocalizada con receptores de GC (Whorwood y col., 1992; Seckl y Walker, 2001). Sobre las bases de este patrón de expresión, se acepta que el rol principal de 11β HSD1 es generar cortisol o corticosterona para la activación máxima de los receptores de glucocorticoides (GR) (Seckl y Walker, 2001). Sin embargo, mientras que 11β HSD1 actúa predominantemente como una reductasa en células intactas, esta enzima es inherentemente bidireccional; en células provistas con NADP^+ , 11β HSD1 puede inactivar GC, aunque con baja afinidad (Lakshmi y Monder, 1988; Agarwal y col., 1989). Así, la dirección predominante de la reacción catalizada por 11β HSD1 depende del estado redox de NADPH en una célula en particular. En células del hígado, con un abundante abastecimiento de glucosa y una vía pentosa fosfato activa, más NADP^+ estaría en forma reducida, favoreciendo la actividad reductasa cetoesteroide NADPH dependiente de 11β HSD1. Sin embargo en las células esteroideogénicas de los testículos, ovarios y placenta, la actividad de las enzimas citocromo P450 NADPH dependientes, requeridas para la síntesis de esteroides, favorecen la oxidación de NADPH a NADP^+ , promoviendo la actividad oxidativa de 11β HSD1 (Michael y col., 2003).

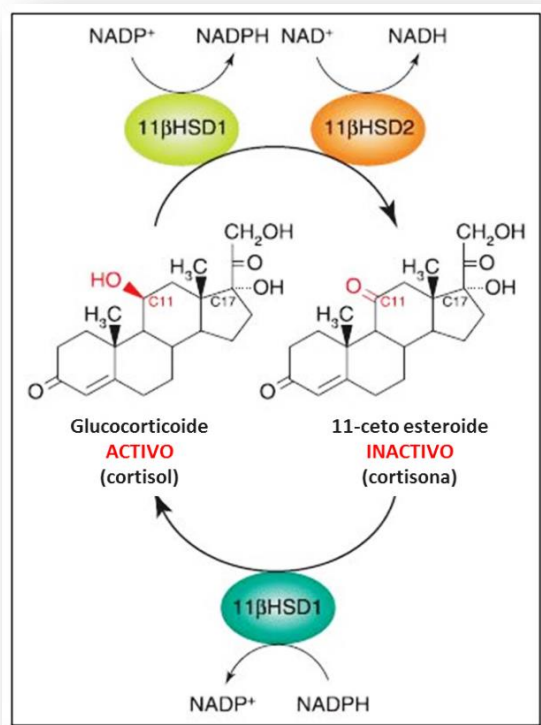


Figura 8: Interconversión de cortisol y cortisona por la oxidación o reducción enzimática en el carbono 11 (C11), catalizada por las isoformas de 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11βHSD). Adaptado de Michael y col., 2003.

1.4.2.1 Expresión de las isoformas 11βHSD en ovario

Las isoformas de la enzima 11βHSD han sido estudiadas en las diferentes estructuras ováricas de varias especies. En el ovario de la mujer, la 11βHSD2 ha sido localizada en las células de la teca, presentando baja actividad en los folículos inmaduros; la expresión de esta enzima es altamente dependiente del fenotipo funcional y la diferenciación de las células (Ricketts y col., 1998; Yong y col., 2000).

En mujeres y ratas, las células de la granulosa de los folículos preovulatorios expresan exclusivamente 11βHSD2 con un cambio en la ovulación hacia la expresión de 11βHSD1 en las células de la granulosa luteinizadas y el CL (Michael y col., 1997; Tetsuka y col., 1997; Tetsuka y col., 1999a; Thurston y col., 2003c). Además, la única isoforma detectada en el CL de la rata es la 11βHSD1 (Michael y col., 2003). Esta transición desde la expresión de 11βHSD2 en las células foliculares de la granulosa hacia la expresión de 11βHSD1 en las células granulosas luteinizadas es acompañada por un cambio en la expresión del receptor de mineralcorticoides (MR) en los folículos hacia la expresión del

GR en las células luteinizadas, lo cual puede proteger la maduración de los folículos de los efectos supresores de los GC (Tetsuka y col., 1999a, 2003). A estas investigaciones debe sumarse el hecho que ambas isoformas de 11 β HSD se co-expresan en células de la granulosa y CL del ovario bovino (Thuston y col., 2007).

Se han determinado las bases moleculares de la transición de 11 β HSD2 a 11 β HSD1 durante la luteinización, concluyendo que la sobreexpresión de 11 β HSD1 en el momento de la ovulación es inducida por las gonadotropinas (Michael y col., 2003). Como la ovulación es un evento inflamatorio, caracterizado por un incremento en la síntesis de interleuquinas y prostaglandinas (Ando y col., 1998), la generación incrementada de GC antiinflamatorios por la actividad reductasa de 11 β HSD1 en el momento de la ovulación, podría representar un mecanismo fisiológico para limitar el proceso inflamatorio en el ovario (Hillier y Tetsuka, 1998; Andersen, 2002). En este sentido, se ha demostrado que los GC inhiben la síntesis de prostaglandinas y citoquinas pro-inflamatorias en el ovario (Tellería y col., 1998). Debido a que la expresión de 11 β HSD1 es estimulada en las células de la granulosa por la LH y por citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 β (Evangelatou y col., 1997; Tetsuka y col., 1999b), la síntesis de GC vía 11 β HSD1 podría ser incrementada por las gonadotropinas y/o citoquinas, como un aspecto integral de la cascada de la ovulación. Consistente con esta hipótesis, la concentración de cortisol total y libre en el líquido folicular humano se incrementa en respuesta al pico preovulatorio de LH (Yong y col., 2000; Michael y col., 2003). El incremento en el cortisol libre también involucra el desplazamiento competitivo del cortisol desde las globulinas por la alta concentración de progesterona dentro del folículo preovulatorio (Andersen y Hornes, 1994; Andersen, 2002).

Si bien es aceptando el rol de la LH y las interleuquinas en la transición de la expresión de 11 β HSD2 hacia 11 β HSD1 en la ovulación, este cambio preovulatorio en las isoformas durante la luteinización podría también involucrar la regulación de su expresión a través de las hormonas esteroides. Específicamente, la expresión de 11 β HSD2 en la granulosa podría ser dependiente de la síntesis local de estrógenos, mientras que la progesterona podría suprimir la expresión de 11 β HSD2 o inducir la expresión de 11 β HSD1

en células luteinizadas, existiendo sólidas evidencias a favor de esta teoría (Waddell y col., 1996).

En trabajos realizados en bovinos, Tetsuka y col., (2010) demostraron que los folículos maduros de ovarios bovinos expresan ARNm codificante para 11 β HSD1 y 11 β HSD2. La expresión de 11 β HSD1 aumenta durante la maduración folicular en células de la granulosa y de la teca interna, mientras que la expresión de 11 β HSD2 es muy baja en células de la granulosa y no se modifica en las células de la teca interna, indicando que 11 β HSD1 es la isoforma predominante en folículos bovinos maduros. Por otro lado, FSH parece ser responsable de la sobre regulación de la expresión génica de 11 β HSD1 en células de la granulosa bovinas, como ha sido demostrado *in vitro* en células de la granulosa de rata y humano (Yong y col., 2000; Tetsuka y col., 1999a). La expresión de 11HSD2 no es afectada por FSH, concluyendo que el metabolismo alterado de los GC, asociada con la maduración folicular, está primariamente regulada por 11 β HSD1 en respuesta a FSH en células de la granulosa bovinas (Tetsuka y col., 2010). Además, Tetsuka y col. (2003) demostraron que en el CL bovino se co-expresaron ambos isotipos, siendo predominante el ARNm para 11 β HSD1 en CL activos y el ARNm para 11 β HSD2 en CL en regresión. Los datos obtenidos en quistes foliculares bovinos indicarían que existen moduladores de la acción de las enzimas no muy bien caracterizados hasta este momento (Thurston y col., 2003a).

1.4.3. Receptor de glucocorticoides (GR)

Como se mencionó anteriormente, los GC, hormonas esteroides secretadas por la corteza adrenal, actúan como reguladores en una gran variedad de procesos biológicos como el desarrollo y la diferenciación, y desempeñan un papel fundamental en la fisiología normal y la respuesta al estrés. Los GC realizan sus acciones biológicas a través de la unión a un receptor citoplasmático específico: GR (NR3C1) de la familia de los receptores nucleares. La disponibilidad de los GC para sus receptores en los tejidos periféricos, está regulada por las enzimas 11 β HSD (Divari y col., 2011; Doung y col., 2012).

El GR pertenece a una superfamilia de receptores de hormonas esteroides que, además, incluye al MR y a los receptores de la hormona tiroidea, de hormonas sexuales, de ácido retinoico y de vitamina D. Todos estos receptores tienen en común el dominio de unión al ADN, que es una zona central corta, flanqueada por un dominio o extremo N terminal (o amino terminal) variable y un extremo C-terminal (o carboxilo terminal) relativamente variable (Figura 9). El dominio N-terminal contiene la región AF-1 (o independiente de la hormona), que se ha relacionado con la actividad transcripcional y la unión con proteínas coactivadoras y factores transcripcionales. Por otro lado, el extremo C-terminal contiene la región AF-2, que es responsable de la unión a la hormona (Cosío y col., 2005).

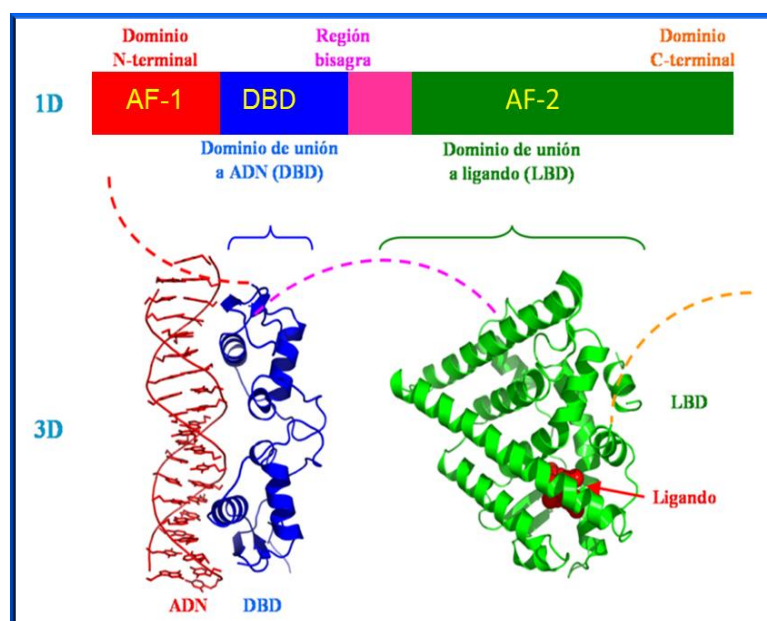


Figura 9: Estructura funcional del receptor de glucocorticoides (GR). La proteína del GR tiene 3 dominios: el amino terminal, el de unión al ADN (DBD, de DNA binding domain) y el carboxilo terminal para unión a la hormona. También se muestran las zonas de unión independiente del ligando (AF-1) y dependiente del ligando (AF-2) relacionadas con las funciones de activación transcripcional (www.fotosimagenes.org).

El GR contiene nueve exones: el primero y el último están sujetos a *splicing* alternativo, lo que da lugar a diferentes variantes o isoformas. Las isoformas GR α y GR β son idénticas desde el dominio amino terminal al aminoácido 727, a partir de aquí la

isoforma GR α tiene 50 aminoácidos adicionales y la isoforma GR β tiene una secuencia adicional no homóloga de 15 aminoácidos (Figura 10). El GR α es la isoforma predominante y la única que tiene capacidad para unirse a los GC y, por lo tanto, para realizar funciones de activación o represión. La diferencia de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal entre las dos isoformas podría ser la causa de porque el GR β es incapaz de unirse a los GC (Cosío y col., 2005; Lu y Cidlowski, 2006).

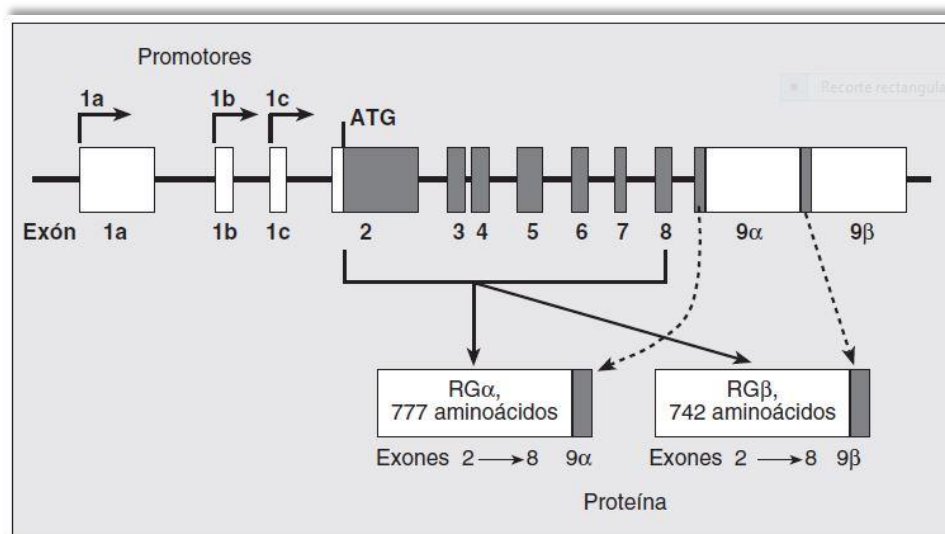


Figura 10: Organización genómica del gen del receptor de glucocorticoides (GR) y las diferentes isoformas que genera. Las secuencias de los exones que se traducen se muestran como áreas oscuras, mientras que los extremos 5' y 3' no traducidos de los exones 1 y 9 se muestran como zonas más claras. Los intrones se representan como líneas. (Cosío y col., 2005).

1.4.3.1. Mecanismo de acción del GR

El GR inactivo está unido en el citoplasma, a través del extremo C-terminal, a un complejo oligomérico con algunas proteínas como las 2 subunidades de proteínas de shock térmico o HSP90, la inmunofilina p59 y la fosfoproteína p23. La interacción entre el GR y las HSP90 es importante para mantener oculta la señal de localización nuclear necesaria en la posterior migración nuclear del GR activado, así como para conservar la configuración del dominio C-terminal para la unión al ligando. Además, las HSP90 y otras proteínas asociadas al receptor son necesarias, probablemente, para la correcta maduración de los GR recién sintetizados (Smith y Toft, 1993).

Una vez sintetizados y secretados, los GC son transportados hasta la superficie celular unidos a las globulinas fijadoras de GC (GFG). A continuación, los GC son liberados de la unión a las GFG y atraviesan la membrana plasmática. Cuando la hormona se une al GR, éste se libera de sus interacciones con las HSP90 y esto induce un cambio en la conformación del receptor que tiene como resultado la activación del mismo, lo que permite su translocación al núcleo, donde se une al ADN a través de su dominio central en forma de dímeros (Figura 11). Sin embargo, existen evidencias de que también se producen fenómenos de transporte citoplasmático-nuclear del GR no unido a hormona a través de la señal de localización nuclear (Reichardt y col., 2001).

Los lugares de unión al ADN son secuencias palindrómicas de 15 pares de bases que se denominan “elementos de respuesta a los GC” (ERG; GGTACAnnnTGTTCT) y están situados en la región 5’ promotora de los genes diana. La interacción de los dímeros de GC-GR con la doble hélice de ADN en estas regiones ERG, junto con determinados coactivadores, da lugar a la inducción o represión de la transcripción génica (transactivación). La interacción de un homodímero de GR activado con un ERG normalmente da lugar a un incremento de la transcripción, que provoca una mayor síntesis proteica. Sin embargo, aún no está completamente demostrado cómo puede variar parte de este proceso en función de la dosis o tipo de GC o del tipo de célula blanco en el que esté actuando. Además existen evidencias de que el complejo GC-GR es capaz de actuar también regulando genes indirectamente a través de la síntesis de proteínas antiinflamatorias o, lo que es más importante, por mecanismos de represión. Por ejemplo, la inhibición directa de factores transcripcionales pro-inflamatorios como el factor nuclear kappa B (NK- κ B) o la proteína activadora 1 (AP-1), o la reducción de la estabilidad de enzimas relacionadas con la proliferación celular y la expresión génica que tiene lugar en el proceso inflamatorio como la de las proteinquinasas activadas por mitógenos (MAPK), como así también participando en el reclutamiento y actividad de las enzimas histona acetiltransferasa e histona deacetiltransferasa, responsables de la configuración de la cromatina (Cosío y col., 2005).

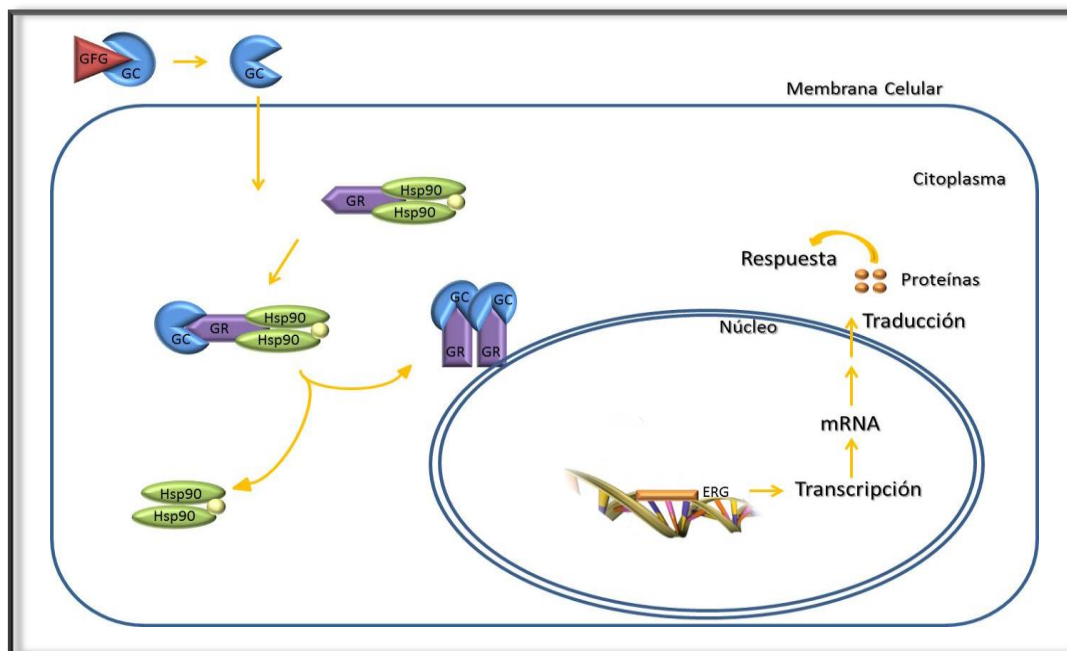


Figura 11: Mecanismo de acción del receptor de glucocorticoides (GR): en la sangre, los glucocorticoides (GC) se encuentran ligados a las globulinas fijadoras de glucocorticoides (GFG). En el citoplasma celular se une a su receptor específico (GR), se produce la dimerización y translocación al núcleo donde ejercen su acción sobre el ADN. Allí se une a secuencias específicas de bases, denominadas elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG) y de esta manera, actúa sobre el gen promotor, e induce la síntesis de ARN mensajero. Éste sale al citoplasma y es traducido en los ribosomas, para formar proteínas que son secretadas o permanecen dentro de la misma célula (Adaptado de Gómez Ordóñez y col., 2007).

1.4.3.2. El GR en la reproducción

Las células luteales en la mujer, bovino y rata son sitios potenciales para la acción y el metabolismo de los GC debido a que expresan GR nucleares (Myers y col., 2007; Komiyama y col., 2008; Tetsuka y col., 1999a). Los GR se expresan conjuntamente con ambas isoformas de la enzima 11β HSD en el CL (Tetsuka y col., 2003; Komiyama y col., 2008) y en el endometrio bovino (Lee y col., 2007) a través del ciclo estral y la preñez temprana (Majewska y col., 2012; Duong y col., 2012). En este sentido, se ha demostrado que los ARNm del GR y las enzimas 11β HSD tienen una mayor expresión en el endometrio de vacas preñadas que en tejidos obtenidos de animales ciclando (Majewska y col., 2012). Estos y otros resultados (Simmons y col., 2010) demuestran que el metabolismo del cortisol

y la expresión de los GR pueden ser diferentes dependiendo del estado fisiológico del útero y de la influencia de factores relacionados a la preñez.

En bovinos, Tetsuka y col., (2010) demostraron que el GR se expresa en todos los estadios del crecimiento y dominancia folicular, como así también en folículos atrésicos tempranos y tardíos, observándose una expresión aumentada del ARNm de las 11 β HSD y del GR en los folículos atrésicos. Sin embargo, ni la maduración folicular ni el estímulo hormonal parecen afectar la expresión del ARNm del GR, lo que sugiere que la regulación transcripcional del GR no es parte del mecanismo regulatorio de GC ováricos en bovinos.

1.5 Enfermedad Quística Ovárica (del inglés Cystic Ovarian Disease: COD)

La Enfermedad Quística Ovárica (COD) es una importante disfunción ovárica y una de las mayores causas de problemas reproductivos en el ganado lechero. Los quistes se desarrollan cuando ocurre una falla en la ovulación y los folículos aumentan de tamaño, más allá del diámetro ovulatorio y persisten en el ovario interrumpiendo los ciclos estrales normales (Vanholder y col., 2006, Rizzo y col., 2011). La patogénesis y la formación de los quistes aún no están totalmente dilucidadas. La mayor dificultad en cuanto a su investigación es que la incipiente formación del quiste sólo puede ser reconocida retrospectivamente luego de que el folículo ha desarrollado extensos cambios patológicos. Si bien los quistes foliculares son comunes en el periodo postparto en vacas lecheras, pueden también presentarse en animales destinados a la producción de carne (Youngquist, 1986; Lopez-Diaz y Bosu 1992; Garverick, 1997; Peter, 1997). Se ha descripto que en diferentes tipos de rodeos, pueden afectar hasta un 15% de las vacas durante el periodo postparto, prolongando los intervalos parto-primer celo y parto-concepción (Silvia y col., 2005), y por lo tanto, causando pérdidas significativas a la producción pecuaria. Además, los quistes, a veces, son acompañados por la expresión de conducta sexual receptiva (estro), resultando en costos adicionales por las infructuosas inseminaciones artificiales (Webb y col., 1998). La incidencia de los quistes foliculares en el ganado lechero puede variar entre 6 y 23% (Garverick, 1997; Silvia y col., 2002; Nelson y col., 2010), este porcentaje puede ser mayor debido al hecho de que el 60% de las vacas que desarrollan COD antes de la

primera ovulación postparto se recupera espontáneamente y puede pasar desapercibida (Peter, 2004). Además, cada evento de la enfermedad agrega entre 22 y 64 días a este intervalo (Lee y col., 1988; Borsberry y Dobson, 1989), lo que genera una pérdida económica estimada en US\$137 por lactancia (Johnston y col., 1997; Silvia y col., 2002).

Los signos clínicos que acompañan la presencia de quistes ováricos son: anestro, ciclos estrales irregulares y manifestaciones de ninfomanía (Vanholder y col., 2006).

1.5.1 Definición

La COD se caracteriza por la presencia de estructuras foliculares de un diámetro mayor al ovulatorio, que permanecen en el tiempo ocasionando trastornos en la funcionalidad ovárica. Los quistes son estructuras dinámicas, descritos como folículos anovulatorios únicos o múltiples, localizados en uno o ambos ovarios, que tienen un diámetro mayor a 18 mm, con una persistencia de más de 6 días, en ausencia de tejido luteal, sin tonicidad uterina y con interrupción de los ciclos estrales normales (Bartolomé y col., 2005). Sin embargo, esta definición clásica debe ser complementada con el concepto de que los quistes pueden regresar y ser reemplazados por otros; pueden atresarse o luteinizarse e inclusive puede producirse la ovulación en presencia de estas estructuras por lo cual se establece que esta es una enfermedad altamente dinámica (Hamilton y col, 1995; Rutter y Russo, 2000; Silvia y col., 2002; Bartolomé y col., 2005).

1.5.2 Factores predisponentes en la formación de quistes

Existen muchos factores que contribuyen con el desarrollo de quistes ováricos bovinos. Estos pueden clasificarse en factores generales y factores específicos.

1.5.2.1 Factores Generales

La herencia aparece como uno de los factores menos relevantes. Se ha visto que la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en algunas líneas de sangre de ganado. Es posible que en razas con una mayor predisposición genética a COD, la selección para

aumentar la producción láctea pueda incrementar la incidencia a COD (Hooijer y col. 2001; Peter, 2004).

La alta producción láctea se correlaciona positivamente con el desarrollo de quistes, ya que la nutrición y la producción de leche están estrechamente relacionadas. La COD se observa comúnmente en vacas de alta producción láctea durante la lactancia temprana.

La intensificación de la producción agropecuaria es un camino sin retorno, ya que la demanda mundial de alimentos y biocombustibles deja un margen cada vez menor para la ganadería extensiva tradicional debido a la incorporación de nuevas tierras a la actividad agrícola. Como consecuencia de este fenómeno es que se ha establecido un sistema semiestabulado de los animales. En este sentido, la falta de ejercicio puede considerarse como un factor que contribuye a la formación de quistes.

La tasa de quistes ováricos aumenta con la edad y tiene una distribución variable según la estación del año (Kesler y col., 1980; Garverick, 1997). Estudios realizados en países fríos como Suecia y Noruega, han mostrado una mayor ocurrencia de COD en los partos ocurridos en otoño, los cuales se corresponden con el periodo de servicio durante el invierno en establos. En regiones tropicales o cálidas, en contraste, se han reportado mayor número de casos de animales con COD durante el verano (Nelson y col., 2010). Si bien no se ha demostrado que el fotoperiodo se relacione con el desarrollo de COD, podría actuar como un factor predisponente, dado los antecedentes en otras especies (Salvetti y col., 2004; Palomar y col., 2007). La mayor frecuencia de la enfermedad en el puerperio es una expresión evidente de la disfunción endocrina característica de esta fase delicada de la vida reproductiva en la hembra bovina.

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

1.5.2.2 Factores específicos

Alimentación: Las raciones ricas en proteínas utilizadas para elevar la producción de leche, asociadas a la falta de ejercicio, podrían ser factores importantes en el desarrollo de la enfermedad. La COD es muy común en hembras de alta producción y durante la lactancia temprana. En este periodo la mayor parte de la energía se deriva a la producción de leche, además de los requerimientos básicos de mantención, dejando al animal vulnerable a perturbaciones endócrinas y metabólicas. El rol de los fitoestrógenos aún no ha sido establecido, sin embargo, muchos investigadores han sugerido que el forraje con alto contenido de componentes estrogénicos podría estar asociado al desarrollo de COD (Roberts, 1986).

Infecciones uterinas: durante el periodo postparto, las hembras bovinas son susceptibles a diversos procesos patológicos, incluyendo la retención de placenta, endometritis, metritis, hipocalcemia, y anestro postparto (Nelson y col., 2010). Se sugiere que las infecciones uterinas postparto pueden estimular la secreción de PGF2 α y de cortisol lo que predispone a las vacas al desarrollo de COD. Además, las endotoxinas bacterianas liberadas en el útero pueden estimular dicha secreción, suprimiendo de esta manera la liberación preovulatoria de LH (Bosu y Peter, 1987). El mecanismo a través del cual ocurre esta modulación es desconocido (Peter y col., 1991; Suzuki y col., 2001), sin embargo las endotoxinas, conjuntamente con sus mediadores las interleuquinas, son responsables de la mayoría de los efectos patógenos. Por otra parte, las interleuquinas son capaces de inducir la liberación de CRH del hipotálamo y consecuentemente la ACTH de la hipófisis, lo cual estimula a la glándula adrenal a incrementar la producción de corticoesteroides, e inhibir la formación de LHR en células de la granulosa. Todas estas acciones resultan en un aumento del cortisol, y la supresión del pico preovulatorio de LH. De esta manera, se produce un disturbio de las interacciones hormonales que controlan el funcionamiento normal del ovario (Battaglia y col., 2000; Williams y col., 2001; Peter, 2004).

Estrés: Los estresores reducen la fertilidad por interferir con los mecanismos que regulan el cronograma de eventos dentro de la fase folicular del ciclo estral. El rol del estrés en la patogénesis de la COD es mediado por los niveles de cortisol liberados de manera

endógena que ejercen su acción inhibitoria sobre la liberación de LH. La capacidad de las corticotropinas de inducir la enfermedad ha sido demostrada experimentalmente por la administración de ACTH en vacas (Peter y Liptrap, 1985; Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000; Ortega y col., 2007b) y en cerdas (Liptrap y McNally, 1976; Peter, 2004). Los GC son factores claves que afectan al eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, y otras hormonas como la ACTH y la CRH juegan solamente un papel secundario (Moberg, 1991). Se cree que los péptidos opioides endógenos (producidos por la hipófisis y el cerebro) bloquean la onda preovulatoria de LH inducida por los estrógenos y la liberación de GnRH (Malven, 1986). La inhibición de la secreción de la LH hipofisaria, consecuencia de la acción fisiológica de los GC, podría ser causada por la modificación en la retroalimentación de los esteroides gonadales, dado que los corticoides reducen el efecto estimulante de los estrógenos sobre la secreción de la LH.

1.5.3 Etiología y Patogenia

La patogenia de la COD corresponde a un trastorno plurifuncional de la ovulación, que tiene una etiología multifactorial con factores hereditarios, clínicos y ambientales (estrés, manejo nutricional, enfermedades infecciosas, y manejo en general), que son los responsables del proceso de la enfermedad (Liptrap y McNally, 1976; Kesler y Garverick, 1982; Bosu y Peter, 1987; Lopez-Diaz y Bosu, 1992; Eyestone y Ax, 1984; Woolums y Peter, 1994b; Garverick, 1997; Peter, 1997; Zulu y Penny, 1998; Peter, 2000; Ribadu y col., 2000). Independientemente de la causa, falla la ovulación del folículo dominante que se convierte en una estructura quística anovulatoria. Debido a la gran cantidad de factores involucrados en la formación de los quistes ováricos, la causa primaria de la enfermedad no ha sido establecida claramente aún (Silvia y col., 2005; Vanholder y col., 2006). Uno de los motivos que dificulta esto es que en el momento en que se hace el diagnóstico clínico no se conocen los procesos que condujeron a su formación y futura regresión-recambio de los quistes.

1.5.3.1 Disfunción hipotálamo-hipofisaria

La hipótesis más aceptada en cuanto a la formación de los quistes incluye la teoría de una disfunción neuroendocrina del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Liptrap y McNally, 1976; Kesler y Garverick, 1982; Eyestone y Ax, 1984; Bosu y Peter, 1987; López-Díaz y Bosu, 1992; Hamilton y col., 1995; Garverick, 1997; Zulu y Penny, 1998; Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000; Peter, 2004). De acuerdo con esta hipótesis, la causa primaria es que la liberación de LH desde el eje hipotálamo-hipofisis está alterada: el pico preovulatorio de LH no se produce, es insuficiente en magnitud u ocurre pero en un momento equivocado de la maduración del folículo dominante, lo cual conduce a la formación del quiste (Vanholder y col., 2006). Los folículos preovulatorios secretan estrógenos que causan una retroalimentación positiva sobre el eje hipotálamo-hipofisario para liberar LH responsable de la ovulación. Una alteración en este proceso resulta en una falla o en una inadecuada liberación de GnRH desde el hipotálamo. La respuesta hipofisaria para este evento es una liberación inadecuada o excesiva de LH y/o en un momento inapropiado. El rol exacto de la LH en el proceso de la enfermedad no está claramente comprendido aún. Se ha sugerido que una reducción en los pulsos de LH podrían relacionarse con la anovulación (Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000). En este sentido, si el pico de GnRH/LH ocurre prematuramente durante el crecimiento folicular, por ejemplo cuando está presente un folículo no ovulatorio, puede ocasionar la pérdida de sensibilidad del hipotálamo al efecto de retroalimentación positiva del estradiol, llevando de esta manera a la anovulación y consecuente formación de quistes (Gümen y col., 2002; Gümen y Wiltbank, 2002). La restitución de la sensibilidad del hipotálamo sólo es posible con una nueva exposición a progesterona (Gümen y Wiltbank, 2005; Ozturk y col., 1998). Esta falta de respuesta del hipotálamo a los estrógenos, parece estar presente en la mayoría de las vacas con COD, y ha sido demostrada mediante el suministro de estradiol exógeno que no pudo inducir el pulso de LH (Dobson y Nanda, 1992; Refsal y col, 1987; Refsal y col., 1988). La remoción del ovario quístico por ovariectomía, permitió restaurar el mecanismo de retroalimentación y la capacidad del estradiol de generar la nueva oleada gonadotrópica (De Silva y Reeves, 1988), por lo que dicha insensibilidad puede ser

considerada una consecuencia más que una causa de COD. La misma podría deberse a cambios en la expresión de receptores hormonales esteroideos (de estrógenos, progesterona y andrógenos) y proteicas (LHR y FSHR) a nivel hipotálamo-hipofisario (Odore y col., 1999).

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

1.5.3.2 Disfunción ovárica/folicular

Numerosos estudios se han llevado a cabo para caracterizar la dinámica del crecimiento y desarrollo folicular, sin embargo la comprensión de los cambios celulares y moleculares que ocurren dentro del folículo ovárico previo al proceso de anovulación es aún escasa (Wiltbank y col., 2002).

Los cambios celulares pueden darse por una producción aberrante de factores de crecimiento por las células de la granulosa (Ortega y col., 2008; Rey y col., 2010; Rodríguez y col., 2013) con alteraciones en la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular (MEC) (Salvetti y col., 2004; Ortega y col., 2007a). Las variaciones en la expresión y en el número de receptores de hormonas hipotálamo-hipofisarias así como de hormonas esteroideos parecen estar implicados en la anovulación de un folículo dominante. Las alteraciones en la expresión del receptor de LH podrían ser uno de los factores involucrados (Vanholder y col., 2006). El pico de LH inicia un complejo proceso de activación de múltiples genes que ocurre en varios pasos, en el que el tiempo es esencial para conducir finalmente a la ovulación del folículo preovulatorio (Robker y col., 2000; Vanholder, y col., 2006). De acuerdo con Kawate y col. (1990), el número de receptores de FSH y LH en las células de la granulosa de los quistes se reduce en comparación con los folículos normales, pero esto se contradice con los datos de Odore y col. (1999) y Calder y

col. (2001). Las discrepancias entre los resultados obtenidos en los diferentes estudios pueden explicarse por las diferencias en la metodología empleada o en la caracterización de las muestras.

Por otro lado, las alteraciones en la expresión de los receptores de esteroides, particularmente los de progesterona y estrógenos, podrían estar involucradas en la anovulación (Odore y col., 1999, Peter, 2004). Además, la diferenciación folicular y las dinámicas foliculares alteradas observadas en COD pueden ser mediadas por la expresión modificada de los receptores de esteroides ováricos (Ortega y col., 2007b, 2008; Salvetti y col., 2007; Alfaro y col., 2012). Los cambios en la expresión del receptor o en las isoformas de estos receptores, podrían alterar la vía de señalización de los esteroides culminando en alteraciones en la proliferación celular, la apoptosis y la diferenciación (Rosenfeld y col., 2001; Drummond y col., 2002; Walters y col., 2008). Un balance inapropiado entre los receptores de estrógeno α y β por ejemplo puede causar modificaciones en el desarrollo folicular normal, dadas las diferencias en afinidad por el 17β -estradiol de cada uno de ellos o debido a la formación de homo u heterodímeros previo a la unión al elemento de respuesta sobre el ADN (Odore y col., 1999; Salvetti y col., 2007; Alfaro y col., 2012; Salvetti y col., 2012).

Además de los cambios en la expresión y contenido de los receptores implicados en la esteroidogénesis, los mecanismos que regulan el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis de las células de la granulosa y la teca, tienen gran importancia clínica, ya que una falla en la vía de señalización de alguno de estos caminos puede estar implicada en la formación de los quistes ováricos (Peter y Dhanasekaran, 2003). Estudios recientes sugieren que los procesos apoptóticos pueden estar implicados en la anovulación. La falta de ocurrencia de dicho proceso en células de la granulosa podrían contribuir a la formación y persistencia de una estructura anovulatoria (Isobe y Yoshimura, 2007; Salvetti y col., 2010).

Los mecanismos de estrés mediante el cual el eje hipotálamico-hipofisario-adrenal pueden afectar la función ovárica son otras de las posibles causas de la formación de quistes (Baravalle y col., 2007). Se sabe que los corticoides incrementan la síntesis de

1. Introducción

progesterona estimulada por la FSH, debido a la estimulación de la actividad de la enzima 3β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (Hsueh y Erickson, 1978; Moberg, 1991). Se cree también, que el cortisol producido en condiciones de estrés podría ser almacenado en el líquido folicular e inducir cambios notables en la esteroidogénesis y la expresión de LHR a nivel de la pared folicular, que contribuyan al desarrollo de la enfermedad (Moberg, 1991).

2. Objetivos

Objetivo general:

Estudiar la expresión y regulación de receptores que podrían mediar la respuesta a estresores a nivel ovárico y las enzimas relacionadas con el metabolismo de glucocorticoides, buscando dilucidar su participación en los mecanismos causantes de los quistes foliculares y su relación con anestro de otros tipos asociado al estrés.

El presente estudio fue diseñado para examinar los patrones de expresión de los receptores de ACTH, de las isoformas de la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 β HSD) y de proteínas relacionadas a la síntesis de esteroides, tanto *in vivo* como *in vitro*, e identificar patrones de respuesta a diferentes estímulos.

La hipótesis general de trabajo, basada en resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio y en datos publicados por otros autores, fue que la regulación de las enzimas que participan en el metabolismo del cortisol en el ovario bovino, podrían jugar un papel clave en la patogenia de la condición quística. Está claramente determinado que la ovulación es un evento inflamatorio, caracterizado por un incremento en la síntesis de interleuquinas y prostaglandinas. Un mecanismo fisiológico para limitar dicho proceso inflamatorio en el ovario podría estar representado por la generación incrementada de glucocorticoides antiinflamatorios debido a la actividad reductasa de la 11 β HSD1 en el momento de la ovulación. Sin embargo, alteraciones en este proceso, como podrían ser el exceso de cortisol de origen adrenal o el estímulo directo de la ACTH sobre el ovario a través de sus receptores, podrían exacerbar este mecanismo, llegando a una acción antiinflamatoria local de tal magnitud que inhibiera el proceso de ovulación, favoreciendo la persistencia folicular y la posterior formación de quistes. De esta hipótesis surgieron los siguientes **objetivos específicos:**

2. Objetivos

- 1- Caracterizar la expresión de los receptores de melanocortinas en los componentes del ovario bovino en relación a diferentes estadios fisiológicos y en situaciones patológicas.
- 2- Determinar los perfiles de expresión y localización de ARNm y proteínas de las enzimas 11β HSD1 y 11β HSD2 en el ovario bovino, analizando los niveles intrafoliculares de cortisol y cortisona como indicadores de su actividad.
- 3- Identificar *in vitro* los tipos celulares foliculares que sufren modificaciones en la expresión de las variables estudiadas, frente a estímulos específicos (gonadotrofinas, ACTH, prostaglandinas e interleuquinas) y determinar diferencias entre las células y tejidos provenientes de folículos normales y folículos quísticos.
- 4- Caracterizar la expresión del receptor de glucocorticoides en los componentes del ovario bovino en diferentes estadios fisiológicos y en situaciones patológicas.
- 5- Analizar los niveles séricos e intrafoliculares de gonadotrofinas, ACTH y esteroides correlacionándolos con el resto de las variables estudiadas.
- 6- Reproducir *in vitro*, las condiciones halladas en el líquido folicular de quistes de animales diagnosticados a campo, y evaluar la respuesta de tejido ovárico de animales controles.
- 7- Determinar similitudes y diferencias entre los hallazgos efectuados en los modelos experimentales, con aquellos realizados en ovarios de animales con anestro diagnosticados a campo o provenientes de bovinos sacrificados en frigoríficos, con la finalidad de validar el modelo experimental utilizado.

3. Materiales y Métodos

3.1 Procedimientos llevados a cabo con animales

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

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

Se realizó la identificación de casos de COD espontánea a través de controles reproductivos de rutina en rodeos comerciales de la zona, mediante la cooperación de numerosos profesionales del área de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL). Estos médicos veterinarios nos informaron al primer indicio de alteraciones foliculares compatibles con COD, las cuales fueron verificadas mediante ultrasonografía (Transductor lineal transrectal 5 MHz, Honda HS101V, Japón) teniendo en cuenta para su correcto diagnóstico la definición de COD reportada por Bartolomé y col. (2005).

A partir del diagnóstico de COD, y dependiendo del tipo de animal, se tomaron dos tipos de muestras: ovarios enteros (en vacas con indicación de rechazo por motivos no reproductivos) o líquido folicular (en vacas que continuaban en el tambo). La obtención de ovarios enteros se efectuó mediante ovariectomía bilateral transvaginal, mientras que la obtención de líquido folicular se realizó por aspiración folicular guiada por ecografía, utilizando la técnica descrita por Scherthaner y col. (1999) y las adaptaciones de Seneda y col. (2003), como se detalla más adelante.

En todos los casos se tomaron muestras de sangre y se confeccionó una anamnesis completa de los animales, recabando datos sobre la alimentación que recibían, condiciones climáticas, medidas de manejo, etc., para un posterior análisis en trabajos paralelos.

3.1.1.1 Aspiración folicular guiada por ecografía

Para la realización de la aspiración de líquido folicular se adaptó la técnica descrita por Seneda y col. (2003) que ha sido ampliamente utilizada para la obtención de muestras

3. Materiales y Métodos

para estudios moleculares (Figura 12). Con este fin, se utilizó un sistema de ultrasonido digital Chison 8300 vet equipado con un transductor microconvexo de 5,0 MHz montado en una sonda transvaginal para aspiración folicular (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil). La misma posee una guía para la colocación de una aguja calibre 20G con bisel ecogénico que se conecta por medio de una tubuladura de teflón a tubos contenedores cónicos estériles de 50 ml. Para la aspiración se empleó una bomba de vacío (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil) a una presión de aspiración de 500 mm Hg. El dispositivo de aspiración fue introducido por vía vaginal hasta contactar con el fondo de la misma y el ovario, localizado por tacto rectal, fue acercado y fijado al transductor de la sonda. Luego se realizó la introducción de la aguja a través de la pared vaginal y posteriormente a través de la pared folicular para la toma de muestra. Inmediatamente después de recolectada la muestra de líquido folicular, se procedió a su conservación a temperatura de refrigeración (4-6°C) y traslado al laboratorio para su procesamiento.



Figura 12: Técnica de aspiración folicular guiada por ecografía.

3.1.1.2 Ovariectomía bilateral mediante abordaje transvaginal

Una vez detectada la COD, en vacas con indicación de rechazo, se procedió a la obtención de muestras de ovarios enteros mediante ovariectomía bilateral de acuerdo a lo descrito por Garnero y Perussia (2002). Esta técnica se realizó a través de abordaje transvaginal con el animal en pie (Figura 13).

En primer lugar se sedó al animal con 150 mg totales de clorhidrato de ketamina (Ketamina 10%, Alfazan[®]) y se efectuó anestesia epidural baja con 100 mg totales de clorhidrato de lidocaína (Lidocaína 2%, Vetue[®]). En segundo lugar, se realizó la limpieza y desinfección del área perineal y de la cavidad vaginal con una solución de cloroxilenol al

3. Materiales y Métodos

5%. Luego se procedió a realizar una pequeña incisión en el fondo de la vagina (parte dorsal o techo de la misma) utilizando un bisturí de hoja oculta, perforando ésta y el peritoneo con la ayuda de un tensor de vagina. El siguiente paso consistió en introducir una mano dentro de la cavidad pélvica, localizar el útero y retraerlo junto con los ovarios, dentro de la vagina (Garnero y Perusia, 2002). Se procedió a la sección y extracción de ambos ovarios, ligando previamente por transfixión los vasos sanguíneos que lo irrigan. Para evitar rupturas de las estructuras foliculares, previo a la ovariectomía se realizó la extracción de líquido folicular mediante el sistema de aspiración folicular anteriormente descrito. Finalmente los animales fueron tratados con antibióticos (Penicilina-Estreptomicina 20.000 UI/kg/día, durante 5 días; Penicilina-estrepto[®], Laboratorio Río de janeiro), coagulantes (Ciclonamina 6mg/kg + Vitamina K 0,02 mg/kg; Coagulante Chinfield[®], Laboratorio Chinfield), antiinflamatorios (Flunixin meglumina 2,2mg/kg/día, durante 3 días; Algimine 5%[®], Zoovet) y antiparasitarios externos aplicado en forma de aerosol sobre la herida y 4 cm alrededor de la misma (Fenitrotión 6,63 %, Curavet[®] plata aerosol, Zoovet).



Figura 13: Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje transvaginal.

3.1.2 Inducción experimental de COD

Está demostrado que la ACTH causa una supresión de la secreción basal de LH durante la fase folicular del ciclo estral, afectando el desarrollo folicular (Ribadu y col., 2000). Al prolongar la fase lútea con niveles bajos de progesterona (1-2 ng/ml) se obtiene como resultado el desarrollo de folículos por un periodo prolongado de tiempo, lo cual indica que cambios sutiles en el entorno hormonal pueden alterar dramáticamente el patrón normal del desarrollo folicular en los bovinos ocasionando el desarrollo de quistes foliculares, razón por la cual, este modelo fue seleccionado para inducir COD (Sirois y Fortune, 1988; Ortega y col., 2007b, 2008).

3.1.2.1 Animales

Se utilizaron 15 vaquillonas de la raza Holando Argentino puros por cruce, de entre 18 y 24 meses de edad, con un peso promedio de 400 kg, examinadas por tacto rectal y ultrasonografía antes del comienzo de la experiencia para comprobar la normalidad en su tracto reproductor y la normalidad y regularidad de sus ciclos estrales. Los animales fueron alojados en corrales descubiertos; la alimentación se basó en alimento balanceado comercial, heno de alfalfa y agua *ad libitum*.

Todas las vaquillonas fueron sometidas a la sincronización de sus ciclos estrales mediante el protocolo Ovsynch (Pursley y col., 1995) de la siguiente manera: se administraron 10 µg de un análogo sintético de GnRH por vía intramuscular (2,5 ml de acetato de buserelina, Receptal[®], Intervet, Argentina) el día -9, el día -2 se administraron 150 µg de PGF2α (D+Cloprostenol, Ciclar[®], Zoovet) y el día 0 se realizó la última administración de 10 µg de GnRH. La ovulación fue confirmada mediante ultrasonografía (Sirois y Fortune, 1988) luego de la última inyección de GnRH y ese día se consideró el día 1 del ciclo estral (Figura 14). Durante este periodo, los animales no recibieron ningún otro tratamiento.

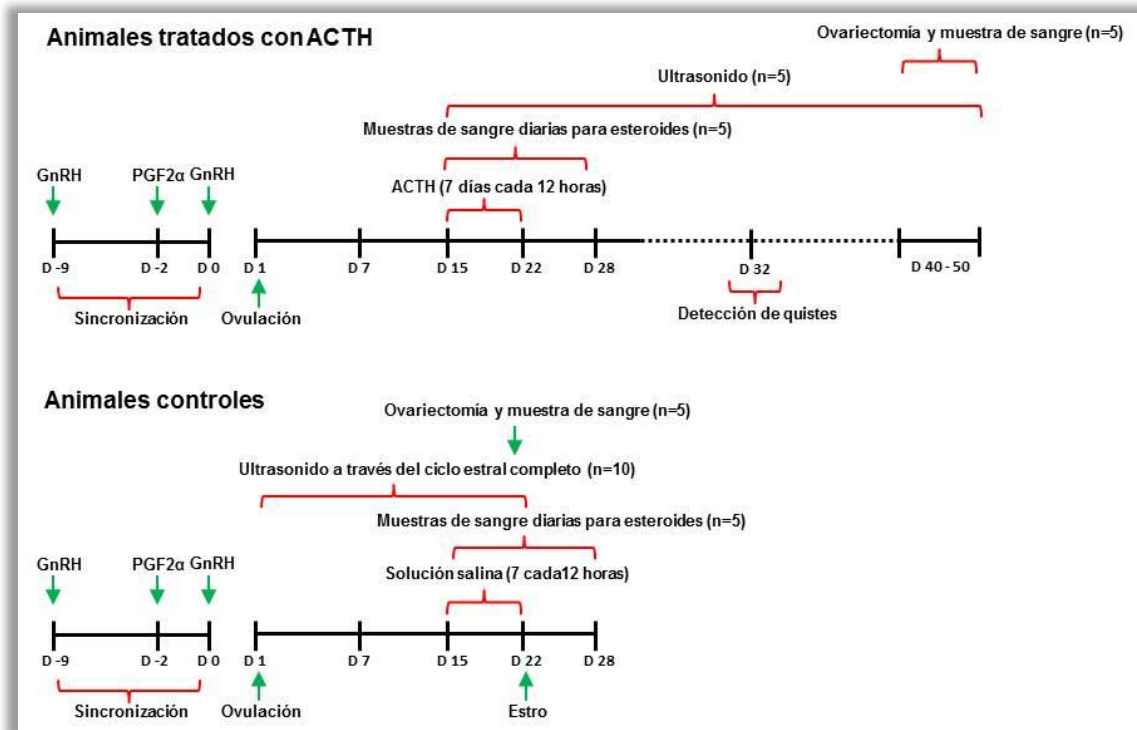


Figura 14: Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes ováricos foliculares mediante administración de ACTH.

3.1.2.2 Grupos experimentales

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

Grupo I: luego de la sincronización de celo, 5 vaquillonas se trataron con 100 UI de un polipéptido sintético con actividad ACTH (1mg/ml de Tetracosactido corticotropina, Synacthen Depot, Novartis, Basel, Suiza), cada 12 horas por un periodo de 7 días seguidos, contabilizados a partir del día 15 del ciclo estral. El tratamiento (día 15 del ciclo estral normal) se inició en el momento del ciclo en el que la onda de LH preovulatoria comienza a ser sensible a la inhibición por la ACTH exógena (Liptrap y McNally, 1976; Dobson y col, 2000; Ortega y col., 2008).

Grupo II: un grupo de 10 hembras se mantuvieron en condiciones ambientales normales, como grupo control y recibieron 1ml de solución salina, cada 12 horas durante 7

días. Estos animales, una vez sincronizados, fueron sometidos a ovariectomía durante diferentes etapas del desarrollo folicular.

3.1.2.3 Monitoreo de los cambios ováricos

Para monitorear los cambios en el ciclo estral se realizaron exámenes diarios mediante tacto rectal y ultrasonografía a las vaquillonas de ambos grupos hasta la obtención de las muestras. Se utilizó un equipo de ultrasonografía Aloka 500 (Japón), equipado con un transductor lineal transrectal de 5.0 MHz. Se tomaron como parámetros normales de proestro un diámetro medio de los folículos ovulatorios de 15-18 mm, ausencia de cuerpo lúteo y presencia de tono uterino, además de una duración media del ciclo estral de 20-21 días.

Se consideraron estructuras quísticas todos aquellos folículos con un diámetro mayor de 20 mm y que persistieron por 10 días sin ovular y sin formación de cuerpos lúteos (Silvia y col., 2002; Bartolomé y col., 2005). El primer día de formación del quiste fue el día en que la formación folicular superó 20 mm de diámetro.

3.1.2.4 Ovariectomía bilateral mediante abordaje por el flanco

La extracción de los ovarios se realizó mediante abordaje por el flanco izquierdo con el animal en pie (Figura 15), el cual se preparó quirúrgicamente. En primer lugar se realizó la sedación mediante la aplicación por vía subcutánea (SC) de 5 ml de una formulación que combina 5 mg/ml de Clorpromazina y 2 mg/ml de Difenhidramina (Stresin LA[®], Laboratorio Rio de Janeiro) y luego se realizó anestesia local infiltrativa según la técnica de Magda modificada, utilizando 160 ml de clorhidrato de lidocaína al 2% (Lidocaína 2%, Vetue[®]). Se procedió realizar una incisión desde dorso-caudal hacia ventro-craneal de la piel del flanco y los planos musculares que se encuentran debajo de la misma, de una longitud suficiente para permitir un buen acceso a cavidad abdominal de las manos del cirujano. Una vez localizados, ambos ovarios fueron extraídos ligando previamente por transfixión los vasos sanguíneos que lo irrigan, y procediendo luego a la sutura de los planos musculares y de la piel (Garnero y Perusia, 2002). Finalmente los animales fueron tratados con antibióticos, coagulantes, antiinflamatorios y antiparasitarios externos tal y

como fuera descrito previamente para la ovariectomía bilateral mediante abordaje transvaginal. Previamente a la ovariectomía se obtuvieron diariamente muestras de sangre, desde el inicio del tratamiento con ACTH hasta el día de la ovariectomía.



Figura 15: Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje por flanco izquierdo.

3.1.2.5 Procesamiento de las muestras

Los ovarios o el líquido folicular proveniente de animales con COD espontánea diagnosticada a campo, así como aquellos procedentes del modelo experimental, fueron procesados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias- Universidad Nacional del Litoral (FCV-UNL).

Se tomaron 3 tipos de muestras a partir del material proveniente del campo y del modelo experimental para las determinaciones posteriores:

a) Muestras de líquido folicular, obtenidas por aspiración folicular guiada por ecografía en quistes diagnosticados a campo, o mediante jeringa y aguja en folículos intactos de ovarios enteros obtenidos por ovariectomía (quísticos o controles). El líquido folicular recolectado fue conservado a -20°C y destinado a mediciones hormonales.

b) Los ovarios enteros (quísticos o controles), luego de la extracción de pequeñas partes de pared folicular y de líquido folicular, fueron reducidos y fijados en formol bufferado al 10% durante 8 hs a 4°C y se procesaron siguiendo protocolos de rutina para su inclusión en parafina.

c) La sangre fue procesada para obtener suero, el cual fue conservado a -20°C . Esto permitió previamente corroborar el modelo experimental y las modificaciones endocrinas existentes durante el desarrollo del mismo. De la misma manera, el suero obtenido de los animales con diagnóstico de COD espontánea en los establecimientos pecuarios, permitió evaluar los parámetros hormonales de los mismos.

3.1.3 Obtención y procesamiento de muestras obtenidas en la playa de faena

En el frigorífico, se procedió a la recolección de ovarios con folículos terciarios y con folículos compatibles con la descripción de quistes foliculares (Bartolomé y col., 2005), dentro de los 20 minutos de muerte de los animales (Figura 16). Los ovarios se obtuvieron de hembras bovinas de raza Holando Argentino, evaluadas visualmente como vacas no preñadas, sin la presencia de anomalías macroscópicas del sistema reproductivo. Inmediatamente los ovarios fueron refrigerados y trasladados al LBCMA-FCV-UNL.

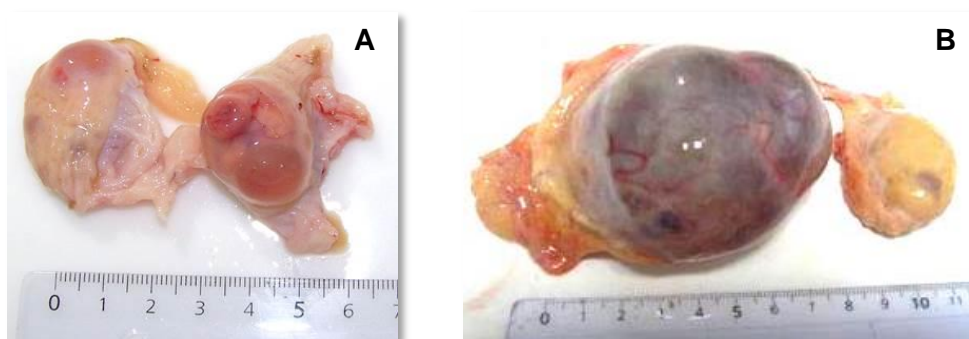


Figura 16: Ovarios provenientes de playa de faena. A: ovarios sanos con folículos terciarios grandes y CL. B: ovarios con estructura quística de diámetro superior a 30 mm en uno de ellos.

En el LBCMA, se procedió a tomar las siguientes muestras:

a) Muestras de **pared folicular completa** (teca y granulosa) de folículos terciarios de ovarios normales, los cuales fueron clasificados de acuerdo Parrott y Skinner (1998) en: folículos pequeños menores a 5 mm de diámetro, folículos medianos entre 5 y 10 mm y folículos grandes mayores a 10 mm. También se tomaron muestras de pared completa de

3. Materiales y Métodos

quistes. Todas estas muestras se conservaron a -80°C hasta su procesamiento (extracción de proteínas para la técnica de Western Blot).

b) Teniendo en cuenta la clasificación folicular anteriormente mencionada, se tomaron muestras de la **teca** de folículos terciarios de ovarios normales y de quistes, las cuales se lavaron con agua DEPC y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento (extracción de ARN total para PCR de punto final y PCR en tiempo real).

c) Muestras de células de la **granulosa** de folículos terciarios de ovarios normales (Parrot y Skinner, 1998) y de quistes. Para esto, se realizó el aspirado del líquido folicular de los diferentes folículos conteniendo células de la granulosa, con jeringa 1 ml y aguja 25G, y se conservó a -80°C hasta su procesamiento (extracción de ARN total para PCR de punto final y PCR en tiempo real).

d) Muestras de **pared folicular** completa de ovarios sanos y con quistes destinadas a cultivos celulares como se describe más adelante.

e) **Líquido folicular** de las muestras obtenidas en frigorífico, se guardó a -20°C para las posteriores determinaciones hormonales.

3.2 Cultivos de tejidos

3.2.1 Obtención y procesamiento de las muestras

Con la finalidad de estudiar la respuesta de la pared como un todo, incluyendo las interacciones entre teca y granulosa, se tomaron diferentes porciones de folículos de ovarios bovinos obtenidos en playa de faena, las que se utilizaron como controles o fueron sometidas a tratamientos hormonales.

Bajo campana de seguridad de tipo II, se lavaron los ovarios con buffer fosfato salino (PBS) estéril y se aspiraron los folículos con aguja 25G y jeringa de 1ml. El líquido folicular obtenido se guardó a -20°C para posteriores determinaciones hormonales.

A continuación, se procedió a la obtención de los folículos terciarios grandes y los quistes con la ayuda de un bisturí. Cada folículo se seccionó en cuatro porciones de aproximadamente 50 mg cada una, tres destinadas a los diferentes tratamientos hormonales y una para control basal, se utilizaron un total de 6 folículos terciarios grandes y 6 folículos quísticos. Las distintas porciones de tejido se colocaron en placas de cultivo (Nunc plate,

Applied Scientific[®], South San Francisco, CA, USA) de 24 pocillos (1,5 ml medio/pocillo) y en medio de cultivo buffer bicarbonato Krebs-Ringer pH 7,4 (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM; KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 25 mM; NaHCO₃, 2.5 mM, glucosa 11.5 mM, BSA 0.1% y ácido ascórbico 100 µg/ml; todos obtenidos de Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). El medio de cultivo, fue equilibrado previamente durante 2 horas en una estufa de cultivo (Forma Scientific 3154 Water-Jacketed Incubator, 178 Asheville, NC, USA) gaseada con 95% O₂ y 5% CO₂ a 37°C. Las placas preparadas de esta manera se incubaron durante 20 minutos.

3.2.2 Tratamiento hormonal de los cultivos de tejidos

Luego del pre-cultivo, 3 de las 4 porciones de tejido de los distintos folículos terciarios grandes y quísticos se colocaron en medio de cultivo con 1, 10 o 100 nM de ACTH (Laboratorios ELEA[®], Buenos Aires, Argentina), durante 3 horas a 37°C. La porción de tejido usada como control (secreción basal) se incubó de la misma manera pero sin el estímulo de ACTH (Figura 17). Una vez finalizado el ensayo, se tomó el medio de cultivo de cada pocillo y se lo guardó a -20°C para posteriores determinaciones hormonales, y las muestras de pared folicular se guardaron inmediatamente a -80°C para ser utilizadas para la determinación de la expresión de las enzimas 11βHSD por Western Blot.

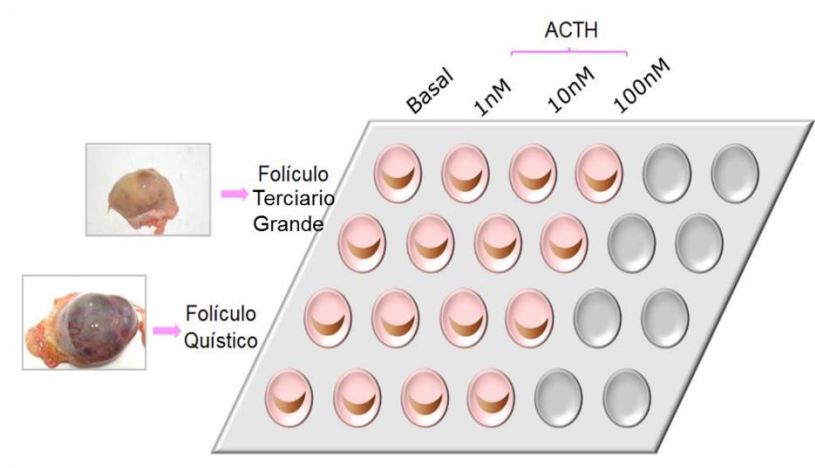


Figura 17: Esquema ilustrativo del protocolo general de cultivo de tejidos de diferentes folículos terciarios grandes (n=6) y folículos quísticos (n=6) de ovarios bovinos.

3.3 Determinaciones hormonales

Las concentraciones de 17β -estradiol, progesterona, testosterona y cortisol presentes en el líquido folicular y en el suero, obtenidos de los animales controles y con COD espontánea e inducida con ACTH, como así también en los medios de incubación provenientes de los cultivos de tejidos, fueron medidos utilizando kits de ELISA (Estradiol EIA, DSL-10-4300; Progesterona EIA, DSL-10-3900; Testosterona EIA, DSL-10-4000; Cortisol DSL-1-200; Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue 7 pg/ml para estradiol, 0.13 ng/ml para progesterona, 0.04 ng/ml para testosterona, y 0.10 μ g/dl para cortisol. Para los medios de incubación, los resultados se normalizaron en relación al peso del tejido y se expresaron como concentración/mg de tejido (Amweg y col., 2011).

3.4 Obtención y cuantificación de ARNm correspondiente a 11β HSD, GR y MCRs

3.4.1 Extracción de ARN total

Para la obtención del ARN total a partir de tejido o líquido folicular, se procedió de la siguiente manera:

- a) La obtención de células de la granulosa a partir de líquido folicular se llevó a cabo centrifugando el mismo a 2000g durante 5 minutos y a 4°C. El sobrenadante fue separado y almacenado como líquido folicular a -20°C. Al precipitado celular obtenido, correspondiente a las células de la granulosa, se le agregó 750 μ l del reactivo TRIzol[®] LS Reagent (Cat. N° 10296-028 Invitrogen). Las células fueron lisadas mediante el uso de un vórtex (ZX Classic, VELP Científica[®]).
- b) Para la obtención de las células de la teca, se pesaron aproximadamente 60mg de tejido congelado que fue lavado con agua DEPC 3 a 4 veces, mezclando en un vórtex y descartando el agua cada vez, para eliminar posibles células de la granulosa presentes. A continuación se agregaron 750 μ l del reactivo TRIzol[®] LS Reagent (Cat. N° 10296-028 Invitrogen) y luego se procedió a la homogeneización del tejido, con un homogeneizador de mano (Ultra Turrax[®] IKA T10 Basic), hasta lograr la dispersión total del mismo.

A continuación, la suspensión de células de la granulosa o la teca fue incubada durante 5 minutos a 4°C y luego se agregaron 200 µl de cloroformo, agitando vigorosamente para favorecer el contacto entre las fases. La mezcla resultante fue incubada durante 15 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, se procedió a centrifugar a 12000g durante 20 minutos a 4°C para permitir la diferenciación de las fases. La fase acuosa fue trasvasada a un tubo estéril, se adicionó igual volumen de isopropanol, y para favorecer la precipitación de ácidos nucleicos de interés se incubó toda la noche a -20°C. Al día siguiente, se realizó una nueva centrifugación a 12000g durante 20 minutos a 4°C. El precipitado obtenido, correspondiente al ARN total, fue lavado con etanol 75% y finalmente resuspendido en agua DEPC precalentada a 60°C, libre de ARNasas.

Previamente a la transcripción reversa, se realizó el tratamiento con desoxirribonucleasa I (DNase I, Amplification Grade, Invitrogen) del ARN total extraído, con el fin de eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico. Luego se procedió a la inactivación de la enzima mediante el agregado de EDTA 25 mM incubando a 65°C durante 10 minutos. Finalmente se determinó la integridad y pureza del ARN total por lectura en espectrofotómetro UV/Visible (Jenway 7315).

3.4.2 Transcripción Reversa para la síntesis del ADN copia (ADNc)

Las reacciones de transcripción reversa se llevaron a cabo agregando cantidades constantes de ARN a la mezcla de reacción conteniendo cebadores con secuencias al azar (1 µg/µl), dNTPs (25 mM), buffer de reacción para la enzima (5x), DTT (0,1 M), inhibidor de ribonucleasas (RNaseOUT 40 U/µl) y retrotranscriptasa MMLV (200 U/µl) en cantidades apropiadas y con tiempos adecuados de incubación. Todos los reactivos empleados fueron provistos por Invitrogen. La reacción prosiguió bajo el siguiente protocolo: incubación a 25°C durante 10 minutos, a 37°C por 50 minutos, e inactivación de la misma durante 15 minutos a 70°C.

La concentración de ADN copia simple cadena (ADNc) fue obtenida por medición fluorimétrica (Qubit™, Invitrogen) con el objeto de emplear en las reacciones de amplificación del ADN específico, una cantidad de molde conocida que permita cuantificar relativamente y comparar los resultados entre las estructuras foliculares analizadas.

3.4.3 Diseño de cebadores específicos para las enzimas 11 β HSD, los receptores MCRs y GR, y otros genes

A partir de las secuencias de ADNc obtenidas de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.htm>) fueron diseñados los cebadores específicos para las secuencias correspondientes a 11 β HSD1, 11 β HSD2, GR, MC1R, MC2R, MC3R, MC4R y MC5R. En los casos en que fue posible, se consideró que el producto amplificado con cada par de cebadores, se corresponda al ensamble de dos o más intrones del gen de interés. Para el diseño y posterior verificación de su especificidad, se utilizó la aplicación PrimerSelect del programa LASER GENE (DNASStar, WI, USA). Todos los oligonucleótidos utilizados fueron provistos por Invitrogen.

Por otro lado, se diseñaron cebadores para amplificar las secuencias codificantes de las enzimas CYP19A1 (específica de células de la granulosa) y CYP17A1 (específica de células de la teca) siguiendo el procedimiento anteriormente detallado. Las reacciones de amplificación con estos cebadores permitieron seleccionar las muestras sin contaminación cruzada entre las células provenientes de las distintas capas foliculares. A su vez, se emplearon cebadores específicos para amplificar el gen de expresión constitutiva correspondiente a la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con el objeto de normalizar los niveles de expresión en relación al mismo.

En la Tabla 2 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos empleados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final y en la Tabla 3, las secuencias de oligonucleótidos empleados para la PCR en tiempo real. Además, en las tablas se muestran las temperaturas de hibridación, los tamaños de los fragmentos amplificados, y el número de acceso a GenBank de la secuencia empleada como molde para su diseño.

3. Materiales y Métodos

Nombre	Secuencia (5'-3')	N° Acceso Genbank	Tamaño del fragmento (pb)	Temperatura Hibridación (°C)	Ciclos
MC1R Sentido Antisentido	CAGCCTGCTCTTCATCACCTACTA AGCACTGCAGCACCTCTTG	NM_174108	422	58.8	30
MC2R Sentido Antisentido	GGCATTACCATCGTGACCTTC TATATCCCTGTGGCTCTAAAATC	NM_174109	449	57.2	30
MC3R Sentido Antisentido	CGATCCCCGTGGTCAAC GCAACTGCCCTTCATACA	FJ433881	443	57.4	30
MC4R Sentido Antisentido	TCGATCGCGGTGGACAGGTA TCCGCAGGGCATAAATCAGAGG	NM_174110	493	58.9	32
MC5R Sentido Antisentido	CCAGCTGGGCACGGTCTT GCTCTGAAAACAAACAATCTCCTT	NM_001015542	431	57.6	32
CYP17 Sentido Antisentido	GGAGGCGACCATCAGAGAAGTGC CAGCCGGGACATGAAGAGGAAGAG	NM_174304	319	60.8	35
CYP19 Sentido Antisentido	TAAAACAAAGCGCCAATCTCTACG GGAACCTGCAGTGGGAAATGA	BTCYP19	341	55.4	35
GAPDH Sentido Antisentido	CACCCTCAAGATTGTCAGCA GGTCATAAGTCCCTCCACGA	BC102589	103	52	31

Tabla 2: Cebadores sentido y antisentido específicos para bovino y condiciones de la PCR de punto final.

Nombre	Secuencia (5'-3')	N° Acceso GenBank	Tamaño del fragmento (pb)	Temperatura Hibridación (°C)	Ciclos
118HSD1 Sentido Antisentido	CATTCTCAACCACATCCACTACAC GCAGAATACGCAGCAACAAG	NM_001123032	207	58	40
118HSD2 Sentido Antisentido	CGAGCATTGAATGGGCAGTT CCTGGGTAATAGCGGGGAGT	AF074706	123	58	40
GR Sentido Antisentido	TTCCTGCAACATTACCACAACCTCA TTTCACGGCTGCAATCACCT	NM_001206634	167	57	40
MC2R Sentido Antisentido	ACTTAGCAGCAGCAGCATCACAGG AGCAGGCGGTAGGCAGCAACT	NM_174109	120	58	40
GAPDH Sentido Antisentido	CACCCTCAAGATTGTCAGCA GGTCATAAGTCCCTCCACGA	BC102589	103	52	35

Tabla 3: Cebadores sentido y antisentido específicos para cada ADNc bovino y condiciones de la PCR en tiempo real.

3.4.4 PCR de punto final

Las PCR se realizaron de acuerdo a las condiciones estandarizadas para cada par de cebadores, empleando las temperaturas de hibridación adecuadas. El número de ciclos y cantidades de ADNc empleados como molde fueron determinados en experiencias previas teniendo en cuenta que dichas condiciones se ajusten al rango lineal de la curva de amplificación.

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l conteniendo 10 a 50 ng de ADNc, cebador sentido (20 μ M), cebador antisentido (20 μ M), 2,5 μ l de buffer Taq 10X (50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8,4), 1,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP; y 2 U Taq polimerasa (5 U/ μ l) (todos los reactivos fueron provistos por Invitrogen) usando un termociclador (TC-3000G, Techne Inc., NJ, USA).

El programa utilizado incluyó un tiempo inicial a 94°C (3 minutos) seguido de 30 a 35 ciclos (según la optimización lograda para cada gen de interés) de 45 segundos a 94°C para la desnaturalización del ADNc, 30 segundos a la temperatura de hibridación adecuada para cada par de iniciadores (Tabla 2) y 1 minuto 30 segundos a 72°C para la extensión a partir de los cebadores. Un último paso a 72°C durante 10 minutos fue necesario para la extensión final de todos los productos amplificados.

Se realizaron conjuntamente en cada ensayo, controles negativos, de reactivos y de muestra, omitiendo en el primer caso el ADNc como templado (reemplazándolo por agua bidestilada estéril) y en el segundo caso, utilizando el ARN purificado en su reemplazo. Además se utilizaron controles positivos, usando ADNc de diferentes tejidos: hígado, bazo, corteza adrenal, médula espinal y linfocitos.

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

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

3.4.5 PCR en tiempo real

Se utilizó un protocolo de PCR en tiempo real estandarizado para analizar la expresión de los ARNm 11 β HSD1, 11 β HSD2, GR y MC2R, utilizando SYBR Green I (Invitrogen) (Pfaffl, 2001).

Las PCR se realizaron de acuerdo a las condiciones estandarizadas para cada par de cebadores, empleando las temperaturas de hibridación adecuadas. El número de ciclos y cantidades de ADNc empleados como molde fueron determinados en experiencias previas teniendo en cuenta que dichas condiciones se ajusten al rango lineal de la curva de amplificación.

Los niveles de los transcritos se midieron por cuantificación relativa de PCR en tiempo real en un sistema de PCR en tiempo real StepOne (Applied Biosystems, Life technology, CA, USA). Se utilizaron los siguientes protocolos estandarizados:

- Para 11 β HSD1, 11 β HSD2, GR y MC2R se utilizó la enzima Phire[®] (Hot Start II ADN Polimerasa, Thermo Fisher Scientific company, Finlandia): desnaturalización inicial 3 minutos a 98°C y 40 ciclos con una desnaturalización de 5 segundos a 98°C y las condiciones de hibridación, extensión y lectura de fluorescencia que se detallan en la Tabla 4.
- Para GAPDH se utilizó la enzima TAQ ADN Polimerasa Recombinante (Invitrogen, Brazil): desnaturalización inicial 10 minutos a 95°C y 35 ciclos con una desnaturalización de 15 segundos a 95°C y las condiciones de hibridación, extensión y lectura de fluorescencia que se detallan en la Tabla 4.

3. Materiales y Métodos

Gen	Concentración de iniciadores (μM)	Temperatura de hibridación (°C)	Tiempo de hibridación (segundos)	Temperatura de extensión (°C)	Tiempo de extensión (segundos)	Temperatura de lectura de fluorescencia (°C)
<i>11βHSD1</i>	0.9	58	20	72	30	84
<i>11βHSD2</i>	0.5	58	15	72	25	86
<i>GR</i>	0.5	57	15	72	20	81
<i>MC2R</i>	0.5	58	15	72	20	82
<i>GAPDH</i>	0.5	52	20	72	30	74

Tabla 4: Condiciones utilizadas en PCR tiempo real para los diferentes genes evaluados.

Todas las mediciones de cada muestra se realizaron por duplicado.

La eficiencia de las reacciones y las cantidades relativas de producto se determinaron por la construcción de una curva estándar de 8 puntos. Las curvas estándares se construyeron a partir de diluciones seriadas al 50% de una mezcla de ADNc de células de la granulosa y de la teca para GR y GAPDH, y a partir de ADNc de tejido control (corteza adrenal) para 11βHSD1, 11βHSD2 y MC2R. La eficiencia de las PCRs se determinó usando StepOne software v2.2 (Applied Biosystems).

Las concentraciones de los cebadores que se usaron en cada PCR en tiempo real se detallan en la Tabla 4.

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 μl conteniendo 4 μl de ADNc (previamente cuantificado por el método fluorimétrico) y 16 μl de una mezcla de reacción: cebador sentido (20 μM), cebador antisentido (20 μM), 0.2 mM de cada dNTP, 4 μl de buffer Phire 5X y 0.05 μl de enzima Phire® (Hot Start II ADN Polimerasa, Thermo Fisher Scientific Company, Finlandia).

El gen GAPDH se utilizó como normalizador.

Los niveles de expresión de los ARNm de los distintos genes se registraron como el valor del ciclo umbral (Ct: del inglés cycle threshold), que corresponde al número de ciclos a los cuales la señal de fluorescencia comienza a ser detectada por encima de un valor umbral. El Ct se calculó manualmente usando StepOne v2.2 (Applied Biosystems). Se

incluyeron controles negativos de muestra de ADNc, los cuales no produjeron amplificados. La pureza de los productos amplificados se confirmó mediante curvas de disociación del ADN.

La cuantificación relativa de los ARNm de 11 β HSD1, 11 β HSD2, GR y MC2R se realizó por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

3.4.6 Secuenciación nucleotídica

La especificidad de los productos amplificados por PCR fue verificada por secuenciación de los mismos, enviándolos a un servicio para tal fin (Macrogen Sequencing Service, Korea). Las secuencias obtenidas fueron posteriormente evaluadas para verificar sus porcentajes de similitud, empleando la herramienta MegAlign del programa LASERGENE (DNASar, WI, USA).

3.5 Detección y cuantificación de las proteínas 11 β HSD y GR

3.5.1 Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas

Las muestras de tejido obtenidas de animales controles, inducidos experimentalmente y con COD espontánea fueron fijadas con formol tamponado, y posteriormente lavadas en PBS. A continuación, las mismas fueron procesadas siguiendo protocolos histológicos de rutina para su inclusión en parafina (Ortega y col., 2004).

Se realizaron cortes de 4 μ m de espesor, los que se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyl-triethoxysilane (Sigma, USA), que luego se secaron en estufa a 37°C durante 24 horas.

3.5.2 Inmunohistoquímica

Mediante esta técnica se logró la identificación *in situ* de las proteínas 11 β HSD1, 11 β HSD2 y GR en tejido ovárico proveniente de ovarios de animales del modelo experimental y de animales con COD espontánea, utilizando anticuerpos específicos disponibles comercialmente y detallados en la Tabla 5.

Anticuerpo	Clon	Proveedor comercial	Dilución
Primarios			
11 β HSD1	Policlonal conejo	Abcam, Cambridge, UK (ab39364)	1:100
11 β HSD2	Policlonal pollo	Abcam, Cambridge, UK (37800)	1:800
IgY	Policlonal conejo	Abcam, Cambridge, UK (ab6694)	1:600
GR	Monoclonal ratón	Abcam, Cambridge, UK (ab2768)	1:25
Secundarios			
IgG anti-mouse Biotinilado	Monoclonal	LETH	1:100
IgG anti-rabbit Biotinilado	Policlonal	LETH	1:100

Tabla 5: Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.

Las inmunodetecciones se realizaron siguiendo el protocolo descrito previamente por Ortega y col. (2004), según se detalla a continuación:

1. Desparafinación 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 cada uno), alcohol etílico 96° (dos pasajes de 3 minutos cada uno) 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 1200 W). Como solución de recuperación se usó buffer citrato 0,01 M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en vasos coplin a baño maría, 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.

3. Materiales y Métodos

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 15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda con una solución de suero normal de cabra al 5%.
8. Incubación con anticuerpo primario: se usó el anticuerpo de interés, según la proteína a detectar (Tabla 1) en la dilución adecuada durante 18 horas a 4°C. Para los controles de especificidad se sustituyó el anticuerpo primario por suero normal de cabra.
9. Después de la incubación con el anticuerpo primario la cámara se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos.
10. Dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
11. Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado preabsorbido (monoclonal o policlonal, según el caso) en la dilución apropiada, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
12. Dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
13. Incubación con complejo extravidina-peroxidasa lista para usar (Sigma-Aldrich®), durante 30 minutos a temperatura ambiente.
14. Tres lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
15. Revelado de la reacción con diaminobencidina (DAB), utilizando la solución comercial (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.

Para el anticuerpo primario 11 β HSD2 se incubó además el anticuerpo puente anti IgY, durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C), seguido de 2 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno.

Para el anticuerpo GR se realizó una secuencia de recuperación antigénica en microondas diferente: 14 minutos a 100% de potencia, abriendo el coplin cada 2 minutos y completando con agua destilada el volumen de buffer evaporado; 20 minutos dentro del microondas apagado.

La inmunomarcación fue visualizada en el citoplasma para 11 β HSD1 y 11 β HSD2, y en el núcleo para el caso de GR. La marcación obtenida en cada caso, fue cuantificada en las capas de células de la granulosa y de la teca interna de los folículos provenientes de los ovarios de los grupos control, con COD espontánea y COD inducida experimentalmente. Los folículos fueron clasificados en los siguientes grupos: primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y folículos quísticos (Ortega y col., 2008; Salvetti y col., 2010).

3.5.3 Procesamiento de las muestras para la técnica de Western Blot

Se tomaron fracciones de pared folicular de aproximadamente 60 mg de cada categoría de folículos terciarios y quísticos, de ovarios obtenidos en playa de faena, y fueron colocadas en buffer RIPA en presencia de inhibidores de proteasas. Esta mezcla fue homogeneizada con un homogeneizador de mano (Ultra Turrax® IKA T10 Basic). El sobrenadante obtenido luego de la centrifugación a 14.000g durante 20 minutos a 4°C fue separado y se cuantificó su contenido proteico mediante método fluorimétrico (Qubit™, Invitrogen, CA, USA) según las indicaciones del fabricante.

Para analizar el efecto estimulante de ACTH *in vitro* sobre la expresión de 11 β HSD1 y 11 β HSD2, las muestras de pared folicular provenientes de los folículos terciarios grandes y quísticos usados en el ensayo de cultivo de tejidos (basal y tratado con ACTH), también fueron procesados siguiendo el mismo procedimiento.

Dichas muestras fueron posteriormente utilizadas para las electroforesis en geles de poliacrilamida, inmunodetección y cuantificación de 11 β HSD1 y 11 β HSD2 y la detección de especificidad de GR por Western Blot.

3.5.4 Western Blot

Se realizaron electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida, 29:1) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). El tamaño del poro para el gel de resolución se correspondió con una concentración de acrilamida del 12% para la posterior detección de las enzimas 11 β HSD1 y 11 β HSD2 y del 8% para GR. Se utilizaron homogeneizados de pared folicular de los diferentes folículos terciarios y quísticos. Se prepararon las muestras diluyendo con buffer de muestra en condiciones reductoras para SDS-PAGE en una relación 1:2, y posteriormente se incubaron en baño termostático a 95°C por 5 minutos. Se utilizó una cuba vertical y el buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1 % de SDS, pH 8,3. Según los valores obtenidos de la cuantificación por fluorimetría, se calcularon los volúmenes a sembrar adecuados para 40 μ g de proteínas y se realizó la electroforesis durante 50 minutos a 25 mA para el gel de apilamiento, y se continuó a 50 mA durante 90 minutos hasta la visualización del frente de corrida en el borde inferior del gel de resolución. Los marcadores de peso molecular (PM) (Full-Range Rainbow™, GE Healthcare) que se utilizaron se detallan en la Figura 18.



Figura 18: Marcadores de PM para SDS-PAGE, amplio espectro (Rainbow™, RPN800E, GE Healthcare).

Para la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de las proteínas separadas en el gel, se empleó la solución tamponada Towbin modificada, compuesta por Tris-Glicina y 20 % de metanol. Dicha transferencia se realizó en frío, a 100 V durante 2 horas, condiciones utilizadas para todos los casos. Al término de este periodo se coloreó la

membrana con el colorante Rojo Ponceau para ver la efectividad de la transferencia. Una vez verificada, se procedió a la inmunodetección de las proteínas detalladas en la Tabla 6.

Anticuerpo	Clon	Proveedor comercial	Dilución
Primarios			
11 β HSD1	Policlonal conejo	Abcam, Cambridge, UK (ab39364)	1:500
11 β HSD2	Policlonal pollo	Abcam, Cambridge, UK (37800)	1:500
IgY	Policlonal conejo	Abcam, Cambridge, UK (ab6694)	1:500
GR	Monoclonal ratón	Abcam, Cambridge, UK (ab2768)	1:25
Secundarios			
IgG anti-mouse conjugado con Px	Monoclonal	LETH	1:1000
IgG anti-rabbit Conjugado con Px	Policlonal	LETH	1:1000

Tabla 6: Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de Western Blot.

Para la inmunodetección de las proteínas en las membranas de nitrocelulosa se empleó el siguiente protocolo:

1. Enjuagar la membrana de nitrocelulosa con agua destilada y luego con buffer tris salino-Tween (TBS-T) hasta la desaparición del colorante Rojo Ponceau.
2. Bloquear los sitios de unión inespecíficos con TBS-T leche 5 %, 2 horas y 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación.
3. Lavar a temperatura ambiente con TBS-T realizando:
 - Dos lavados rápidos
 - Cinco lavados de 5 minutos
4. Incubar con el anticuerpo primario durante toda la noche en heladera. La dilución del anticuerpo primario se realizó con buffer de bloqueo mediante la colocación del anticuerpo cubriendo la membrana y de parafilm sobre la misma para que se distribuya el anticuerpo por capilaridad.

5. Lavar a temperatura ambiente con TBS-T realizando:
 - Dos lavados rápidos
 - Cinco lavados de 5 minutos
6. Incubar con el anticuerpo secundario durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Para la dilución se utiliza buffer de bloqueo y se procede como en el paso 4.
7. Lavar a temperatura ambiente con TBS-T realizando:
 - Dos lavados rápidos
 - Cinco lavados de 5 minutos
8. Preparar el reactivo quimioluminiscente (GE Healthcare), colocar la membrana en un recipiente con el reactivo e incubar 5 minutos.
9. Escurrir la membrana y colocarla entre dos hojas de papel celofán.
10. Revelar la membrana en cuarto oscuro con los reactivos de revelado y fijado (Kodak) y con placas radiográficas (GE Healthcare).
11. Lavar con agua destilada.
12. Secar la placa a temperatura ambiente.

3.6 Análisis digital de imágenes

Las imágenes de los preparados histológicos fueron digitalizadas mediante una cámara color de video (SONY CCD-IRIS) conectada a una PC de escritorio montada sobre un microscopio óptico convencional (Olympus BH2, Olympus Co., Japan). La resolución de las imágenes fue establecida en 1200 x 1600 píxeles. La evaluación de las mismas fue realizada con el analizador digital de imágenes (Image Pro-Plus 3.0).

El área inmunohistoquímicamente marcada para 11 β HSD1 y 11 β HSD2 se calculó a través de la segmentación de colores seleccionando los objetos con reacción marrón moderado/intenso (dado por la reactividad del cromógeno utilizado) como rango positivo. Dicha coloración fue elegida con una sensibilidad de 4 (máximo 5). Posteriormente fue aplicada una máscara para la separación permanente de los colores y se realizó un histograma para determinar el porcentaje del área marcada sobre el área total evaluada, tal como fue descrito en trabajos previos (Salveti y col., 2004; Ortega y col., 2007a).

Los preparados de inmunohistoquímica para GR se evaluaron de acuerdo a lo descripto por Salvetti y col., (2012). En este caso, usando la herramienta de segmentación de colores, se midió el área total positivamente coloreada con DAB (producto de reacción marrón moderado/intenso (para diferenciarlo del color de fondo)) y se expresó como el porcentaje del área total de núcleos (producto de reacción marrón + color azul de la hematoxilina). Este procedimiento se realizó para cada una de las capas foliculares.

Las placas obtenidas del revelado por quimioluminiscencia fueron escaneadas con un escáner de oficina (HP Officejet J5700) con alta resolución (600 dpi) y formato tiff. El análisis de estas imágenes (mediante el programa Image Pro-Plus 3.0) se realizó normalizando los valores de densidad óptica integrada (DOI) de cada banda obtenida para cada 11BHS en relación a la inmunomarcación observada para la proteína normalizadora (β -actina) en esa misma placa. Esos valores fueron los empleados para el análisis estadístico posterior y determinación de las diferencias significativas.

Las imágenes de los geles de agarosa fueron digitalizados usando una cámara digital (Olympus) y los productos de PCR de punto final analizados usando el programa Image Pro-Plus 3.1 (MediaCybernetic, Bethesda, MD, USA). Para estas evaluaciones, los ARNm de GAPDH se seleccionaron como control interno, siendo la expresión del ARNm de GAPDH constante en todos los tejidos evaluados. En un análisis comparativo de PCR, los valores de densidad óptica absoluta (DO) para cada producto de PCR de punto final se obtuvieron por densitometría y se normalizaron con los niveles de GAPDH, mientras que los niveles relativos de los ARNm específicos fueron expresados como unidades arbitrarias.

3.7 Evaluación estadística

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 15.0.1 para Windows. Las concentraciones séricas de los esteroides en animales controles y tratados con ACTH durante el protocolo experimental fueron analizadas por ANOVA multivariante para determinar los efectos tiempo y tratamiento y la interacción tiempo por tratamiento. Para los datos de las técnicas de inmunohistoquímicas y de los niveles hormonales en líquido folicular y plasma se realizó un análisis de la varianza de los datos aplicando pruebas paramétricas para varios grupos (ANOVA), y como post-test se aplicó el

3. Materiales y Métodos

test de Duncan. La expresión proteica y los niveles hormonales en el medio de cultivo entre tejidos controles y tratados con ACTH fueron comparados usando la prueba t de Student de dos colas. Para todos los análisis estadísticos, $p < 0,05$ se consideró significativo. Los valores se expresaron como el promedio \pm el error típico de la media (SEM).

4. Resultados



4.1 Resultados de procedimientos realizados con animales

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

Durante el periodo comprendido entre el 11 de febrero de 2010 y el 08 de marzo de 2012 se identificaron 78 casos de quistes foliculares ováricos, de los cuales se obtuvieron 68 muestras de líquido folicular mediante aspiración guiada por ecografía y 10 muestras de ovarios mediante ovariectomía bilateral (Figura 19). También se tomaron muestras de sangre a todas las vacas consideradas como “caso” (con COD espontánea) así como de sus respectivos controles. Fueron considerados controles aquellas vacas que, comparadas con el caso, tenían el mismo número de lactancias, la misma edad, se encontraban en el mismo momento de la lactancia (días en lactancia) y en el mismo lote, es decir, bajo las mismas condiciones ambientales y de alimentación. Además, se recabó información a través de una completa anamnesis, que incluyó: edad, número de lactancias, padre, madre, producción de leche, fecha del último parto, producción de la lactancia anterior, fecha del último celo, condición corporal, patologías, fecha de diagnóstico del quiste, época del año, intervalo parto-diagnóstico, hallazgos a la ecografía, tratamiento, respuesta al tratamiento y relación Energía/Proteína de la dieta.

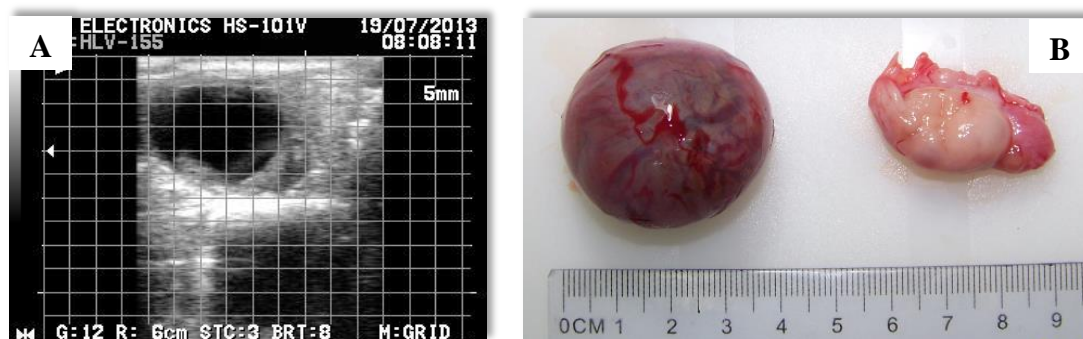


Figura 19: (A) Imagen ecográfica de un quiste espontáneo en el momento de la aspiración folicular guiada por ecografía. (B) Ovarios de una vaca con COD espontánea obtenidos mediante ovariectomía bilateral.

En cuanto al diagnóstico ecográfico y la morfología folicular (Figura 20), los quistes espontáneos presentaron un diámetro promedio de 25.8 ± 3.6 mm, con una morfología compatible a la descrita en la bibliografía (Silvia y col., 2002; Wiltbank y col., 2002;

Bartolomé y col., 2005; Vanholder y col., 2006). En este último aspecto, todas las vacas diagnosticadas con COD espontánea presentaban folículos únicos o múltiples, pared folicular con menos de 3 mm de espesor, ausencia de CL y falta de tono uterino.

Microscópicamente también fueron observados folículos en diferentes estadios de desarrollo incluyendo folículos primarios, secundarios, terciarios y atresicos y, en todos los casos, ausencia de tejido luteal activo. Las capas granulosa y teca de estos folículos presentaron células aparentemente sanas, sin procesos degenerativos.

Cabe aclarar que las evaluaciones histológicas e inmunohistoquímicas se realizaron solamente en los folículos quísticos que presentaban células de la granulosa.

4.1.2. Inducción de la enfermedad quística ovárica

Las determinaciones hormonales y la caracterización morfológica de los ovarios provenientes del modelo experimental, fueron presentadas en una tesis anterior (Salveti, 2010) y corroboraron lo descripto en la bibliografía.

El éxito de la inducción de COD en el modelo experimental basado en el tratamiento de los animales con ACTH fue confirmado por observación de la morfología ovárica y la cuantificación de las concentraciones hormonales. Se logró la inducción de los quistes foliculares en todos los animales tratados. La detección de los quistes se inició a partir del día 32 ± 4 y el diámetro medio máximo de los quistes fue de 23.2 ± 1.9 mm, mayor al diámetro medio máximo de los folículos ovulatorios ($p < 0,05$). Por ultrasonografía, los quistes fueron observados como estructuras uniformemente anecogénicas con un espesor de pared menor a 3mm. Microscópicamente, se observaron folículos sanos en desarrollo, folículos con diferentes grados de atresia y un quiste (en uno de los ovarios) con una capa completa de células de la granulosa. Además, no se observó presencia de CL en ningún caso (Figura 20).

El monitoreo ecográfico, diario durante un ciclo estral completo en animales control, reveló una dinámica folicular normal y orientó la toma de muestras de sangre para las distintas determinaciones hormonales. Cuando se realizó la sincronización de celos de estos animales (como parte del protocolo ya descripto), el folículo ovulatorio fue detectado el día 15 y su diámetro promedio fue de $11,8 \pm 1,7$ mm al momento de la ovariectomía (día

18 aproximadamente). Histológicamente, los ovarios mostraron folículos en varios estadios del desarrollo, incluyendo folículos primarios, secundarios y terciarios, como así también folículos atrésicos y CL de ciclos estrales anteriores (Figura 20).

Por ultrasonografía, los quistes foliculares espontáneos fueron similares a los quistes inducidos con ACTH ($p > 0,1$). Microscópicamente, se observaron folículos en desarrollo sanos, folículos atrésicos y uno o dos quistes grandes con una capa completa de células de la granulosa de espesor variable. Además, no se observó presencia de CL en ningún caso (Figura 20).

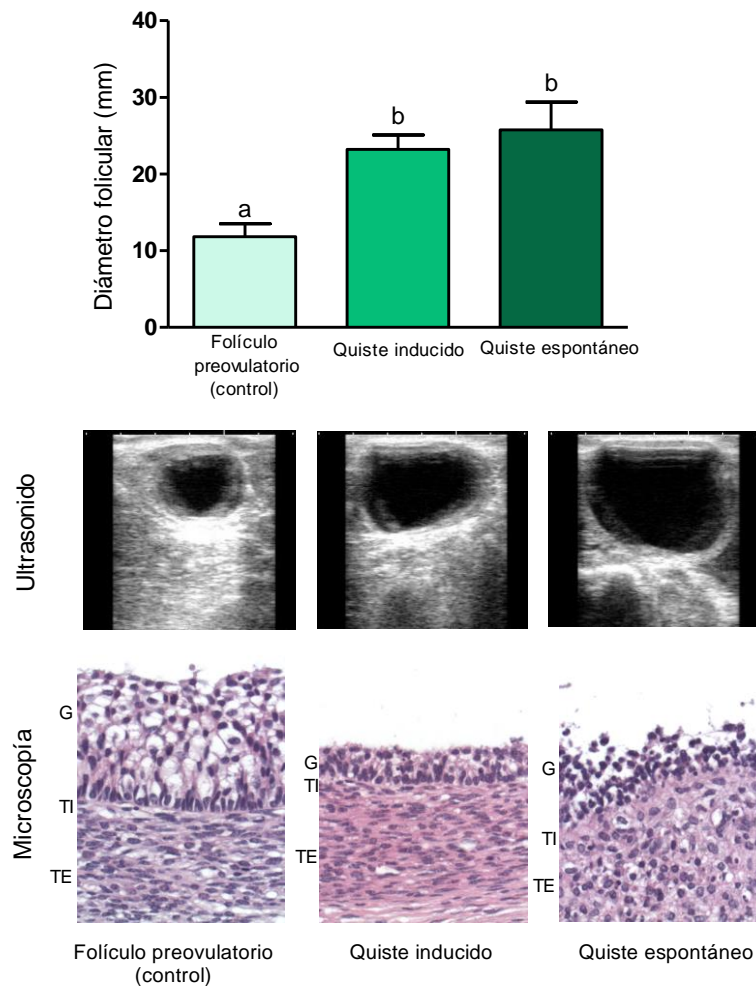


Figura 20: Características morfológicas de los folículos preovulatorios y los quistes en el momento de la ovariectomía. Se muestran las imágenes de ultrasonografía seleccionadas y las características histológicas. Los valores están representados como la media \pm SEM. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$). G: granulosa; TI: teca interna, TE: teca externa.

4.1.3 Efecto de la ACTH sobre los niveles de hormonas esteroides

Las muestras de sangre que fueron tomadas diariamente en animales controles y en animales tratados con ACTH durante el tratamiento y hasta una semana después de la finalización del mismo, revelaron un efecto significativo del tratamiento y del tiempo en todos los niveles y para todas las hormonas, y una interacción tiempo por tratamiento para estradiol, progesterona y cortisol (Figura 21).

La concentración de estradiol fue significativamente mayor en los animales tratados con ACTH durante los primeros días del tratamiento (días 15 a 18). Al comienzo del subsiguiente ciclo estral (días 23 a 28), la concentración de estradiol en los animales controles disminuyó, mientras que la de los animales tratados con ACTH continuó siendo significativamente elevada.

En los animales tratados con ACTH, la concentración de progesterona fue significativamente mayor hacia el final del tratamiento (días 17 a 20) y luego disminuyó, mientras que en los controles la concentración se incrementó significativamente desde el día 22 debido a la formación de un nuevo CL después de la ovulación.

La testosterona mostró un perfil de concentración similar en ambos grupos antes del día 27, cuando se produjo un incremento significativo en las concentraciones del grupo control.

La concentración de cortisol fue significativamente mayor durante el tratamiento con ACTH (días 15 a 21) y luego disminuyó a los valores de concentración del grupo control a partir del día 23 (Figura 21).

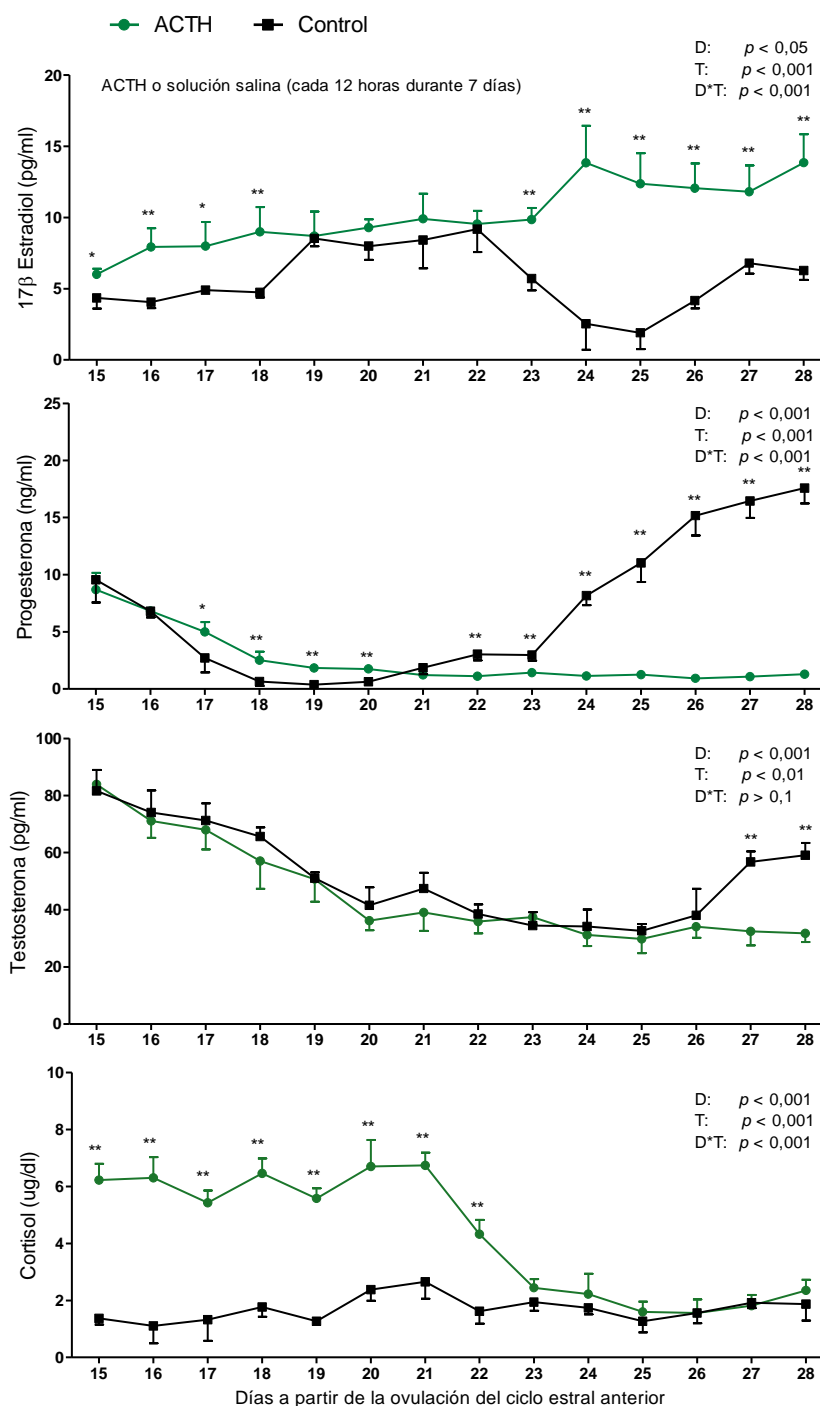


Figura 21: Concentraciones séricas de estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en animales tratados con ACTH y controles durante el protocolo experimental. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Se analizaron los datos obtenidos de muestras recolectadas durante el tratamiento con ACTH y hasta una semana después de la finalización del mismo. D: efecto de días del experimento; T: efecto del tratamiento; D*T: efecto de interacción entre días y tratamiento. Los valores con superíndices indican diferencias (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$) entre los grupos tratados y control.

4.1.4 Concentración de las hormonas esteroides en suero y líquido folicular en el momento de la ovariectomía

Las concentraciones de estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en el suero y en el líquido folicular de animales tratados con ACTH, con quistes espontáneos y animales controles, en el momento de la ovariectomía, fueron cuantificados y se muestran en la Figura 22.

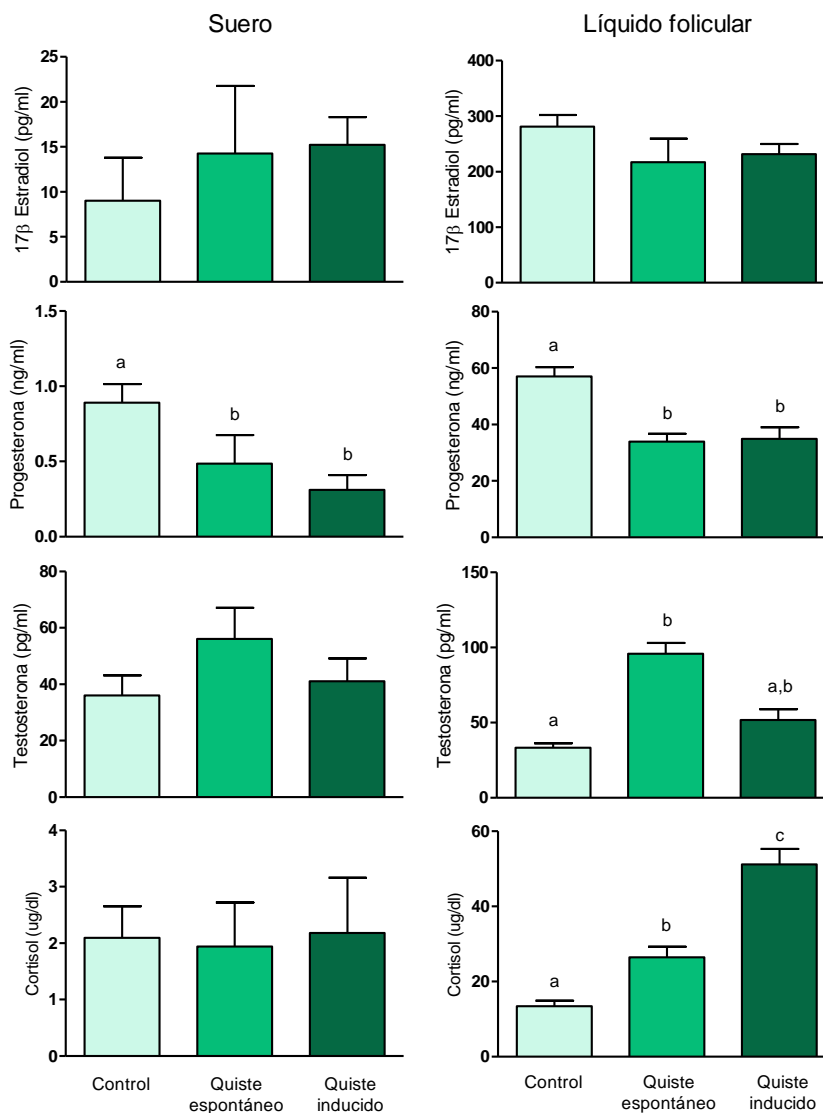


Figura 22: Concentraciones de estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en suero y líquido folicular en el momento de la ovariectomía. Las barras representan la media \pm SEM para cada hormona en el suero y en el líquido folicular. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los animales controles evidenciaron un aumento significativo en las concentraciones séricas de progesterona ($p < 0,05$), aunque siempre con valores subluteales ($< 1 \text{ ng/ml}$). Las concentraciones de estradiol y cortisol no cambiaron significativamente, mientras que las concentraciones de testosterona mostraron una tendencia a aumentar ($p = 0,06$) en el suero de los animales con quistes espontáneos.

En el líquido folicular, la concentración de estradiol fue similar en todos los grupos con una tendencia a disminuir ($p = 0,055$) en los quistes inducidos con ACTH en relación a los folículos preovulatorios controles. La concentración de progesterona fue significativamente inferior en los folículos quísticos inducidos y espontáneos en relación a los folículos preovulatorios ($p < 0,05$). La concentración de testosterona evidenció un incremento significativo en los quistes espontáneos en relación a los folículos preovulatorios ($p < 0,05$). La concentración de cortisol aumentó significativamente en los folículos quísticos inducidos y espontáneos en relación a los folículos preovulatorios ($p < 0,05$); además, la concentración de cortisol fue mayor en los folículos quísticos inducidos en relación a los espontáneos ($p < 0,05$).

4.2 Cultivo de tejidos

4.2.1 Efectos de la ACTH sobre la secreción de hormonas esteroides

Luego de tres horas de incubación con ACTH, las concentraciones basales de todas las hormonas esteroides evaluadas fueron detectadas en todas las muestras. En los folículos terciarios grandes, las concentraciones de estradiol y progesterona no se modificaron por la estimulación con ACTH. Sin embargo se evidenció un incremento significativo dosis dependiente en la secreción de testosterona y cortisol, tanto en los folículos terciarios como en los folículos quísticos ($p < 0,05$). Se observó un aumento en la concentración de testosterona en los folículos terciarios y quísticos cuando fueron estimulados con 100 nM ACTH ($p < 0,05$). La concentración de cortisol aumentó para 100 nM ACTH en los folículos terciarios y en los quistes ($p < 0,05$), observándose una tendencia a incrementar para 10 nM ACTH en los folículos terciarios ($p = 0,059$). Además, la concentración de estradiol se incrementó en los folículos quísticos para las concentraciones de 10 nM y 100 nM ACTH ($p < 0,05$). Contrariamente, la progesterona reveló una concentración baja en los folículos

quísticos en relación a los folículos terciarios en las condiciones basales ($p < 0,01$) (Figura 23).

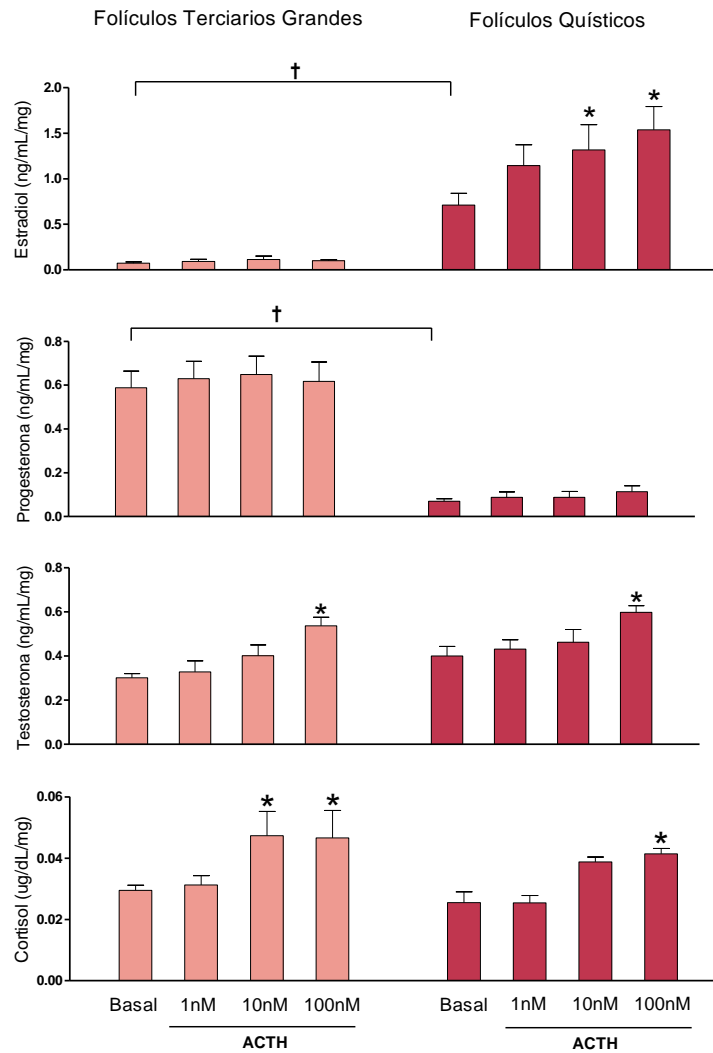


Figura 23: Efectos de la ACTH sobre la secreción de estradiol, progesterona, testosterona y cortisol sobre la pared de folículos terciarios y folículos quísticos. Las barras representan la media \pm SEM. Las diferencias relativas a la secreción basal se indican como $*p < 0,05$. Las diferencias en la secreción basal entre folículos terciarios y quísticos se indican como $\dagger p < 0,01$.

4.2.2 Efectos de la estimulación con ACTH sobre la expresión de las 11 β HSD en la pared folicular

Luego de analizar las concentraciones de hormonas secretadas al medio de cultivo por las diferentes muestras de folículos ováricos terciarios grandes y quísticos estimuladas con ACTH, los tejidos incubados con una concentración de 100nM ACTH fueron

utilizados para evaluar la expresión de la proteínas 11 β HSD1 y 11 β HSD2 mediante Western Blot.

4.2.2.1 Evaluación de la expresión proteica de 11 β HSD1 por Western Blot

Mediante Western Blot, pudieron detectarse dos bandas de la enzima 11 β HSD1, una de 34 KDa correspondiente a la forma monomérica y otra de 68 KDa correspondiente a la forma dimérica de la proteína. La forma dimérica de la 11 β HSD1 es la más relevante funcionalmente, razón por la cual la expresión de la misma fue cuantificada en las muestras de cultivo estimuladas con ACTH.

Después de tres horas de incubación, la expresión basal de la proteína 11 β HSD1 fue detectada en todas las muestras, con una mayor expresión en los quistes en relación a los folículos terciarios control ($p < 0,05$). También se evidenció un aumento significativo en la expresión de 11 β HSD1 en los folículos quísticos tratados con una concentración de 100 nM de ACTH con respecto a los folículos terciarios, con el mismo estímulo ($p < 0,05$) (Figura 24). Además, el estímulo con 100 nM de ACTH produjo el incremento de la 11 β HSD1 tanto en los folículos terciarios control como en los quistes en comparación con la condición basal ($p < 0,01$).

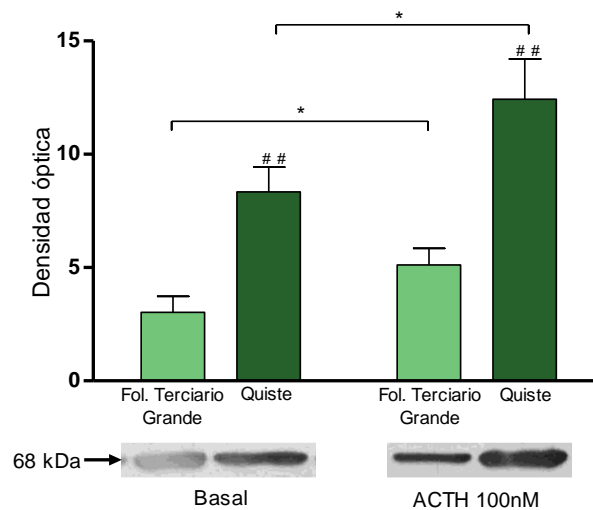


Figura 24: Efectos de la ACTH sobre la expresión de 11 β HSD1 analizada por Western Blot en la pared de folículos terciarios grandes y quísticos cultivados *in vitro*. Los valores se representan como la media \pm SEM. Las diferencias en la expresión basal y estimulada con ACTH entre folículos terciarios grandes y quísticos se indican como: ## $p < 0,01$. Las diferencias relativas a la condición basal se indican como: * $p < 0,05$.

4.2.2.2 Evaluación de la expresión proteica de 11 β HSD2 por Western Blot

Luego de tres horas de incubación, la expresión basal de 11 β HSD2 fue detectada en todas las muestras. Después de la estimulación con una concentración de 100nM de ACTH, no se observaron diferencias en la expresión de 11 β HSD2 en los folículos terciarios, mientras que se evidenció una disminución de su expresión en los folículos quísticos ($p < 0,05$) (Figura 25).

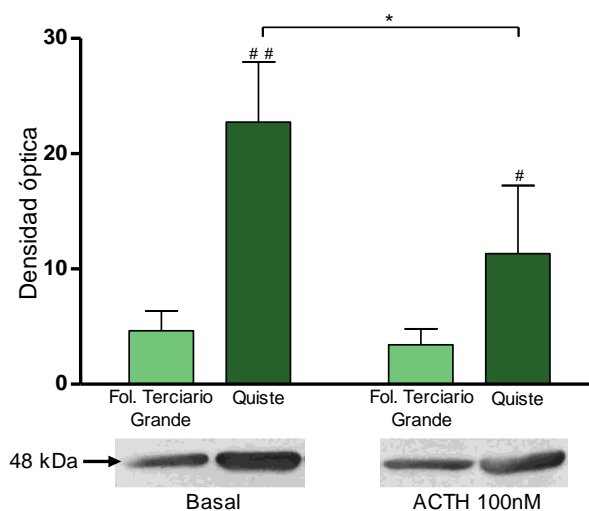


Figura 25: Efectos de la ACTH sobre la expresión de 11 β HSD2 analizada por Western Blot en la pared de folículos terciarios grandes y quísticos cultivados. Los valores se representan como la media \pm SEM. Las diferencias en la secreción basal y estimulada con ACTH entre folículos terciarios grandes y quísticos se indican como: # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$. Las diferencias relativas a la secreción basal se indican como: * $p < 0,05$.

4.3 Caracterización y evaluación de las enzimas 11 β HSD en animales controles y con COD

La evaluación de la expresión génica de las 11 β HSD fue realizada por PCR en tiempo real, en folículos terciarios pequeños, medianos y grandes controles, y también en quistes de ovarios obtenidos en la playa de faena de frigorífico. Se comparó la expresión génica de las enzimas 11 β HSD entre muestras que contenían la misma cantidad de ADNc del gen GAPDH. Además, se realizaron controles negativos, utilizando agua en lugar de ADNc, y controles positivos usando glándula adrenal como tejido control.

Todas las muestras de granulosa seleccionadas para la posterior evaluación de las 11 β HSD, fueron positivas para CYP19A1 y negativas para CYP17A1, mientras que las muestras de la teca fueron positivas para CYP17A1 y negativas para CYP19A1.

Se evaluó por Western Blot la expresión proteica de 11 β HSD1 y 11 β HSD2 en folículos terciarios pequeños, medianos y grandes controles, y en quistes de ovarios de frigorífico.

La detección por inmunohistoquímica de las diferentes isoformas de la enzima 11 β HSD fue llevada a cabo en ovarios de vacas con quistes espontáneos (obtenidos a campo) e inducidos (mediante ACTH), conjuntamente con ovarios de vacas controles. Mediante estos ensayos se evaluó la expresión de dichas proteínas a lo largo de los distintos estadios del desarrollo folicular ovárico y en las estructuras quísticas. Se analizaron las siguientes estructuras: folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos en todos los grupos y además los folículos quísticos en los animales con COD inducida y espontánea.

4.3.1 Caracterización y evaluación de la enzima 11 β HSD1

4.3.1.1 Evaluación de la expresión de la enzima 11 β HSD1 mediante PCR en tiempo real en muestras de frigorífico

Para evaluar la expresión génica de 11 β HSD1, se determinó el rango lineal de trabajo mediante la construcción de una curva estándar con diluciones seriadas de tejido control (glándula adrenal), con una eficiencia de 99.6% y un $R^2= 0.979$. Todas las muestras evaluadas como así también las diluciones seriadas utilizadas en la construcción de la curva estándar fueron analizadas por duplicado.

La expresión génica de 11 β HSD1 fue significativamente mayor en las células de la teca de los folículos quísticos respecto a los folículos terciarios pequeños ($p<0,05$) (Figura 26). Si bien 11 β HSD1 se expresó en las células de la granulosa de los folículos terciarios de ovarios controles y en folículos quísticos, las muestras analizadas expresaron este gen fuera del rango dinámico de trabajo establecido, por lo que no pudo realizarse la cuantificación relativa en esta población celular.

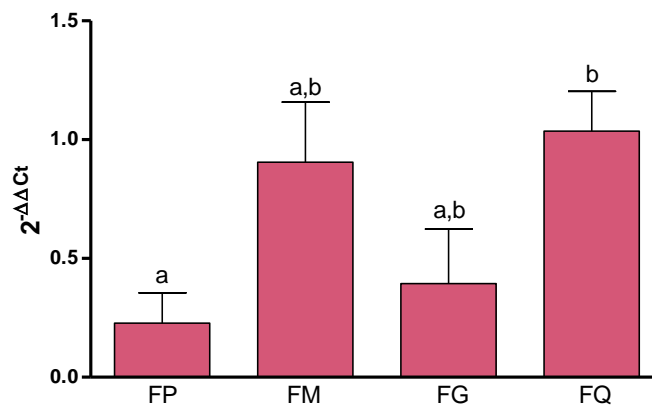


Figura 26: Cuantificación relativa del ARNm de la enzima 11βHSD1 por PCR en tiempo real en células de la teca de folículos terciarios pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles y en folículos quísticos (FQ). Los valores $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se representan como la media \pm SEM. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.3.1.2 Evaluación de la expresión de la enzima 11βHSD1 mediante Western Blot en muestras de frigorífico

El análisis de la expresión de 11βHSD1 en muestras de pared completa de folículos terciarios pequeños, medianos, grandes controles y quísticos, de ovarios provenientes de frigorífico, se muestra en la Figura 27. Pudieron detectarse tanto la forma monomérica de 34 KDa como la de 68 KDa, correspondiente a la forma dimérica. No se evidenciaron diferencias significativas en la expresión de 11βHSD1 en las distintas categorías de folículos analizadas, tanto en la forma monomérica como en la forma dimérica. La expresión de la forma dimérica de la proteína 11βHSD1 fue significativamente mayor que la expresión de la forma monomérica en todas la categorías foliculares controles y en los quistes ($p < 0,01$). La detección por Western Blot de 11βHSD1 fue llevada a cabo conjuntamente con controles positivos (glándula adrenal) y negativos (sin la adición de anticuerpo primario).

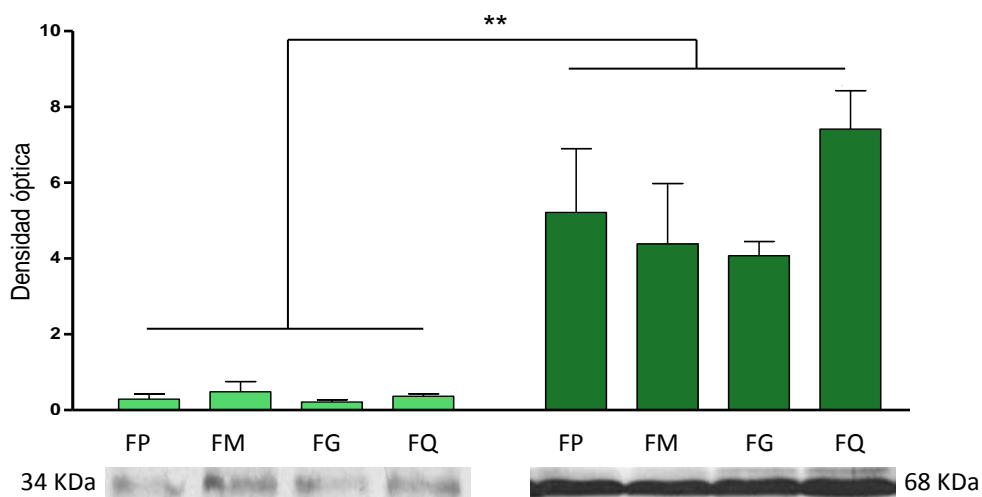


Figura 27: Expresión proteica de 11 β HSD1 en muestras de pared completa de folículos terciarios pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (FQ), de ovarios provenientes de frigorífico, mediante Western Blot. Los valores de densidad óptica están representados como la media \pm SEM. Las diferencias significativas entre la expresión del monómero (34 KDa) y el dímero de la proteína (68 KDa) en todas las categorías foliculares se indican como: ** $p < 0,01$.

4.3.1.3 Evaluación de la expresión de la enzima 11 β HSD1 mediante inmunohistoquímica indirecta

La detección por inmunohistoquímica de la 11 β HSD1 fue llevada a cabo conjuntamente con controles positivos y negativos. En todos los casos, las reacciones fueron negativas para los controles negativos y positivas en los tejidos empleados como controles positivos.

La 11 β HSD1 fue detectada en el citoplasma de todas las células ováricas estudiadas. Las células de la granulosa mostraron mayor expresión de dicha proteína en comparación con las células de la teca interna (Figura 28).

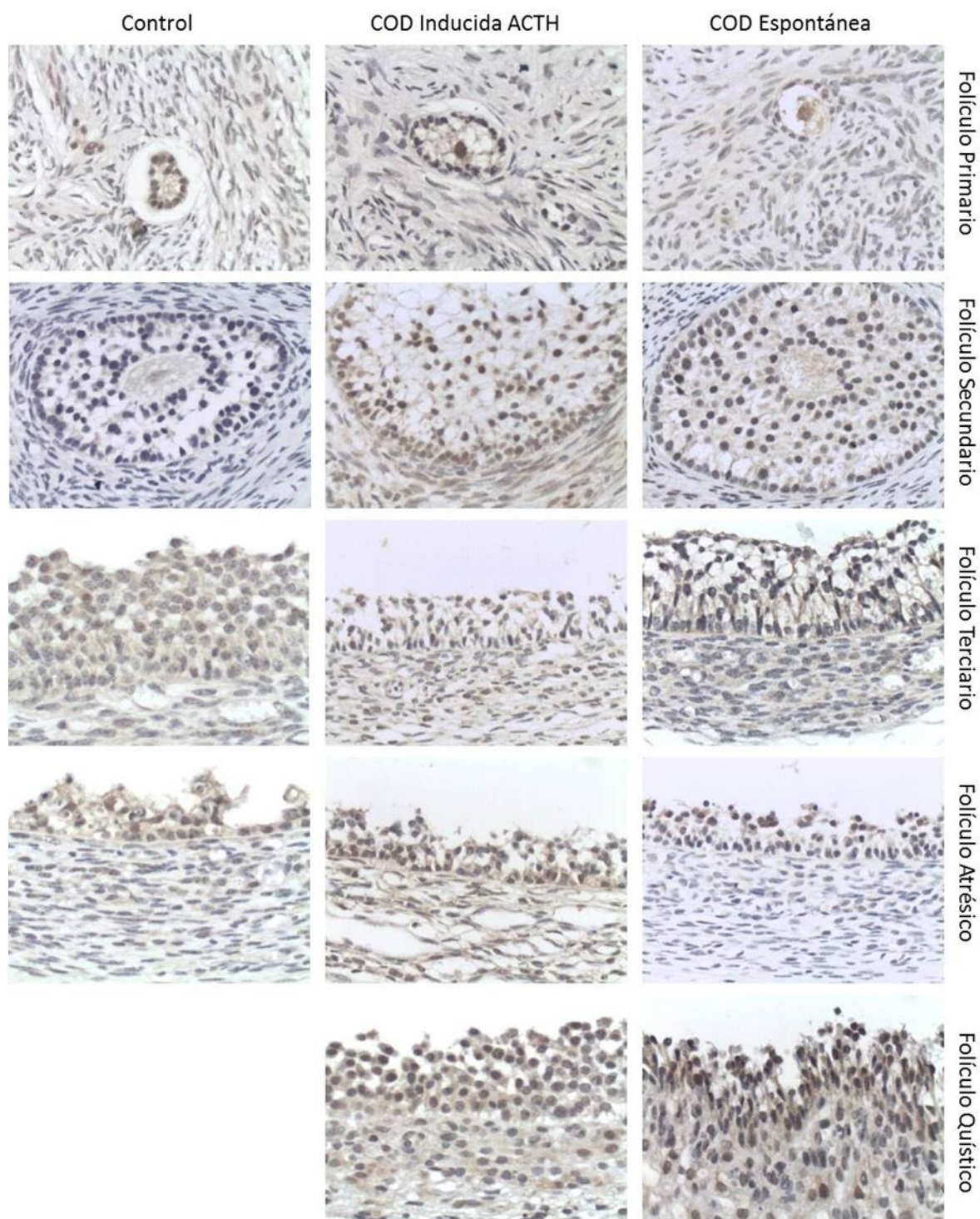


Figura 28: Imágenes representativas de la inmunomarcación de 11β HSD1 en folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos del grupo control, y en folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de los grupos con COD espontánea e inducida con ACTH. Con diaminobencidina se marcan los citoplasmas de las células de la granulosa y de la teca interna de los distintos folículos. X40.

4. Resultados

En los animales controles, se observó un incremento significativo en la expresión citoplasmática de 11β HSD1 en las células de la granulosa desde los folículos primarios a los folículos atrésicos ($p < 0,05$) (Figura 29). La inmunomarcación en las células de la teca interna no evidenció diferencias significativas en las diferentes estructuras foliculares analizadas.

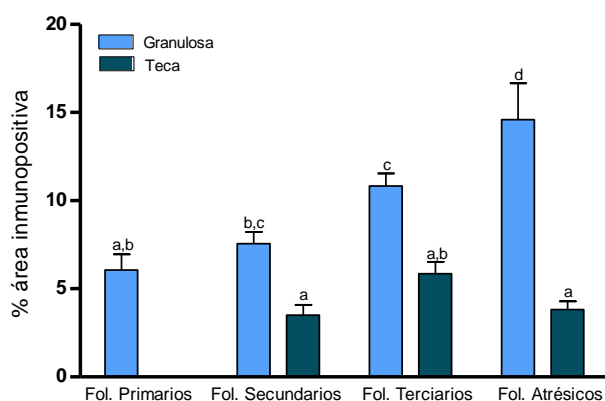
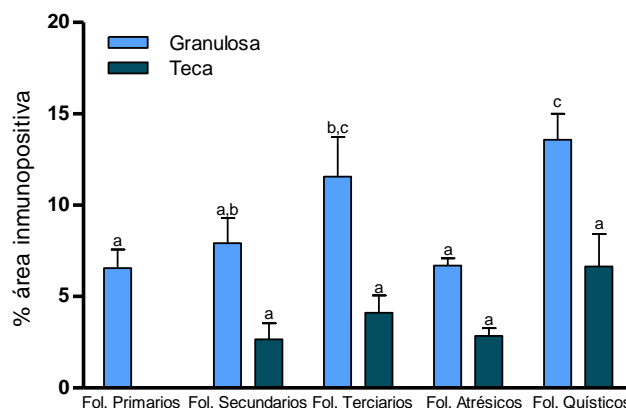


Figura 29: Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11β HSD1 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos del grupo control. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).

En los animales con COD espontánea se observó una mayor expresión de la proteína 11β HSD1 en las células de la granulosa de los folículos quísticos en relación a los folículos primarios y secundarios ($p < 0,05$). La inmunomarcación en las células de la teca interna no evidenció diferencias significativas en las diferentes estructuras foliculares analizadas. (Figura 30).

Figura 30: Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11β HSD1 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de los animales con COD espontánea. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).



En los animales con COD inducida se evidenció una mayor expresión de la proteína 11 β HSD1 en las células de la granulosa de los folículos terciarios y quísticos en relación a las demás categorías foliculares ($p < 0,05$). La inmunomarcación en las células de la teca interna no evidenció diferencias significativas en las diferentes estructuras foliculares analizadas. (Figura 31).

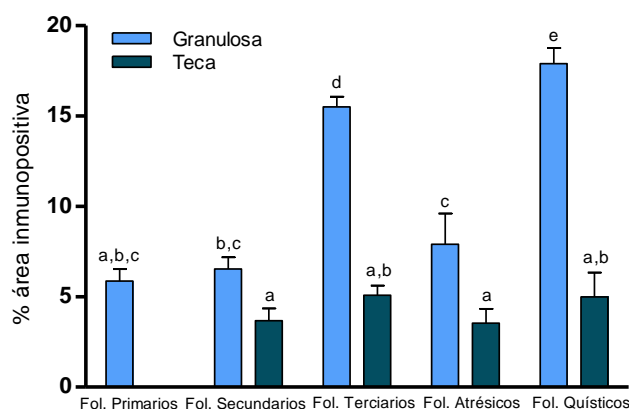


Figura 31: Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11 β HSD1 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de los animales con COD inducida. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).

En los folículos de animales con COD inducida y con COD espontánea, sólo se observaron diferencias en la expresión de 11 β HSD1 en las células de la granulosa. La inmunomarcación de 11 β HSD1 fue mayor en las células de la granulosa de folículos terciarios y quísticos de animales con COD inducida con ACTH con respecto a los folículos terciarios de animales controles ($p < 0,05$). En los animales con quistes espontáneos, la expresión de 11 β HSD1 en los folículos quísticos fue significativamente mayor que en los folículos terciarios controles ($p < 0,05$). La expresión de 11 β HSD1 disminuyó en los folículos atrésicos de animales con COD inducida con ACTH y con COD espontánea en relación a los folículos atrésicos de animales controles ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de 11 β HSD1 en las células de la teca interna entre las diferentes categorías de folículos analizados (Figura 32).

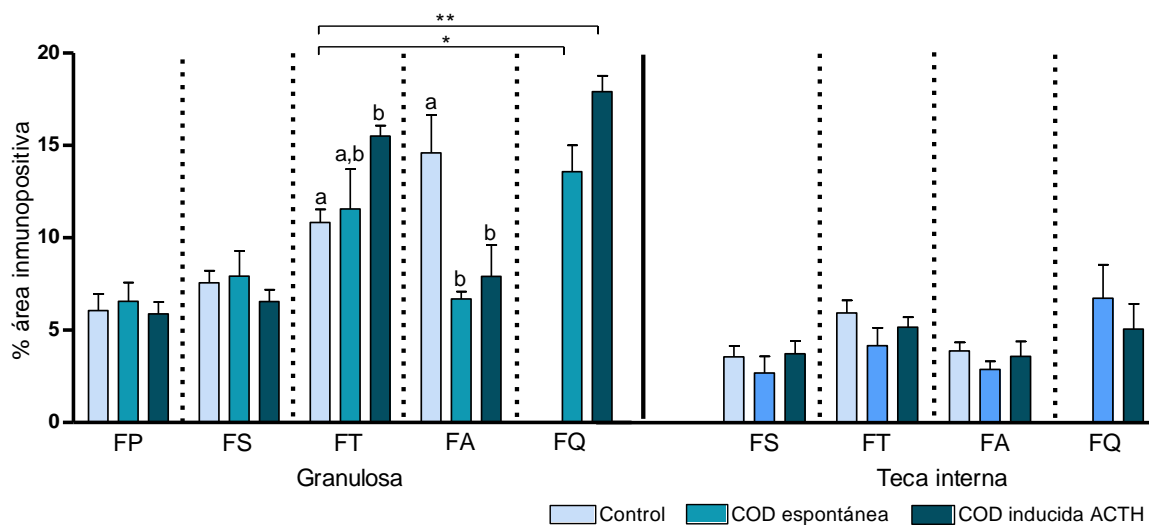


Figura 32: Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11β HSD1 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y atrésicos (FA) del grupo control, y además en folículos quísticos (FQ) de animales con COD espontánea e inducida con ACTH. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras entre cada categoría folicular tienen diferencias significativas ($p < 0,05$). Las diferencias relativas de la expresión en folículos quísticos con relación a la expresión en los folículos terciarios controles se indican como: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

4.3.2 Caracterización y evaluación de la enzima 11β HSD2

4.3.2.1 Evaluación de la expresión de la enzima 11β HSD2 mediante PCR en tiempo real en muestras de frigorífico

Para evaluar la expresión génica de 11β HSD2, se determinó el rango lineal de trabajo mediante la construcción de una curva estándar con diluciones seriadas de tejido control (glándula adrenal), obteniéndose una eficiencia del 104% y un $R^2 = 0,994$. Todas las muestras evaluadas como así también las diluciones seriadas utilizadas en la construcción de la curva estándar fueron ensayadas por duplicado.

Si bien 11β HSD2 se expresó en las células de la granulosa y de la teca de los folículos terciarios de ovarios controles y en folículos quísticos, las muestras analizadas expresaron este gen fuera del rango dinámico de trabajo establecido, con una concentración menor a 1120 ng/ml, por lo que no pudo realizarse la cuantificación relativa de la enzima. La pureza de los productos fue confirmada mediante una curva de disociación, para la que se obtuvo una temperatura de disociación específica de producto de $90,06^\circ\text{C}$.

4.3.2.2 Evaluación de la expresión de la enzima 11 β HSD2 mediante Western Blot en muestras de frigorífico

El análisis de la expresión de la proteína 11 β HSD2 en muestras de pared completa de folículos terciarios pequeños, medianos y grandes controles, y de quistes, de ovarios provenientes de frigorífico, se muestra en la Figura 33. Se detectó una banda de 48 KDa correspondiente a la proteína 11 β HSD2. No fueron evidenciadas diferencias significativas entre las diferentes estructuras foliculares analizadas ($p > 0,05$).

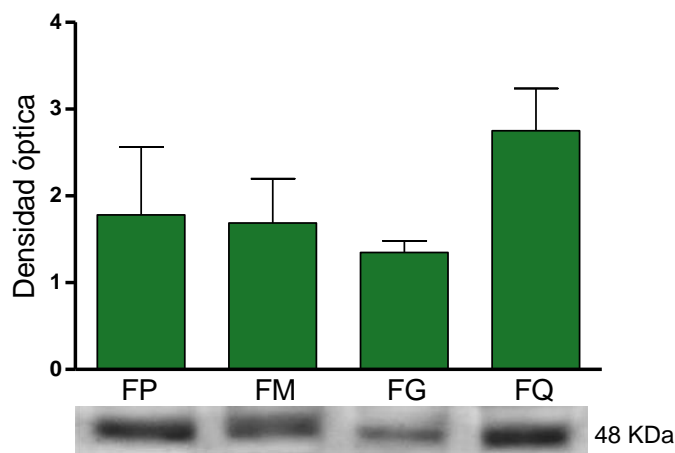


Figura 33: Expresión de 11 β HSD2 en muestras de pared completa de folículos terciarios pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (FQ), de ovarios provenientes de frigorífico, por Western Blot. Los valores de densidad óptica están representados como la media \pm SEM.

4.3.2.3 Evaluación de la expresión de la enzima 11 β HSD2 mediante inmunohistoquímica indirecta

La detección por inmunohistoquímica de la 11 β HSD2 fue llevada a cabo conjuntamente con controles positivos y negativos. En todos los casos, las reacciones fueron negativas para controles negativos y positivas en tejidos empleados como controles positivos.

La 11 β HSD2 fue detectada en el citoplasma de todas las células ováricas estudiadas. Las células de la granulosa mostraron mayor expresión de la proteína en comparación con las células de la teca interna (Figura 34).

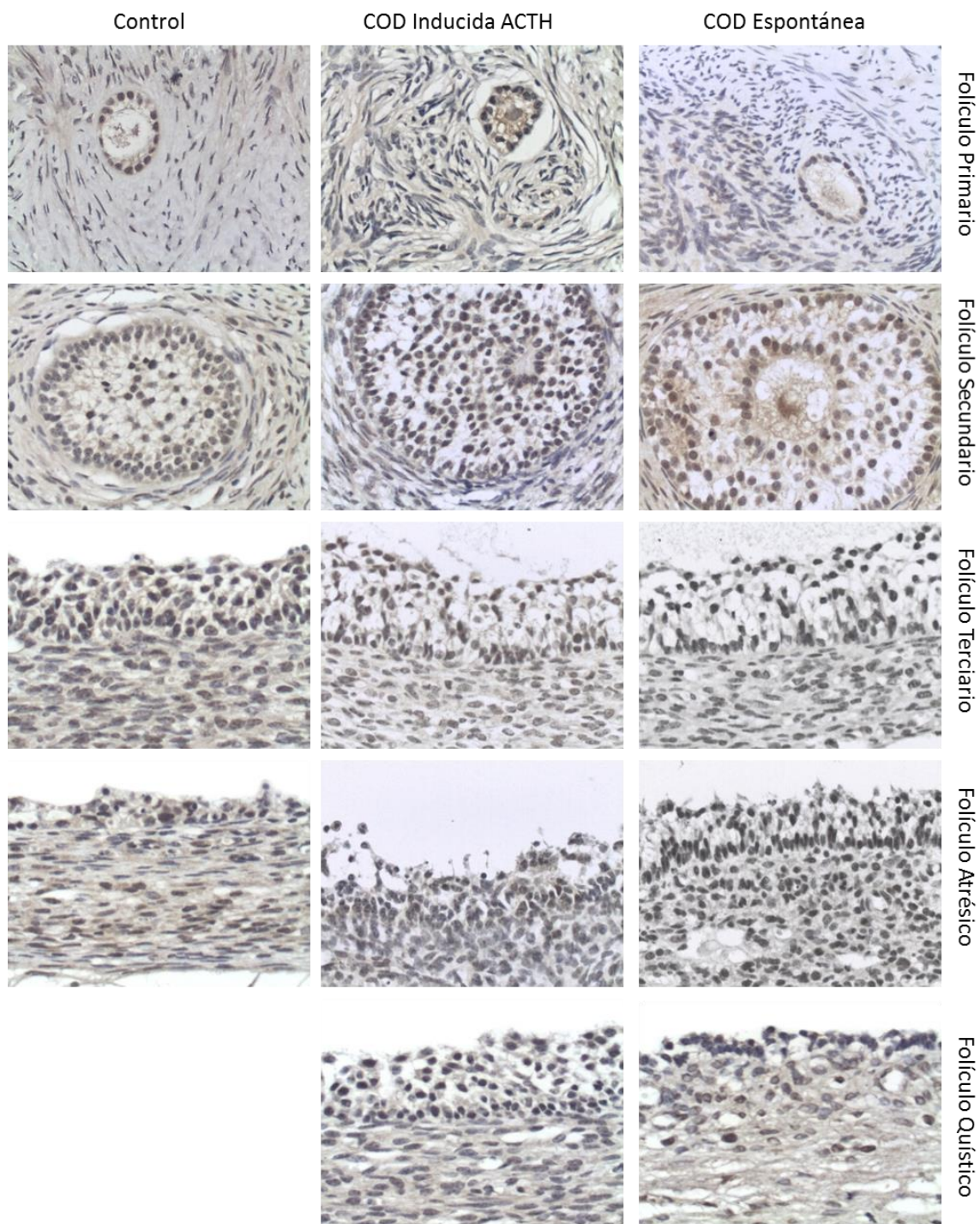


Figura 34: Imágenes representativas de la inmunomarcación de 11β HSD2 en folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos del grupo control, y en folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de los grupos con COD espontánea e inducida con ACTH. Con diaminobencidina se marcan los citoplasmas de las células de la granulosa y la teca interna de los distintos folículos. X40.

La expresión de 11β HSD2 fue más baja en las células de la granulosa de los folículos primarios en relación a los folículos secundarios, terciarios y atrésicos del grupo control ($p < 0,05$). El nivel de inmunomarcación de 11β HSD2 fue menor en las células de la teca interna en comparación con las células de la granulosa ($p < 0,05$). La expresión de 11β HSD2 fue menor en los folículos secundarios en relación a los folículos terciarios y atrésicos en las células de la teca interna (Figura 35).

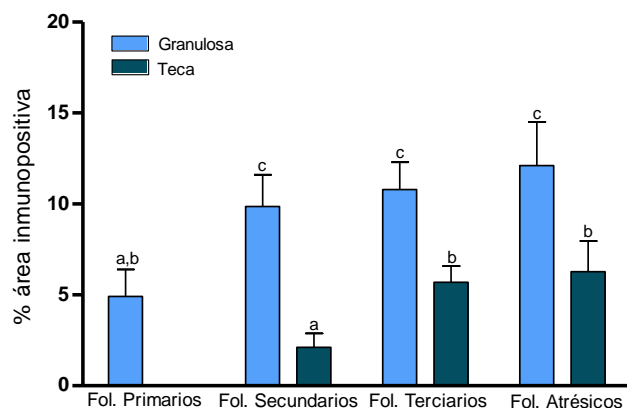
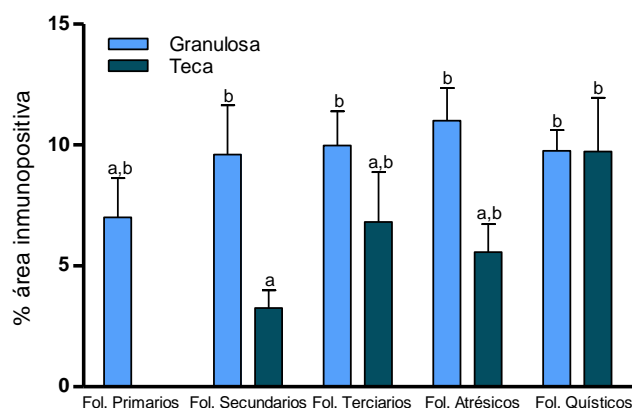


Figura 35: Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11β HSD2 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos del grupo control. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).

En los animales con COD espontánea la proteína 11β HSD2 no evidenció cambios en su expresión en las células de la granulosa de los diferentes folículos ováricos analizados. En las células de la teca interna la expresión proteica de 11β HSD2 fue mayor en los folículos quísticos en relación a los folículos secundarios ($p < 0,05$) (Figura 36).

Figura 36: Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11β HSD2 en células de la granulosa y la teca interna de folículos ováricos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de animales con COD espontánea. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).



En los animales con COD inducida con ACTH, la expresión de 11β HSD2 en las células de la granulosa fue mayor en los folículos terciarios y atrésicos que en los folículos primarios ($p < 0,05$). En las células de la teca interna, la proteína 11β HSD2 evidenció un aumento en su expresión en los folículos quísticos en relación a los secundarios ($p < 0,05$) (Figura 37).

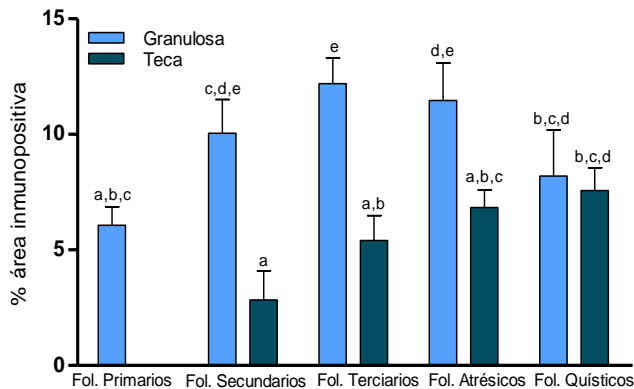


Figura 37: Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11β HSD2 en células de la granulosa y la teca interna de folículos ováricos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de animales con COD inducida con ACTH. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).

La expresión de 11β HSD2 no evidenció diferencias significativas en las diferentes categorías de folículos evaluadas entre los grupo control, animales con COD inducida con ACTH y animales con COD espontánea, en ambas poblaciones celulares (Figura 38).

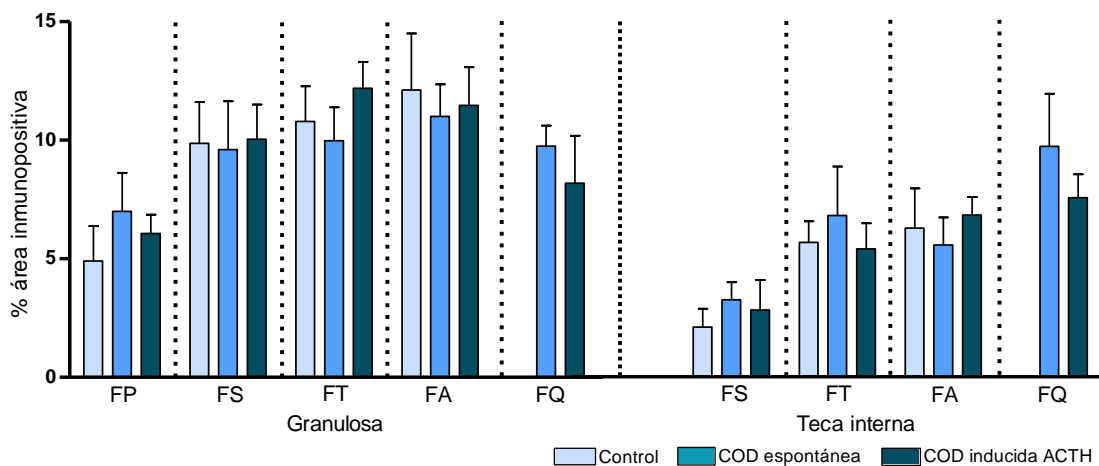


Figura 38: Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) de 11β HSD2 en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y atrésicos (FA) del grupo control, y además en folículos quísticos (FQ) de animales con COD espontánea e inducida con ACTH. Los valores están representados como la media \pm SEM.

4.4 Caracterización y evaluación del GR

4.4.1 Evaluación de la expresión del GR mediante PCR en tiempo real en muestras de frigorífico

La evaluación de la expresión génica del GR fue realizada por PCR en tiempo real, en folículos terciarios pequeños, medianos y grandes, y también en quistes de ovarios obtenidos en frigorífico. Se comparó la expresión del GR entre muestras que contenían la misma cantidad de ADNc del gen GAPDH. Además, se realizaron controles negativos, utilizando agua en lugar de ADNc, y controles positivos usando glándula adrenal como tejido control.

Todas las muestras de granulosa seleccionadas para la posterior evaluación del GR, fueron positivas para CYP19A1 y negativas para CYP17A1, mientras que las muestras de teca fueron positivas para CYP17A1 y negativas para CYP19A1.

Para evaluar la expresión génica del GR, se determinó el rango lineal de trabajo mediante la construcción de una curva estándar con diluciones seriadas de una mezcla de diferentes muestras de células de la granulosa y la teca de folículos controles y quísticos, con una eficiencia del 97% y un $R^2=0.998$. Todas las muestras evaluadas, como así también las diluciones seriadas utilizadas en la construcción de la curva estándar, fueron ensayadas por duplicado. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la expresión génica del GR en las diferentes estructuras foliculares analizadas, en ambas poblaciones celulares (Figuras 39 y 40).

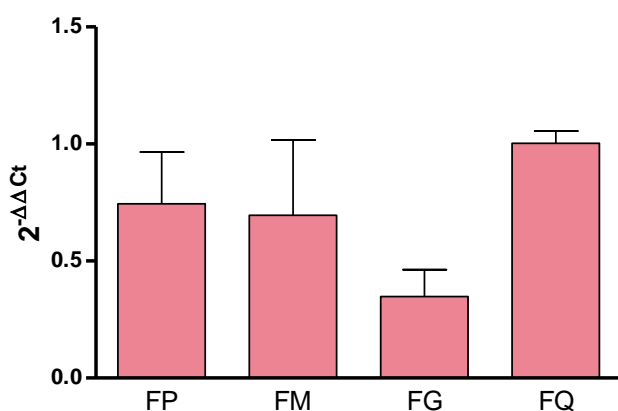
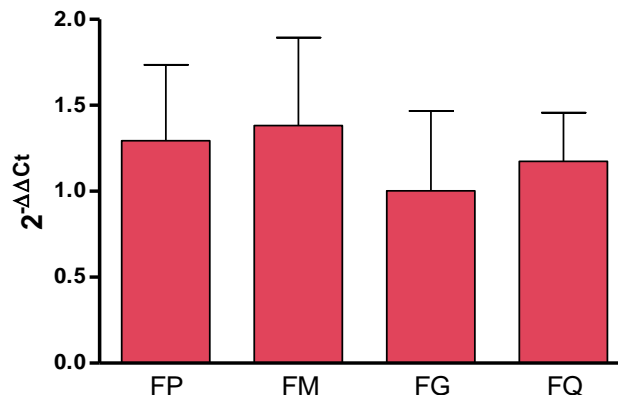


Figura 39: Cuantificación relativa del ARNm del GR por PCR en tiempo real en células de la granulosa de folículos terciarios pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles, y en folículos quísticos (FQ). Los valores $2^{-\Delta\Delta C_t}$ están representados como la media \pm SEM.

Figura 40: Cuantificación relativa del ARNm del GR por PCR en tiempo real en células de la teca de folículos terciarios pequeños (FP), medianos (FM) y grandes (FG) controles, y en folículos quísticos (FQ). Los valores $2^{-\Delta\Delta Ct}$ están representados como la media \pm SEM.



4.4.2 Evaluación de la expresión del GR mediante inmunohistoquímica indirecta

La detección por inmunohistoquímica del GR fue llevada a cabo en ovarios de vacas con quistes espontáneos (obtenidos a campo) e inducidos (mediante ACTH), conjuntamente con ovarios de vacas controles. Mediante estos ensayos se evaluó la expresión de la proteína GR a lo largo de los distintos estadios del desarrollo folicular ovárico y en las estructuras quísticas. Se analizaron las siguientes estructuras: folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos en todos los grupos, y además los folículos quísticos en los animales con COD inducida con ACTH y espontánea.

Mediante Western Blot se corroboró que el anticuerpo utilizado en la técnica de inmunohistoquímica detectara la proteína de manera específica y sin reacciones cruzadas. La proteína del GR se expresó de manera específica con los anticuerpos utilizados (Figura 41), obteniéndose una banda de 97KDa.

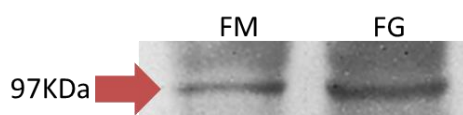


Figura 41: Placa radiográfica representativa de un Western Blot que muestra la expresión de GR en la pared de folículos terciarios medianos (FM) y grandes (FG) provenientes de material de frigorífico.

La detección por inmunohistoquímica del GR fue llevada a cabo conjuntamente con controles positivos y negativos. En todos los casos, las reacciones fueron negativas para controles negativos y positivas en tejidos empleados como controles positivos.

Se evidenció marcación para GR en el núcleo tanto de células de la granulosa como de células de la teca interna para todos los estadios foliculares estudiados (Figura 42).

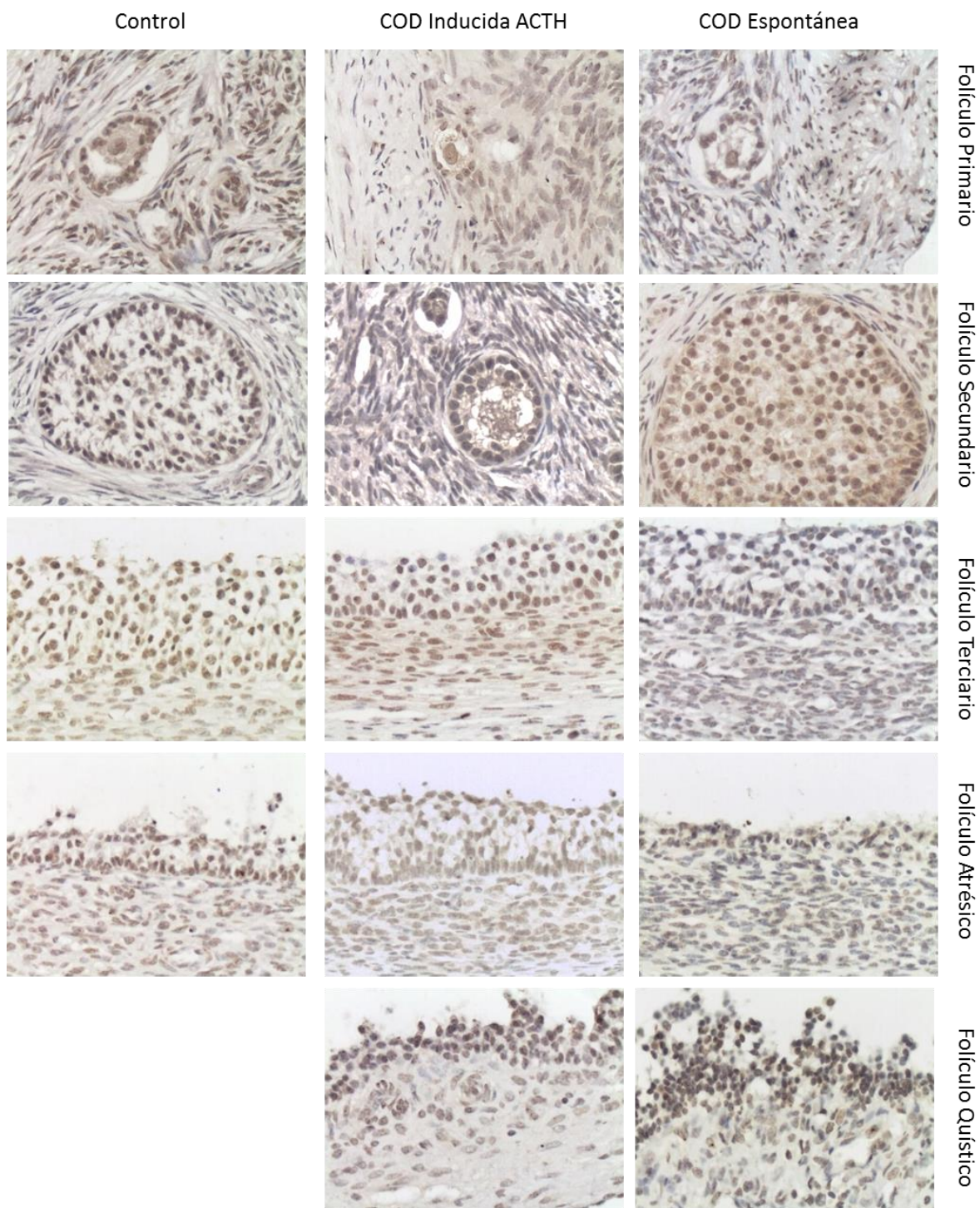


Figura 42: Imágenes representativas de la inmunomarcación del GR en folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos del grupo control, y en folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de los grupos con COD espontánea e inducida con ACTH. Con diaminobencidina se marcan los núcleos de las células de la granulosa y de la teca interna de los distintos folículos. X40.

La expresión de la proteína GR fue similar en las células de la granulosa y de la teca interna de las diferentes categorías foliculares del grupo control ($p > 0,05$). Sólo se observó una expresión mayor del GR en las células de la granulosa de los folículos atrésicos en relación a la expresión en los folículos primarios, secundarios y terciarios, y en comparación con todas las categorías foliculares en las células de la teca interna ($p < 0,05$) (Figura 43).

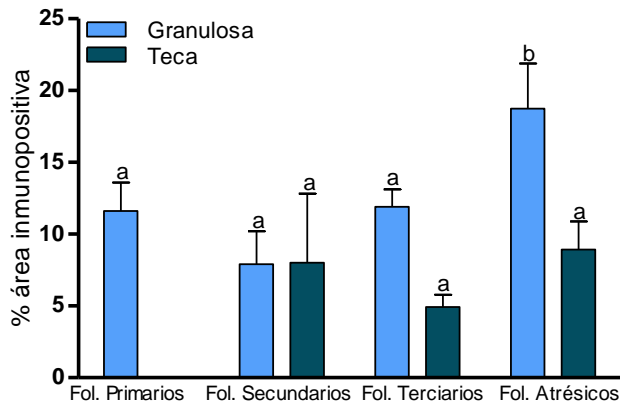
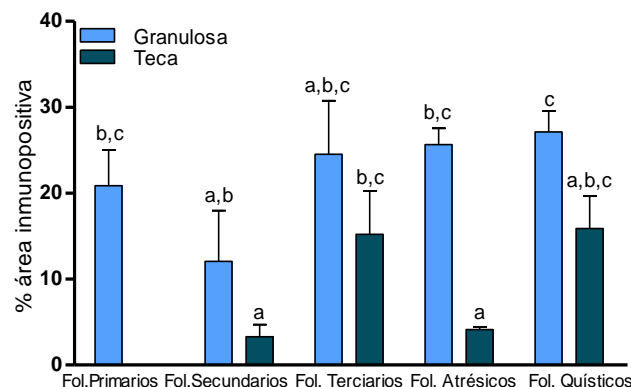


Figura 43: Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) del GR en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos de animales controles. Los valores están representados como la media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).

La expresión del GR en los ovarios de los animales con COD espontánea fue mayor en las células de la granulosa de los folículos primarios, atrésico y quistes, y en las células de la teca interna de los folículos terciarios que en las células de la teca interna de los folículos secundarios y atrésicos ($p < 0,05$) (Figura 44).

Figura 44: Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) del GR en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de animales con COD espontánea. Los valores están representados como media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).



La expresión del GR en los ovarios de los animales con COD inducida con ACTH fue mayor en las células de la granulosa de los folículos quísticos en relación a los folículos

primarios, terciarios y atrésicos ($p < 0,05$). No se observaron diferencias en la expresión del GR en las células de la teca interna de todas las categorías foliculares analizadas ($p > 0,05$) (Figura 45).

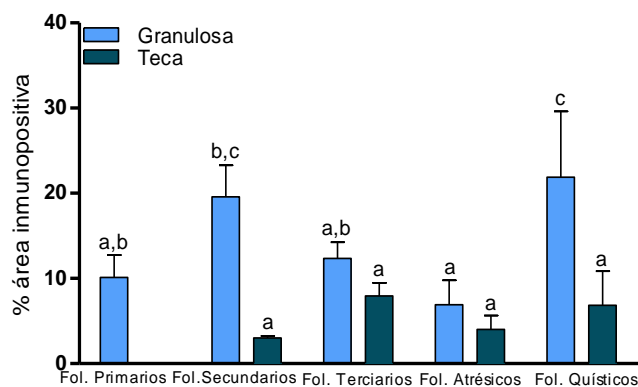


Figura 45: Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) del GR en células de la granulosa y de la teca interna de folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos de animales con COD inducida con ACTH. Los valores están representados como la media \pm SEM. Las barras con diferentes letras tienen diferencias significativas ($p < 0,05$).

La expresión del GR en las células de la granulosa fue mayor en los folículos primarios y terciarios del grupo con COD espontánea que en los mismos folículos del grupo control y con COD inducida con ACTH ($p < 0,05$). Además, se produjo un incremento en la expresión del receptor en los quistes de animales con COD espontánea ($p < 0,01$) y con COD inducida con ACTH ($p < 0,05$) en relación a los folículos terciarios del grupo control. En las células de la teca, la expresión del GR evidenció un aumento en los folículos terciarios del grupo con COD espontánea en comparación a los folículos terciarios del grupo control y con COD inducida con ACTH ($p < 0,05$). La expresión del receptor fue mayor en los quistes de los animales con COD espontánea que en los folículos terciarios del grupo control ($p < 0,01$) (Figura 46).

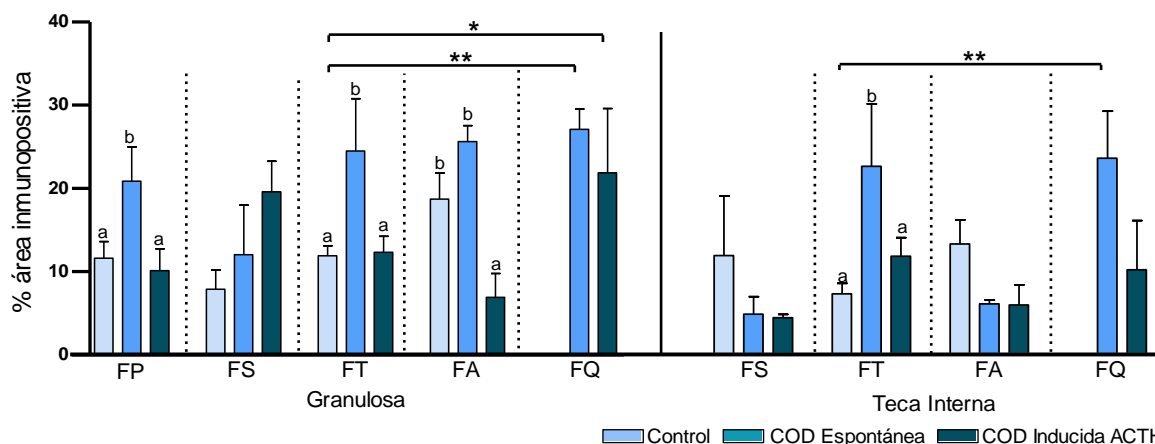


Figura 46: Expresión relativa (medida como porcentaje de área inmunopositiva) del GR en células de la granulosa y la teca interna de folículos primarios (FP), secundarios (FS), terciarios (FT) y atrésicos (FA) de ovarios controles y además en folículos quísticos (FQ) de ovarios con COD espontánea e inducida con ACTH. Los valores están representados como la media \pm SEM. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las diferencias relativas de la expresión en folículos quísticos con relación a la expresión en los folículos terciarios controles se indican como: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

4.5 Caracterización y evaluación de los MCRs

4.5.1 Evaluación de la expresión de los MCRs mediante PCR de punto final en muestras de frigorífico

Se comparó la expresión génica de los MCRs por PCR de punto final entre muestras que contienen la misma cantidad de ADNc del gen GAPDH. Además, se realizaron controles negativos, utilizando agua en lugar de ADNc, y controles de ARN, no obteniendo productos de PCR.

Todas las muestras de granulosa seleccionadas para la posterior evaluación de los MCRs, fueron positivas para CYP19A1 y negativas para CYP17A1, mientras que las muestras de la teca fueron positivas para CYP17A1 y negativas para CYP19A1.

El MC1R fue débilmente detectado en las células de la teca de folículos terciarios pequeños y medianos, y con una expresión mayor en CL ($p < 0,05$). No se evidenció la expresión del MC1R en las células de la teca de los folículos terciarios grandes, como así tampoco en las células de la granulosa y estroma (Figuras 47 y 48).

Los niveles de expresión del MC2R fueron moderados en las células de la teca de los folículos terciarios pequeños y medianos, y en CL. La expresión fue más baja en la teca

de folículos terciarios grandes y en estroma ($p < 0,05$). No fue detectado ARNm específico para MC2R en las células de la granulosa (Figuras 47 y 48).

La expresión del MC3R fue moderada en las células de la teca de los folículos terciarios pequeños, pero débil en la teca de los folículos terciarios medianos y grandes. El MC3R tuvo una baja expresión en las células de la granulosa pero una fuerte expresión en CL ($p < 0,05$) (Figuras 47 y 48).

El MC4R evidenció una expresión moderada en las células de la teca de folículos terciarios pequeños y medianos, mientras que el MC5R se expresó débilmente en las células de la teca de folículos terciarios pequeños y medianos, con una disminución en su expresión en los folículos terciarios grandes ($p < 0,05$). MC4R y MC5R no se expresaron en las células de la granulosa, CL y estroma (Figuras 47 y 48).

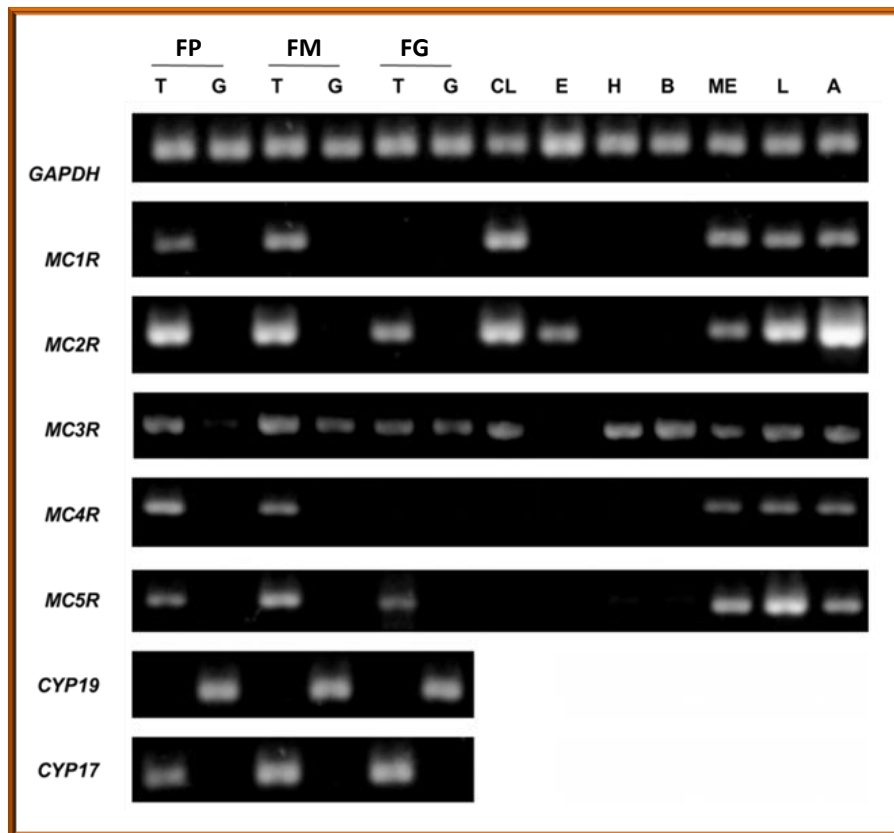


Figura 47: Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos específicos de PCR de punto final mostrando la expresión de los MCRs y genes controles en los componentes ováricos bovinos y en tejidos controles. FP: folículo pequeño; FM: folículo mediano; FG: folículo grande; G: granulosa; T: teca; CL: cuerpo lúteo; E: estroma; H: hígado; B: bazo; ME: médula espinal; L: linfocitos; A: adrenal.

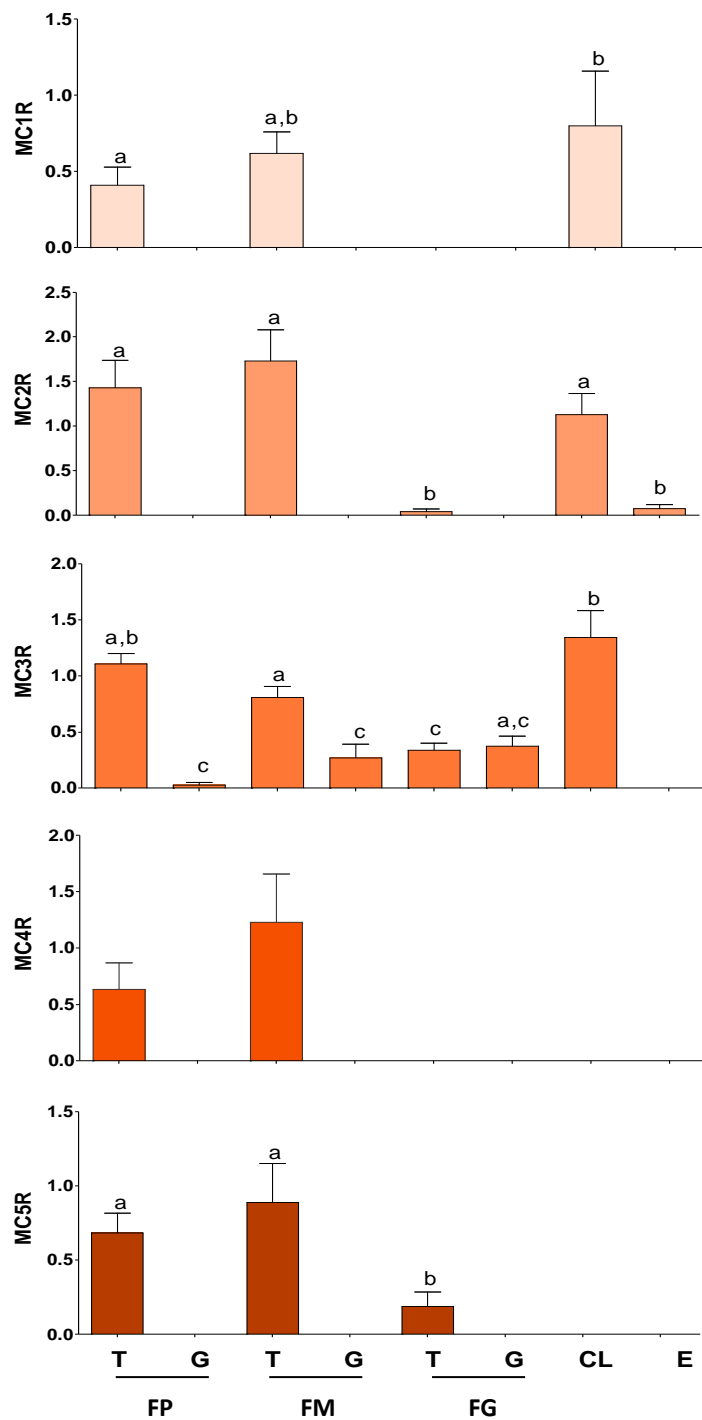


Figura 48: Expresión relativa de los receptores de melanocortinas (ARNm MCRs/ ARNm GAPDH) en las diferentes estructuras ováricas bovinas y en tejidos control. FP: folículo pequeño; FM: folículo mediano; FG: folículo grande; G: granulosa; T: teca; CL: cuerpo lúteo; E: estroma. Los valores están representados como la media \pm SEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los diferentes MCRs fueron evaluados en varios órganos y tejidos bovinos para corroborar la especificidad de los juegos de cebadores (Tabla 7 y Figura 47). En bazo, sólo se observó una expresión moderada del MC3R, mientras que en hígado, se evidenciaron una fuerte expresión del MC3R y baja expresión del MC5R. En la médula espinal, la expresión de todos los MCRs fue débilmente detectada. En los linfocitos, MC1R, MC2R y MC3R se expresaron moderadamente, mientras que MC4R y MC5R tuvieron una baja expresión. En la corteza adrenal, se evidenció una alta expresión del MC2R, una moderada expresión del MC1R y MC3R, y una baja expresión del MC4R y MC5R.

Tejido control	MC1R	MC2R	MC3R	MC4R	MC5R
Hígado	-	-	+	-	+
Bazo	-	-	+	-	-
Médula espinal	+	+	+	+	+
Linfocitos	+	+	+	+	+
Corteza adrenal	+	+	+	+	+

Tabla 7: Tejidos controles utilizados para analizar la expresión de los ARNm de los MCRs en diferentes tejidos bovinos.

4.5.2 Evaluación de la expresión del MC2R mediante PCR en tiempo real en muestras de frigorífico

Para evaluar la expresión génica del MC2R, se determinó el rango lineal de trabajo mediante la construcción de una curva estándar con diluciones seriadas de tejido control (glándula adrenal), obteniéndose una eficiencia del 107% y un $R^2=0.997$. Todas las muestras evaluadas como así también las diluciones seriadas utilizadas en la construcción de la curva estándar se ensayaron por duplicado. Además, se incluyeron controles positivos y negativos.

Si bien MC2R se expresó en las células de la granulosa y de la teca de los folículos terciarios de los ovarios controles y en folículos quísticos, las muestras analizadas

4. Resultados

expresaron este gen fuera del rango dinámico de trabajo establecido con una concentración menor a 562.5 ng/ml, por lo que no pudo realizarse la cuantificación relativa del receptor. La pureza de los productos fue confirmada mediante una curva de disociación, obteniéndose una temperatura de disociación específica de producto de 86.04 °C.

5. Discusión

5.1 Inducción experimental de la enfermedad quística ovárica y relación con los hallazgos en la enfermedad que se presenta de manera espontánea en bovinos

La formación de quistes foliculares y los signos asociados a ellos son algunos de los mayores problemas que afectan la fertilidad del ganado lechero. Sin embargo, la principal dificultad para estudiar la COD en bovinos se debe a que la formación de los quistes no puede ser analizada retrospectivamente, sino sólo después que el folículo ha sido objeto de extensos cambios morfológicos y fisiológicos debido al momento en que se hace el diagnóstico (Roth y col., 2012). Generalmente es aceptado que los quistes se desarrollan a partir de folículos preovulatorios que fallan en la ovulación, persisten en el ovario y por lo tanto interfieren con la funcionalidad ovárica normal (Vanholder y col., 2006). Varios estudios han demostrado que el desarrollo de los folículos quísticos está asociado con un desbalance en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Cook y col., 1990; Gümen y col., 2002; Silvia y col., 2002; Hatler y col., 2003).

Los quistes foliculares han sido inducidos en bovinos por una variedad de tratamientos que han llevado al desarrollo de diversos modelos experimentales. Tales tratamientos incluyen la administración de estrógenos exógenos (Wiltbank, 1966; Nadaraja y Hansel, 1976; Carrie're y col., 1995), combinaciones de progesterona y estradiol (Erb y col., 1973; Winters y col., 1986; Cook y col., 1991; Hamilton y col., 1995), antisuero contra LH bovino (Nadaraja y Hansel, 1976), testosterona (Fathala y col., 1978) o ACTH exógena (Liptrap y Mc Nally, 1976; Refsal y col., 1987; Kawate y col., 1996).

En base a estos estudios, se seleccionó el modelo más apropiado para el estudio del estrés como factor determinante en esta enfermedad. Se caracterizó el entorno endocrino y la dinámica folicular, y se realizó el seguimiento del desarrollo de los folículos quísticos inducidos por la administración de ACTH en bovinos. Si bien este modelo experimental ha sido parcialmente estudiado (Dobson y col., 2000), no habían sido publicados hasta el momento datos sobre las concentraciones intrafoliculares de los esteroides y las características morfológicas de los quistes (Amweg y col., 2013).

El tratamiento con ACTH ocasionó cambios en las concentraciones séricas de las hormonas esteroides. Las concentraciones de estradiol, progesterona y cortisol aumentaron durante el tratamiento con ACTH, comparadas con las concentraciones séricas del grupo

control. Por su parte, la concentración de testosterona no mostró cambios durante el tratamiento en relación a las concentraciones encontradas en animales controles. Luego de finalizado el tratamiento, la concentración de estradiol permaneció incrementada, mientras que la concentración de progesterona no aumentó como ocurrió en los controles. Estos resultados pueden reflejar la persistencia folicular y el bloqueo de la luteinización, respectivamente. Esto es consistente con los resultados de Dobson y col. (2000), quienes describieron que el estradiol permanece aumentado hasta el día 30 aproximadamente, y propusieron que esta hormona, junto con la inhibina (pero no con ACTH, cortisol o progesterona), ejerce una fuerte retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH (Baird y col., 1991), lo que impide que se inicie una nueva onda de crecimiento folicular. Sin embargo, estos autores no analizaron la concentración de testosterona. Dicha hormona aumentó en el grupo control hacia el final del experimento (días 26 a 28), lo que presumiblemente se deba a uno o varios de los folículos de la primera onda de crecimiento folicular post-ovulación, que para esos días (alrededor del día 6-7 del nuevo ciclo estral a partir de la ovulación) tienen la capacidad de producir andrógenos en la teca que luego serán aromatizados en la granulosa.

En el final del experimento, más precisamente en el momento de la ovariectomía, se encontró una clara asociación entre las concentraciones séricas e intrafoliculares de estradiol y progesterona en los folículos preovulatorios, y en los quistes espontáneos e inducidos con ACTH. Sin embargo, la concentración de cortisol en el líquido folicular fue mayor en los quistes que en los controles. Además, la concentración de cortisol en el líquido folicular fue aún mayor en los animales tratados con ACTH comparado con los quistes espontáneos, lo que nos permite inferir sobre la existencia de un mecanismo que regula la concentración intrafolicular de cortisol y una acción directa de la ACTH sobre los folículos ováricos. En este sentido, no se han detectado alteraciones en la función adrenal o en la concentración sérica de cortisol en vacas con ciclos normales y vacas con quistes ováricos (Silvia y col., 2005), en concordancia con nuestros resultados. Sólo se observaron diferencias en la concentración sérica de cortisol durante el tratamiento, pero no en el momento de la formación del quiste. De este modo, no se encontraron evidencias de que las vacas ciclando y las vacas con quistes difieran en su función adrenal. Debido a que los GC

son sintetizados sólo en la corteza adrenal y son sistemáticamente liberados a todo el cuerpo, la presencia de un camino enzimático local que pueda activarlos/inactivarlos es fundamental (Krozowski y col., 1999; Tetsuka y col., 2003).

En cuanto a las implicaciones de estos resultados en la patogénesis de la COD a nivel del ovario, este estudio ha mostrado que los ovarios con quistes están expuestos a una alta concentración de cortisol y tienen la capacidad de aumentar aún más estas concentraciones en respuesta a un estímulo específico. Estudios previos han permitido observar la existencia de alteraciones en la tasa de apoptosis en los folículos de vacas con quistes ováricos espontáneos e inducidos con ACTH y estos resultados apoyan la idea de que la persistencia folicular es un importante componente de la patogénesis de la COD (Isobe y Yoshimura, 2007; Salvetti y col., 2010). Un retraso en la regresión del folículo luego de la falla en ovulación es una causa alternativa de la formación de quistes, debido a que usualmente debería producirse la atresia y regresión de aquellos folículos que no están destinados a ovular. Además, se ha descrito en folículos quísticos de bovinos y ratas, cambios importantes en la diferenciación celular, la mayoría relacionados con la sobreexpresión de los componentes del citoesqueleto (Salvetti y col., 2004; Ortega y col., 2007b). En este contexto, la capacidad de los GC para inhibir la apoptosis en la granulosa (Sasson y col., 2001) puede también ser importante en la limitación de la atresia de folículos terciarios persistentes y puede incluso prevenir la apoptosis en las células de los quistes foliculares (Amsterdam y col., 2002; Sunak y col., 2007; Komiyama y col., 2008).

Por otro lado, los cambios en la concentración de testosterona intrafolicular responden claramente a las modificaciones encontradas a nivel histológico. Como fue descrito por Salvetti y col. (2010), a medida que avanza la persistencia de los folículos en el tiempo, se van perdiendo una gran cantidad de células de la granulosa y como consecuencia se altera la capacidad de producir ciertas hormonas. Dichas células son las encargadas de transformar los andrógenos provenientes de la teca interna en estrógenos, mediante un proceso de aromatización (Hafez y Hafez, 2000). Por lo tanto, es claramente comprensible que el líquido folicular de los quistes inducidos contenga mayor cantidad de testosterona que el de los folículos del grupo control debido a la mayor persistencia (10 días), y que los quistes espontáneos (cuya persistencia se especula que es mayor a la de los quistes

inducidos) presenten la mayor concentración de testosterona de todos los grupos. Además, si bien no se hallaron diferencias en las concentraciones intrafoliculares de estradiol entre los distintos grupos, se observó una tendencia a disminuir en los quistes inducidos con ACTH. Esto puede estar relacionado por un lado, con la concentración aumentada de cortisol, apoyando el hecho que los GC suprimen la actividad de CYP19A1 y disminuyen el número de LHR (Kawate y col., 1993) y por otro lado, con la actividad aromatasas disminuida como consecuencia de la pérdida de células de la granulosa en los quistes.

5.2 Efectos de la ACTH sobre la secreción de esteroides *in vitro*

La estimulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal/ovárico asociada al estrés ha sido asociada con la interrupción de la función reproductiva e involucrada a la patogénesis de COD (Moberg, 1987). El desarrollo folicular deficiente, las tasas de ovulación reducidas y la formación de quistes ováricos han sido asociados con el tratamiento con ACTH y la concentración aumentada de GC (Liptrap y McNally, 1976; Kawate y col., 1993; Liptarp, 1993; Dobson y col., 2000). La administración de ACTH a cerdas jóvenes durante la fase luteal incrementa tanto la concentración sérica como la folicular de cortisol (Montgomery y col., 1997), sin interrumpir la secreción de gonadotropinas (Frautschy y Liptrap, 1988). Acosta y col. (2005) reportaron un incremento temporal en la concentración folicular de cortisol alrededor del momento en que se produce el pico preovulatorio de LH en bovinos, y que si bien la concentración de GC activos disminuyó durante el desarrollo folicular y la maduración, estos se incrementaron durante el proceso de ovulación desencadenada por el pico de LH, sugiriendo un rol funcional para la ACTH en la estimulación de la secreción ovárica de cortisol.

Cuando se analizó la secreción de hormonas esteroides *in vitro*, en la pared de los folículos terciarios grandes (>10 mm) y quistes estimulados con ACTH, la secreción basal de estradiol y testosterona fue más baja en los folículos terciarios grandes que en los folículos quísticos. En contraste, la secreción basal de progesterona fue mayor en los folículos terciarios que en los folículos quísticos. Estos resultados se condicen con los obtenidos de la evaluación del líquido folicular de los folículos terciarios preovulatorios y quistes inducidos con ACTH, obtenidos por ovariectomía una vez finalizado el

experimento. Sin embargo, la estimulación con ACTH tuvo un efecto positivo sobre la secreción de estradiol por la pared folicular del quiste y también un efecto estimulante sobre la secreción de testosterona y cortisol en la pared de los folículos terciarios y quísticos. Estos resultados demuestran que la ACTH es capaz de inducir la secreción de esteroides en el ovario tanto *in vitro* como *in vivo*, indicando que la misma puede estar implicada en mecanismos reguladores relacionados a las funciones ováricas normales como por ejemplo la ovulación, la esteroidogénesis y la función luteal; y las condiciones patológicas como en la inducción de quistes ováricos (Ribadu y col., 2000; Ortega y col., 2008; Amweg y col., 2013). Por otro lado, si bien se ha postulado que el ovario no es capaz de producir GC *de novo* (Tetsuka, 2007), en esta tesis queda demostrado que la ACTH es capaz de estimular la secreción de cortisol por la pared de los folículos ováricos (Amweg y col., 2011). Estos resultados, junto con los informes sobre la acción directa de los GC en los cultivos de células ováricas (Spicer y Chamberlain, 1998; Kawate y col., 1993; Luck y Jungclas, 1988), indican que el ovario bovino es un órgano blanco para los GC, el cual también es capaz de modular el entorno glucocorticoide local (Tetsuka y col., 2003).

5.3 Expresión de los MCRs y su relación con la función de la ACTH en el ovario

Ante situaciones de estrés, el núcleo paraventricular sintetiza y secreta CRH y ADH. La CRH y los péptidos derivados de POMC, como ACTH, β -endorfinas y MSH, inhiben la producción de GnRH hipotalámica (Chen y col., 1992). En adición, los GC suprimen la función gonadal a nivel del hipotálamo, la hipófisis y el útero (Sakakura y col., 1975; Rabin y col., 1990). La ACTH y las MSH actúan a través de su unión a los MCRs, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en una gran cantidad de tejidos y células (Ramachandrapa y col., 2013). Sin embargo, pocos estudios han abordado el papel de los MCRs en la mediación de los efectos de los péptidos de melanocortinas en la reproducción. En este sentido, describimos por primera vez la expresión del ARNm de los MCRs en el ovario bovino (Amweg y col., 2011). Los resultados obtenidos en los tejidos controles se correspondieron con los patrones de expresión de los MCRs descritos previamente en otras especies (Catania y col., 2004; Getting, 2006), y fueron confirmados por secuenciación. Basados en un análisis semicuantitativo, los niveles relativos de expresión

de los ARNm de varios de los MCRs cambiaron a lo largo del desarrollo folicular. En este sentido, este estudio se llevó a cabo para determinar la expresión génica de todos los receptores y establecer una relación entre los diferentes subtipos en las distintas estructuras ováricas. Si bien sólo se demostró la presencia del ARNm codificante para los MCRs, y no la expresión de la proteína, los resultados obtenidos confirman la existencia de estos receptores en los diferentes componentes ováricos bovinos (Amweg y col., 2011), en adición a lo publicado en otras especies: humanos (Chhajlani V, 1996; Thörnwall y col., 1997), peces (Kobayashi y col., 2008; Alsop y col., 2009) y ratón (Labbe y col., 1994).

Los péptidos de melanocortinas están implicados en diferentes respuestas fisiológicas, como la pigmentación, la respuesta inflamatoria, el balance energético y la esteroidogénesis, entre otras. Los MCRs median varios de estos procesos mediante su unión a estos péptidos. Si bien la ACTH se une a todos los MCRs, se ha planteado la hipótesis que esta hormona ejerce sus efectos sobre la esteroidogénesis vía MC2R y MC5R. No obstante, MC1R, MC3R y MC4R también han sido localizados en el ovario de algunas especies, y si bien no han sido documentadas sus funciones esteroidogénicas, éstos podrían mediar también otras funciones relacionadas a la fisiología ovárica (Schiöth y Watanobe, 2002; Gonzalez-Añoover y col., 2011).

Actualmente es indudable el importante rol que tiene el sistema inmune en la reproducción. En los diversos procesos que abarca esta función, a nivel ovárico, las citoquinas actúan a través de un mecanismo autocrino y paracrino y están implicadas en la foliculogénesis y eventos relacionados con la ovulación, infiltración leucocitaria, angiogénesis, producción de hormonas esteroides y maduración del ovocito (Kucharski y Jana, 2005; Bukovsky y Caudle, 2008). Muchas características del proceso ovulatorio son comunes al proceso inflamatorio, y la ovulación a menudo se asemeja a una inflamación aguda localizada (Espey, 1994; Bukovsky y Caudle, 2008). Las melanocortinas actúan como antiinflamatorios al unirse a sus receptores, los MCRs, en las células blanco y desencadenan una respuesta que tiene como consecuencia la disminución de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. En este contexto, la detección de la expresión de MCRs en el ovario bovino, contribuye a la hipótesis que indica que las melanocortinas tienen efectos antiinflamatorios a nivel local contribuyendo a la histofisiología ovárica (Lipton y Catania,

1997). Virtualmente todas las células que responden al efecto antiinflamatorio de las melanocortinas expresan el MC1R, el receptor con mayor afinidad a α -MSH (Catania y col., 2004). Consistente con la idea de la participación de múltiples receptores en este tipo de efecto, en el presente estudio se obtuvo evidencia de la expresión del MC1R y MC3R en el CL y en algunos componentes de la pared folicular, la cual podría indicar una interacción estrecha entre las funciones reproductivas e inmunes mediadas por estos péptidos. Aunque en ratones knockout para MC3R o MC4R no se han encontrado alteraciones en los parámetros reproductivos más usuales (Schiöth y Watanobe, 2002), el número de CL se redujo en ratones MC4R^{-/-} (Sandrock y col., 2009), apoyando el rol de este receptor en la funcionalidad ovárica.

Si bien una variedad de manipulaciones experimentales han permitido la identificación de mediadores potenciales para la supresión de la reproducción mediada por estrés, los mecanismos precisos por los cuales las hormonas liberadas durante el estrés pueden inhibir esos procesos reproductivos aún no han sido completamente definidos. El rol potencial de la ACTH en la regulación directa de la función ovárica es poco conocida. Los efectos de la ACTH son mediados a través de su unión al MC2R, lo que da lugar a la activación de la cascada de señalización interna que es esencial para la expresión de las enzimas esteroideogénicas y la producción de cortisol (Xing y col., 2010; Novoselova y col., 2013). El efecto intraovárico de la ACTH ha sido demostrado en peces, donde esta hormona suprime la producción de gonadotropinas estimulada por estradiol en los folículos ováricos, y la expresión del MC2R demostrada en ovarios y testículos sugieren un rol para ACTH en la regulación de la función gonadal a través de los MCRs (Alsop y col., 2009). En concordancia con estos resultados, en bovinos, la expresión génica del MC2R (el principal receptor de señalización de ACTH en la glándula adrenal) y del MC5R se encontró principalmente en las células de la teca de los folículos terciarios pequeños y medianos. Además, se observó expresión del MC2R en el CL bovino (Amweg y col., 2011). Guelfi y col. (2011), indicaron que la ACTH modula directamente la funcionalidad ovárica en conejos por medio de la sobre regulación de la síntesis de progesterona lútea *in vitro* y a través de una estimulación/inhibición dependiente del tiempo del CL *in vivo*. Esta

regulación de la producción esteroidogénica implica al MC2R, mecanismos intracelulares adenil ciclasa/AMPC/proteína quinasa A y la mediación de la prostaglandina E2.

Adicionalmente, por PCR en tiempo real se evaluó la expresión del MC2R en los diferentes folículos terciarios y en quistes, confirmándose la expresión del receptor en todos los folículos analizados, tanto en las células de la granulosa como en las células de la teca. Estos resultados pueden estar relacionados con el efecto estimulante de la ACTH sobre la secreción de estradiol, testosterona y cortisol hallados *in vitro*. En este sentido, la ACTH estimula, en las células adrenales de mamíferos (excepto en roedores), vía la cascada de señales que implican al AMPC y la proteína quinasa A, la expresión de la enzima CYP17A1, la cual es necesaria para 17 α -hidroxilación de pregnenolona y progesterona en la biosíntesis de cortisol y andrógenos adrenales (Sewer y Waterman, 2003). La secreción aumentada de cortisol obtenida en el medio de cultivo luego del ensayo con ACTH, podría deberse a la presencia de los MC2R en las células de la teca, necesarios para que dicha hormona cumpla su función. La expresión del MC2R también puede estar asociada con el efecto estimulante de la ACTH sobre la secreción de testosterona en los folículos terciarios y quistes (Amweg y col., 2013), asociado tal vez a la disminución del receptor de andrógenos observada en los folículos terciarios y quistes de animales con COD (Salveti y col., 2012). Esta disminución en el receptor de andrógenos conduce a una mayor proporción de andrógenos (testosterona) disponibles para la aromatización en las células de la granulosa, con el consiguiente incremento de los estrógenos circulantes y foliculares, como se observó en el modelo experimental de COD inducida con ACTH (Dobson y col., 2000; Salvetti, 2012). De acuerdo con nuestros resultados se puede arribar a la hipótesis de que el folículo ovárico es un órgano blanco directo de la ACTH, indicando un rol para esta hormona en la regulación de la función gonadal a través de los MCRs.

5.4 Expresión de las enzimas 11 β HSD en el ovario bovino de animales con COD y su implicancia en el metabolismo de los GC

Las 11 β HSD son las enzimas que catalizan la activación/inactivación del cortisol por reducción u oxidación enzimática a nivel ovárico (Michael y col., 2003). La expresión de las enzimas 11 β HSD1 y 11 β HSD2 ha sido reportada en una gran variedad de especies,

pero los resultados hallados no son consistentes, probablemente debido a las diferencias entre especies o a las condiciones de cada estudio (Tetsuka y col., 2003; Thurston y col., 2003a,b; Fru y col., 2006; Jonas y col., 2006).

En este estudio se determinó la inmunolocalización de las enzimas 11 β HSD en las diferentes categorías foliculares de ovarios controles y con COD espontánea e inducida con ACTH. Se demostró que los folículos en todas las etapas de desarrollo, en el ovario bovino, expresan las enzimas 11 β HSD1 y 11 β HSD2 de una manera relacionada. En ovarios sanos, la inmunomarcación de 11 β HSD1 en la granulosa aumentó a medida que los folículos maduraban, mientras que se mantuvo constante y con menor expresión en las células de la teca. Además, los folículos atrésicos alcanzaron la mayor expresión de 11 β HSD1 en la granulosa. Por otro lado, la expresión de la proteína 11 β HSD2 aumentó en las células de la granulosa de los folículos secundarios, terciarios y atrésicos, y en las de la teca interna de los folículos terciarios y atrésicos. Además, los ovarios con quistes espontáneos e inducidos con ACTH mostraron patrones de inmunomarcación similares, con diferencias sólo en los niveles de expresión de 11 β HSD1 en la granulosa en relación a los ovarios controles. La granulosa de los quistes evidenció altos niveles expresión de 11 β HSD1 en relación a la expresión en los folículos terciarios de los ovarios controles, y la expresión en los folículos atrésicos de los ovarios con quistes espontáneos e inducidos fue más baja que en los folículos de los ovarios sanos.

Por otro lado, se evaluó la expresión del ARNm de ambas enzimas 11 β HSD por PCR en tiempo real en células de la granulosa y de la teca de folículos terciarios provenientes de ovarios sanos y en folículos quísticos. El ARNm de 11 β HSD1 evidenció una expresión mayor en la teca de los quistes en relación a los folículos terciarios pequeños; mientras que, si bien hubo expresión en la granulosa, la misma fue muy baja y no pudo ser cuantificada. Además, la expresión del ARNm de 11 β HSD2 también fue baja en ambas poblaciones celulares, por cual tampoco pudo ser cuantificada. Este patrón de expresión de los ARNm de las enzimas junto con el patrón de expresión evidenciado por inmunohistoquímica, está relacionado con lo previamente descripto por otros autores. Usando PCR en tiempo real, Tetsuka y col. (2010) mostraron que la expresión génica del ARNm de 11 β HSD1 en los folículos sanos aumenta a medida que los folículos maduran,

tanto en granulosa como en teca, mientras que la expresión génica del ARNm de 11 β HSD2 fue baja en las células de la granulosa y sin cambios durante la maduración folicular, pero con un fuerte incremento en la expresión en los folículos atrésicos, indicando que la 11 β HSD1 es la isoforma predominante en el folículo maduro y su expresión génica está finamente regulada en estos folículos. En otro estudio, utilizando PCR y Western Blot, Thurston y col. (2007) documentaron cambios en la expresión de la proteína y en las actividades de las enzimas 11 β HSD dependientes de cofactor en la granulosa a través del ciclo ovárico bovino. Las actividades de las 11 β HSD que dependen de NADP(H) y NAD⁺ están asociadas a cambios en la expresión de las proteínas 11 β HSD1 y 11 β HSD2, que a su vez refleja la expresión de los ARNm que codifican estas proteínas enzimáticas. Sunak y col. (2007), demostraron en cultivo de células de la granulosa porcinas, una actividad oxidasa 11 β HSD1 incrementada durante el crecimiento de folículos terciarios pero bajos niveles de oxidación de cortisol en las células de la granulosa de quistes, indicando estos resultados que dentro de los folículos terciarios pequeños y los quistes, las células de la granulosa pueden mantenerse a altas concentraciones intracelulares de GC activos, sugiriendo esto un rol local para el cortisol en el crecimiento folicular y en la patología de la COD.

La expresión de las enzimas 11 β HSD por Western Blot en los folículos terciarios grandes de ovarios sanos y de los folículos quísticos usados en los ensayos de cultivos estimulados con ACTH nos permitió determinar para la enzima 11 β HSD1, una mayor expresión del homodímero (68 KDa) en los diferentes folículos terciarios y en los quistes en relación a la forma monomérica (34K Da). En este sentido, Thurston y col. (2007) sugieren que la formación del homodímero puede ser favorecida por las acciones paracrinas y autocrinas de la progesterona sintetizada dentro de las células de la granulosa del folículo dominante o por un CL vecino. Por otro lado, la persistencia de homodímeros puede depender del nivel de expresión absoluta de la proteína 11 β HSD1 afectando la probabilidad de formación del dímero.

En este estudio, luego de la estimulación por ACTH *in vitro*, se observaron cambios en la expresión de las 11 β HSD y en la secreción de cortisol por la pared de los folículos terciarios y quísticos. Los quistes mostraron una alta expresión de ambas enzimas en

condiciones basales mientras que la ACTH produjo un incremento en la expresión de 11 β HSD1 en los folículos terciarios y en quistes, y una disminución en la expresión de 11 β HSD2 en los quistes. Esta respuesta es similar a la inducida por la administración de GnRH a cultivos de células de la granulosa que produce un aumento en la expresión de 11 β HSD1 y disminuye la expresión de 11 β HSD2 (Tetsuka y col., 1997; Yong y col., 2000). Esto resulta en un rápido incremento del cortisol folicular justo antes de la ruptura del folículo (Harlow y col., 1997; Yong y col., 2000). La importancia fisiológica de este evento no es clara pero podría modular el proceso inflamatorio asociado a la ovulación (Acosta y col., 2005; Hillier y Tetsuka, 1998). Si bien este mecanismo puede incrementar temporalmente la concentración de los GC activos, formando una parte integral del mecanismo ovulatorio, también puede ser parte de un proceso que conduce a la formación de los quistes foliculares. La expresión de receptores de ACTH en el ovario bovino confirmados en este estudio (Amweg y col., 2011), y el hecho de que la ACTH es capaz de inducir la secreción de esteroides y cambios en la expresión de 11 β HSD en el ovario (Amweg y col., 2013), indican que la ACTH puede estar implicada en los mecanismos regulatorios relacionados a la función ovárica asociados con la ovulación, la esteroidogénesis y la patogenia de la COD. Estos resultados sugieren que los folículos ováricos pueden ser expuestos a altas concentraciones locales de GC activos e indican un rol local para el cortisol en la regulación de la función ovárica como así también en el desarrollo de COD.

Teniendo en cuenta que la concentración circulante de cortisol no es modificada durante el ciclo estral bovino (Garverick y col., 1971; Roussel y col. 1983; Lyimo y col., 2000), el sistema enzimático 11 β HSD puede jugar un rol importante en la regulación de la acción de los GC en el ovario. Sin embargo, los mecanismos regulatorios no han sido enteramente dilucidados. En un estudio reciente, Michael y col. (2013) demostraron que el síndrome poliquístico ovárico (PCOS) en mujeres con falla en el proceso ovulatorio está asociado con una disminución de la oxidación neta de cortisol, reflejado en un aumento en las concentraciones de cortisol y en la relación cortisol:cortisona en el líquido folicular de ovarios de mujeres con PCOS comparados con el líquido folicular de ovarios sanos, concluyendo que la disminución en la inactivación neta de GC puede ser relevante para el

bloqueo de la foliculogénesis y la ovulación observada en PCOS. Además, los niveles de los cofactores enzimáticos también influyen en las actividades de las 11 β HSD y ha sido demostrado que el líquido folicular de folículos terciarios grandes y quistes contienen moduladores ováricos de la actividad 11 β HSD dependiente de NADP⁺. Sin embargo, debido a una disminución en el contenido de factores activadores de 11 β HSD acompañados por el contenido incrementado de inhibidores de 11 β HSD, el líquido folicular de los quistes ejerce un efecto inhibitor neto sobre la actividad de 11 β HSD2 (Thurston y col., 2003) con una disminución de la inactivación del cortisol en los folículos quísticos (Sunak y col., 2007). Por otro lado, como la progesterona es un fuerte inhibidor intrafolicular de la actividad 11 β HSD1 (Souness y col., 1995; Souness y Morris, 1996; Sun y col., 1998; Thurston y col., 2002; Latif y col., 2005; Robinzon y col., 2005), la falta de ovulación y el bloqueo consecuente de la luteinización y la baja concentración de progesterona, característica de COD, puede exacerbar la actividad de 11 β HSD1 y la producción de cortisol.

5.5 Expresión del GR en el ovario bovino con COD

Las acciones biológicas de los GC están mediadas a través de la activación del GR intracitoplasmático, el cual, al igual que otros receptores de hormonas esteroideas, realiza importantes funciones en la regulación de la actividad transcripcional en las células blanco (Beato y Klug, 2000).

En el presente estudio no se encontraron diferencias en la expresión del ARNm del GR en células de la granulosa y la teca de folículos terciarios y quísticos. Estos resultados se correlacionan con los descriptos por Tetsuka y col. (2010), en donde la expresión del ARNm del GR no cambió a través del desarrollo folicular en células de la granulosa y la teca, y se incrementó en folículos atrésicos. Además, ni la maduración folicular ni el tratamiento con FSH afectaron la expresión del ARNm del GR.

Por otro lado, la evaluación de la expresión proteica del GR permitió observar en los ovarios de animales controles una mayor expresión del GR en las células de la granulosa de los folículos atrésicos en relación con los folículos primarios, secundarios y terciarios, y en comparación con las células de la teca interna de todas las categorías foliculares. Estos

resultados coinciden con los observados por otros autores (Tetsuka y col., 2010). A su vez, en las células de la granulosa la expresión del GR fue mayor en los folículos terciarios y quistes de los animales con COD espontánea y en quistes de animales con COD inducida con ACTH, en relación a los folículos terciarios de animales sanos. En la teca, la inmunomarcación del GR fue mayor en los folículos terciarios y en quistes de vacas con COD espontánea que en folículos terciarios del grupo control. Los resultados de este estudio se relacionan con los obtenidos en ratas por Park y col. (2012), quienes demostraron que la expresión génica del GR aumentó significativamente en los quistes inducidos con ACTH en relación a los folículos del grupo control.

El aumento en la expresión 11β HSD1 observada en los folículos quísticos podría asociarse con el incremento en la concentración de cortisol intrafolicular en animales con COD hallado en este trabajo. Por otra parte, el incremento en la expresión del GR permitiría que estas hormonas actúen en las células de los folículos quísticos a través de mecanismos de activación/inactivación de la transcripción de genes por ejemplo, la inhibición directa de factores transcripcionales pro-inflamatorios o la reducción de la estabilidad de enzimas relacionadas con la proliferación celular y la expresión génica que tiene lugar en el proceso inflamatorio (Cosío y col., 2005). Por otra parte la acción antiinflamatoria local aumentada, podrían actuar inhibiendo la ovulación y favoreciendo la persistencia folicular y la posterior formación de quistes.

6. Conclusiones



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

La ACTH es capaz de inducir la secreción de esteroides en el ovario tanto *in vivo* como *in vitro*, indicando que la misma puede estar implicada en mecanismos regulatorios relacionados a las funciones ováricas, por ejemplo la ovulación y la esteroidogénesis. También podría estar implicada en la etiopatogenia de la COD.

En esta tesis demostramos que los ovarios con quistes están expuestos a una alta concentración local de cortisol y tienen la capacidad de aumentar aún más estas concentraciones en respuesta a un estímulo específico. Si bien no se ha demostrado que el ovario sea capaz de producir GC *de novo*, la ACTH es capaz de estimular la secreción de cortisol por la pared de los folículos ováricos, lo que sugiere la existencia de un mecanismo que regula la concentración intrafolicular del cortisol y una acción directa de la ACTH sobre los folículos ováricos.

También describimos por primera vez la presencia de ARNm de los MCRs en la pared folicular del ovario bovino, indicando que el folículo ovárico podría ser un órgano blanco directo para la ACTH, otorgándole un rol importante a esta hormona como moduladora de la función gonadal a través de los MCRs. Particularmente, se confirmó la expresión del MC2R en las células de la teca, sugiriendo esto que la secreción aumentada de cortisol obtenida en el medio de cultivo luego del ensayo con ACTH, podría deberse a la presencia de este receptor, necesario para que dicha hormona cumpla su función.

Los niveles proteicos de las enzimas 11 β HSD1 y 11 β HSD2 involucradas en la activación/inactivación del cortisol, fueron claramente detectados en todos los estadios del desarrollo folicular ovárico bovino, con un aumento en la expresión de ambas isoformas a medida que los folículos maduran. Además, los ovarios con quistes espontáneos e inducidos con ACTH mostraron patrones de inmunomarcación similares, con diferencias

sólo en los niveles de expresión de 11 β HSD1 en la granulosa en relación a los ovarios controles. De esta forma, la 11 β HSD1 resultó ser la isoforma predominante en animales con COD, relacionado esto posiblemente con la acción antiinflamatoria local aumentada postulada para el cortisol, que podría inhibir la ovulación, favoreciendo la persistencia folicular y la posterior formación de quistes.

La estimulación con ACTH, *in vitro*, produjo un incremento en la expresión de 11 β HSD1 en los folículos terciarios y en quistes, y una disminución en la expresión de 11 β HSD2 en los quistes. Estos resultados nos permiten inferir que la ACTH es capaz de inducir cambios en la expresión de estas enzimas en el ovario bovino. El aumento en la expresión de 11 β HSD1 observada en los folículos quísticos podría asociarse con el incremento en la concentración de cortisol hallado en el medio de cultivo, sugiriendo una importante función regulatoria para esta enzima en la disponibilidad del cortisol a nivel ovárico, y un rol local del cortisol en el crecimiento folicular y/o en la COD.

El aumento en la expresión del GR observada en los folículos quísticos, junto con el incremento en la concentración de cortisol intrafolicular en animales con COD, sugieren un mecanismo de acción para esta hormona y su receptor a través de la activación/inactivación de factores transcripción específicos. Estos factores podrían estar relacionados con los mecanismos regulatorios involucrados en la ovulación, y participar en los procesos relacionados con la patogenia de la COD en bovinos.

El modelo experimental utilizado permitió el estudio y comprensión de aspectos que resultan difíciles de abordar al trabajar con muestras provenientes de animales que presentan la enfermedad de manera espontánea. Si bien hubo diferencias entre el modelo utilizado y los casos espontáneos de quistes diagnosticados y obtenidos a campo, las mismas podrían explicarse principalmente por el tiempo de persistencia. En este sentido, los modelos experimentales permiten el estudio de los cambios incipientes que ocurren en la enfermedad, alteraciones que se establecen muchas veces antes de que esta sea

diagnosticada, y resultan fundamentales para ampliar los conocimientos referentes a la formación temprana de los quistes y para la formulación de estrategias preventivas.

Como conclusión final, podríamos sugerir que los estresores afectarían directamente las funciones reproductivas, no solo a través del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, sino mediante una acción directa de la ACTH a nivel ovárico. La confirmación de la expresión de receptores de ACTH en el ovario bovino, y el hecho de que la ACTH es capaz de inducir la secreción de esteroides y cambios en la expresión folicular de 11β HSD, indican que la ACTH puede estar implicada en los mecanismos regulatorios relacionados a la función ovárica asociados con la ovulación, la esteroidogénesis y la patogénesis de la COD.

7. Referencias Bibliográficas

7. Referencias Bibliográficas

Abdel-Malek ZA. 2001. Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell Mol Life Sci.* 58: 434-441.

Acosta TJ, Tetsuka M, Matsui M, Shimizu T, Berisha B, Schams D, Miyamoto A. 2005. In vivo evidence that local cortisol production increases in the preovulatory follicle of the cow. *J Reprod Dev.* 51: 483-489.

Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil.* 94: 177-188.

Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology.* 69: 72-80.

Aerts JMJ, Bols PEJ. 2010a. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reprod Dom Anim.* 45: 171-179.

Aerts JMJ, Bols PEJ. 2010b. Ovarian Follicular Dynamics: A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects. *Reprod Dom Anim.* 45: 180-187.

Agarwal AK, Monder C, Eckstein B, White PC. 1989. Cloning and expression of rat cDNA encoding corticosteroid 11-dehydrogenase. *J Biol Chem.* 264: 18939-18943.

Alfaro NS, Salvetti NR, Velazquez MM, Stangaferro ML, Rey F, Ortega HH. 2012. Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Res Vet Sci.* 92: 478-485.

Alsop D, Ings JS, Vijayan MM. 2009. Adrenocorticotrophic hormone suppresses gonadotropin-stimulated estradiol release from zebrafish ovarian follicles. *PLoS One* 4: e6463.

Aluru N, Vijayan MM. 2008. Molecular characterization, tissue-specific expression, and regulation of melanocortin 2 receptor in rainbow trout. *Endocrinology.* 149: 4577-4588.

Amsterdam A, Tajima K, Sasson R. 2002. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol.* 64: 843-850.

7. Referencias Bibliográficas

Amweg AN, Paredes AH, Salvetti NR, Lara HE, Ortega HH. 2011. Expression of melanocortin receptors mRNA, and direct effects of ACTH on steroid secretion in the bovine ovary. *Theriogenology*. 75: 628-637.

Amweg AN, Salvetti NR, Stangaferro ML, Paredes AH, Lara HH, Rodríguez FM, Ortega HH. 2013. Ovarian localization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD): effects of ACTH stimulation and its relationship with bovine cystic ovarian disease. *Domest Anim Endocrin*. 45: 126-140.

Andersen CY, Hornnes P. 1994. Intrafollicular concentrations of free cortisol close to follicular rupture. *Hum Reprod*. 9: 1944-1949.

Andersen CY. 2002. Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis. *J Endocrinol*. 173: 211-217.

Ando M, Kol S, Kokia E, Ruutiainen-Altman K, Sirois J, Rohan RM, Payne DW, Adashi EY. 1998. Rat ovarian prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2: periovulatory expression of granulosa cell-based interleukin-1 dependent enzymes. *Endocrinology*. 139: 2501-2508.

Baird DT, Campbell BK, Mann GE. 1991. McNeilly AS. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Reprod Fertil*. 43: 125-138.

Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS. 1997. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol Reprod*. 56: 1158-1168.

Baravalle C, Salvetti NR, Mira GA, Lorente JA, Ortega HH. 2007. Role of ACTH in the pathogenesis of Polycystic Ovarian Syndrome in the rat: hormonal profiles and ovarian morphology. *Physiol Res*. 56: 67-78.

Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. 1993. Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology*. 133: 2696-2703.

7. Referencias Bibliográficas

Bartolomé JA, Thatcher WW, Melendez P, Risco CA, Archbald LF. 2005. Strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cysts in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 227: 1409-1414.

Battaglia DF, Krasa HB, Padmanaban V, Viguie C, Karsch FJ. 2000. Endocrine alterations that underlie endotoxinmediated disruption of the follicular phase in ewes. *Biol Reprod.* 62: 45-53.

Beato M, Klug J. 2000. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update.* 6: 225-236.

Beuschlein F, Fassnacht M, Klink A, Allolio B, Reincke M. 2001. ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *Eur J Endocrinol.* 144: 199-206.

Borsberry S, Dobson H. 1989. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *Vet Rec.* 124: 217-219.

Bossis I, Wettemann RP, Welty SD, Vizcarra J, Spicer LJ. 2000. Nutritionally induced anovulation in beef Heifers: ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. *Biol Reprod.* 62: 1436-1444.

Boston BA, Cone RD. 1996. Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinology.* 137: 2043-2050.

Boston BA. 1999. The role of melanocortins in adipocyte function. *Ann N Y Acad Sci.* 885: 75-84.

Bosu WTK, Peter AT. 1987. Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 28: 725-736.

Braden A, Moule G. 1964. Effects of stress on ovarian morphology and oestrus cycles in ewes. *Aust J Agr Res.* 15: 937-949.

Braw-Tal R, Yossefi S. 1997. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil.* 109: 165-171.

Bukovsky A, Caudle MR. 2008. Immune physiology of the mammalian ovary - a review. *Am J Reprod Immunol.* 59: 12-26.

7. Referencias Bibliográficas

Butler AA, Kesterson RA, Khong K, Cullen MJ, Pelleymounter M A, Dekoning J, Baetscher M, Cone RD. 2000. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology*. 141: 3518-3521.

Calder MD, Manikkam M, Salfen BE, Youngquist RS, Lubahn DB, Lamberson WR, Garverick HA. 2001. Dominant bovine ovarian follicular cysts express increased levels of messenger RNAs for luteinizing hormone receptor and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase Δ 4, Δ 5 isomerase compared to normal dominant follicles. *Biol Reprod*. 65: 471-476.

Camp TA, Rahal JO, Mayo KE. 1991. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol*. 5: 1405-1417.

Carrie're PD, Amaya D, Lee B. 1995. Ultrasonography and endocrinology of ovarian dysfunction in heifers with estradiol valerate. *Theriogenology*. 43: 1061-1076.

Castellano JM, Gaytan M, Roa J, Vigo E, Navarro VM, Bellido C, Dieguez C, Aguilar E, Sanchez-Criado JE, Pellicer A, Pinilla L, Gaytan F, Tena-Sempere M. 2006. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology*. 147: 4852-4862.

Catania A, Gatti S, Colombo G, Lipton JM. 2004. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol Rev*. 56: 1-29.

Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol*. 67: 259-284.

Chen MD, O'Byrne KT, Chiappini SE, Hotchkiss J, Knobil E. 1992. Hypoglycemic "stress" and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey: role of the ovary. *Neuroendocrinology*. 56: 666-673.

Chhajlani V. 1996. Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem Mol Biol Int*. 38: 73-80.

Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. 1998. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med*. 129: 229-240.

7. Referencias Bibliográficas

Chun SY, Eisenhauer K, Kubo M, Hsueh AJ. 1995. Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology*. 136: 3120-3127.

Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJ. 1996. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*. 137: 1447-1456.

Cook DL, Smith CA, Parfet JR, Youngquist RS, Brown EM, Garverick HA. 1990. Fate and turnover rate of ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J Reprod Fertil*. 90: 37-46.

Cook DL, Parfet JR, Smith CA, Moss GE, Youngquist RS, Garverick HA, 1991. Secretory patterns of LH and FSH during development and hypothalamic and hypophyseal characteristics following development of steroid-induced ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J Reprod Fertil*. 91: 19-28.

Cooray SN, Clark AJ. 2011. Melanocortin receptors and their accessory proteins. *Mol Cell Endocrinol*. 331: 215-221.

Cosío BG, Torrego A, Adcock IM. 2005. Mecanismos moleculares de los glucocorticoides. *Arch Bronconeumol*. 41: 34-41.

Cunningham JG. 2003. *Fisiología Veterinaria*. 3ra. Edición. Capítulo 33: Las glándulas endocrinas y su función. Madrid, España. Ed. Elsevier. p. 348-354.

D'Ottavio M, Robbe D, Sciorsci RL. 2002. Le cisti follicolari nella bovina. *ODV* 6: 13-19.

Danisová A, Seböková E, Kolena J. 1987. Effect of corticosteroids on estradiol and testosterone secretion by granulosa cells in culture. *Exp Clin Endocrinol*. 89: 165-173.

De Silva M, Reeves JJ. 1988. Hypothalamic-pituitary function in chronically cystic and regularly cycling dairy cows. *Biol Reprod*. 38: 264-269.

Dellmann HD, Priedkalns J. 1993. *Histología Veterinaria*. 2da. Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

Dellmann HD, Eurell JA. 1998. *Textbook of veterinary histology*. 5th Edition. London: Williams y Wilkins. p. 252.

7. Referencias Bibliográficas

Divari S, Cannizzo FT, Uslenghi F, Pregel P, Mulasso C, Spada F, De Maria R, Biolatti B. 2011. Corticosteroid hormone receptors and preceptors as new biomarkers of the illegal use of glucocorticoids in meat production. *J Agric Food Chem.* 59: 2120-2125.

Dobson H, Nanda AS. 1992. Reliability of cyst diagnosis and effect of energy status on LH released by estradiol or GnRH in cows with ovarian cysts. *Theriogenology.* 37: 465-472.

Dobson H, Smith RF. 1995. Stress and reproduction in farms animals. *J Reprod Fertil. (Suppl)* 49: 451-461.

Dobson H, Tebble JE, Ozturk M, Smith RF. 1999. Effect of transport on pulsatile LH release in ovariectomized ewes with or without prior steroid exposure at different times of year. *J Reprod Fertil.* 117: 213-222.

Dobson H, Ribadu AY, Noble KM, Tebble JE, Ward WR. 2000. Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle. *J Reprod Fertil.* 120: 405-410.

Dobson H, Smith RF. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim Reprod Sci.* 60-61: 743-752.

Dobson H, Tebble JE, Smith RF, Ward WR. 2001. Is stress really all that important? *Theriogenology.* 55: 65-73.

Drummond AE, Britt KL, Dyson M, Jones ME, Kerr JB, O'Donnell L, Simpson ER, Findlay JK. 2002. Ovarian steroid receptors and their role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol.* 191: 27-33.

Drummond AE. 2006. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol.* 4: 16.

Duong HT, Piotrowska-Tomala KK, Acosta TJ, Bah MM, Sinderewicz E, Majewska M, Jankowska K, Okuda K, Skarzynski DJ. 2012. Effects of cortisol on pregnancy rate and corpus luteum function in heifers: an in vivo study. *J Reprod Dev.* 58: 223-230.

Endo N, Nagai K, Tanaka T, Kamomae H. 2012. Comparison between lactating and non-lactating dairy cows on follicular growth and corpus luteum development, and

7. Referencias Bibliográficas

endocrine patterns of ovarian steroids and luteinizing hormone in the estrous cycles. *Anim Reprod Sci.* 134: 112-118.

Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT. 2004. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol.* 25: 132-149.

Erb RE, Monk EL, Callahan CJ, Mollet TA. 1973. Endocrinology of induced ovarian follicular cysts. *J Anim Sci.* 37: 310.

Espey LL. 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod.* 50: 233-238.

Evagelatou M, Peterson SL, Cooke BA. 1997. Leukocytes modulate 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) activity in human granulosa lutein cell cultures. *Mol Cell Endocrinol.* 133: 81-88.

Evans AC, Adams GP, Rawlings NC. 1994. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J Reprod Fertil.* 100: 187-194.

Evans AC, Fortune JE. 1997. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of Messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology.* 138: 2963-2971.

Eyestone WH, Ax RL. 1984. A review of ovarian follicular cysts in cows, with comparisons to the conditions in women, rats and rabbits. *Theriogenology.* 22: 109-125.

Fathala MA, Geissenger HD, Liptrap RM. 1978. Effects of endometrial damage and prostaglandin F2a in experimental cystic ovarian follicles in the cow. *Res Vet Sci.* 25: 269-279.

Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. 2011. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci.* 124: 163-169.

Fortune JE, Sirois J, Turzillo AM, Lavoie M. 1991. Follicle selection in domestic ruminants. *J Reprod Fertil Suppl.* 43: 187-198.

Fortune JE. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 78: 135-163.

7. Referencias Bibliográficas

Frautschy SA, Liptrap RM. 1988. Anovulation and plasma hormone concentrations after administration of dexamethasone during the middle of the luteal phase in sows undergoing estrous cycles. *Am J Vet Res.* 49: 1270-1275.

Fru KN, VandeVoort CA, Chaffin CL. 2006. Mineralocorticoid synthesis during the periovulatory interval in macaques. *Biol Reprod.* 75: 568-574.

Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G, Watson SJ, Del-Valle J, Yamada T. 1993a. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem.* 268: 8246-8250.

García-Galiano D, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2012. Sex steroids and the control of the Kiss1 system: developmental roles and major regulatory actions. *J Neuroendocrinol.* 24: 22-33.

Garnero O, Perusia O. 2002. Manual de anestias y cirugías del bovino. 1ra. Edición. - Editorial Imprenta San Cayetano, Santa Fe, Argentina. p. 125.

Gartner LP, Hiatt JL. 1997. Histología. Texto y Atlas. McGraw-Hill Interamericana, México. P. 506.

Garverick HA, Erb RE, Niswender GD, Callahan CJ. 1971. Reproductive steroids in the bovine, 3: changes during the estrous cycle. *J Anim Sci.* 32: 946-956.

Garverick HA. 1997. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci.* 80: 995-1004.

Gaytán F, Gaytán M, Castellano JM, Romero M, Roa J, Aparicio B, Garrido N, Sánchez-Criado JE, Millar RP, Pellicer A, Fraser HM, Tena-Sempere M. 2009. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296: 520-531.

Geneser F. 2005. Histología. 3ra. Edición. Capítulo 22: Órganos de la reproducción. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. p. 615.

Getting SJ, Di Filippo C, Christian HC, Lam CW, Rossi F, D'Amico M, Perretti M. 2004a. MC-3 receptor and the inflammatory mechanisms activated in acute myocardial infarct. *J Leukoc Biol.* 76: 845-853.

7. Referencias Bibliográficas

Getting SJ, Di FC, Lam CW, Rossi F, D'Amico M. 2004b. Investigation into the potential anti-inflammatory effects of endothelin antagonists in a murine model of experimental monosodium urate peritonitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 310: 90-97.

Getting SJ. 2006. Targeting melanocortin receptors as potential novel therapeutics. *Pharmacol Therapeut.* 111: 1-15.

Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol Reprod.* 41: 247-254.

Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Martin S, Wiltbank MC. 1996. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J Reprod Fertil.* 108: 271-279.

Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Wiltbank MC. 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology.* 48: 75-87.

Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. 2001. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod.* 65: 638-647.

Gonzalez-Añoover P, Encinasb T, Torres-Rovirac L, Pallaresc P, Muñoz-Frutosd J, Gomez-Izquierdoe E, Sanchez-Sanchez R, Gonzalez-Bulnesc A. 2011. Ovulation rate, embryo mortality and intrauterine growth retardation in obese swine with gene polymorphisms for leptin and melanocortin receptors. *Theriogenology.* 75: 34-41.

Guarini S, Schioth HB, Mioni C, Cainazzo M, Ferrazza G, Giuliani D, Wikberg JE, Bertolini A, Bazzani C. 2002. MC(3) receptors are involved in the protective effect of melanocortins in myocardial ischemia/reperfusion-induced arrhythmias. *Arch Pharmacol.* 366: 177-182.

Guelfi G, Zerani M, Brecchia G, Parillo F, Dall'Aglio C, Maranesi M, Boiti C. 2011. Direct actions of ACTH on ovarian function of pseudopregnant rabbits. *Mol Cell Endocrinol.* 339: 63-71.

Gümen A, Sartori R, Costa FM, Wiltbank MC. 2002. A GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure can induce development of follicular cysts. *J Dairy Sci.* 85: 43-50.

7. Referencias Bibliográficas

Gümen A, Wiltbank MC. 2002. An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. *Biol Reprod.* 66: 1689-1695.

Gümen A, Wiltbank MC. 2005. Follicular cysts occur after a normal estradiol-induced GnRH/LH surge if the corpus hemorrhagicum is removed. *Reproduction.* 129: 737-745.

Guthrie HD, Garrett WM, Cooper BS. 1998. Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells. *Biol Reprod.* 58: 390-396.

Hafez ESE, Hafez B. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ma. Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. D.F. México.

Hamilton SA, Garverick HA, Keisler DH, Xu ZZ, Loos K, Youngquist RS, Salfen BE. 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol Reprod.* 53: 890-898.

Harlow CR, Jenkins JM, Winston RM. 1997. Increased follicular fluid total and free cortisol levels during the luteinizing hormone surge. *Fertil Steril.* 68: 48-53.

Hatler TB, Hayes SH, Laranja da Fonseca LF, Silvia WJ. 2003. Relationship between endogenous progesterone and follicular dynamics in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts. *Biol Reprod.* 69: 218-223.

Hillier SG. 1994. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod.* 9: 188-191.

Hillier SG, Tetsuka M. 1998. An anti-inflammatory role for glucocorticoids in the ovaries? *J Reprod Immunol.* 39: 21-27.

Hillier SG. 2001. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol.* 179: 39-46.

Hohmann JG, Teal TH, Clifton DK, Davis J, Hraby VJ, Han G, Steiner RA. 2000. Differential role of melanocortins in mediating leptin's central effects on feeding and reproduction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 278: 50-59.

Hoogduijn MJ, McGurk S, Smit NP, Nibbering PH, Ancans J, van der Laarse A, Thody AJ. 2002. Ligand-dependent activation of the melanocortin 5 receptor: cAMP

7. Referencias Bibliográficas

production and ryanodine receptor-dependent elevations of $[Ca^{2+}]_i$. *Biochem Biophys Res Commun.* 290: 844-850.

Hooijer GA, Lubbers RB, Ducro BJ, van Arendonk JA, Kaal-Lansbergen LM, van der Lende T. 2001. Genetic parameters for cystic ovarian disease in Dutch Black and White dairy cattle. *J Dairy Sci.* 8: 286-291.

Hsu SY, Hsueh AJ. 1997. Hormonal regulation of apoptosis an ovarian perspective. *Trends Endocrinol Metab.* 8: 207-213.

Hsueh AJ, Erickson GF. 1978. Glucocorticoid inhibition of FSH-induced estrogen production in cultured rat granulosa cells. *Steroids* 32: 639-648.

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell.* 88: 131-141.

Inoue N, Matsuda F, Goto Y, Manabe N. 2011. Role of cell-death ligand-receptor system of granulosa cells in selective follicular atresia in porcine ovary. *J Reprod Dev.* 57: 169-75.

Isobe N, Yoshimura Y. 2007. Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle. *J Reprod Dev.* 53: 1119-1124.

Johnston W, Jou P, Buckrell B. 1997. Cystic ovarian disease a new perspective. *Proceedings of Annual Meeting of the 37 Society for Theriogenology, Montreal, Canada.* p. 98-107.

Jonas KC, Chandras C, Abayasekara DR, Michael AE. 2006. Role for prostaglandins in the regulation of type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human granulosa-lutein cells. *Endocrinology.* 147: 5865-5872.

Jordan ER. 2003. Effects of Heat Stress on Reproduction. *J Dairy Sci.* 86: 104-114.

Kawate N, Inaba T, Mori J. 1990. A quantitative comparison in the bovine of steroids and gonadotropin receptors in normally developing follicles and in follicular and luteinized cysts. *Anim Reprod Sci.* 23: 273-281.

7. Referencias Bibliográficas

Kawate N, Inaba T, Mori J. 1993. Effects of cortisol on the amounts of 17 β -estradiol and progesterone secreted and the number of luteinizing hormone receptors in cultured bovine granulosa cells. *Anim Reprod Sci.* 32: 15-25.

Kawate N, Inaba T, Mori J. 1996. Changes in plasma concentrations of gonadotropins and steroid hormones during the formation of bovine follicular cysts induced by the administration of ACTH. *J Vet Med Sci.* 58: 141-144.

Kawate N, Akiyama M, Suga T, Inaba T, Tamada H, Sawada T, Mori J. 2001. Change in concentrations of luteinizing hormone subunit messenger ribonucleic acids in the estrous cycle of beef cattle. *Animal Reprod Sci.* 68: 13-21.

Kesler DJ, Garverick HA, Caudle AB, Elmore RG, Youngquist RS, Bierschwal CJ. 1980. Reproductive hormone and ovarian changes in cows with ovarian cysts. *J Dairy Sci.* 63: 166-170.

Kesler DJ, Garverick HA. 1982. Ovarian cysts in dairy cattle: a review. *J Anim Sci.* 55: 1147-1159.

Kinder J, Kojima F, Bergfeld E, Wehrman M, Fike K. 1996. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J Anim Sci.* 74: 1424-1440.

Klovins J, Haitina T, Ringholm A, Löwgren M, Fridmanis D, Slaidina M, Stier S, Schiöth HB. 2004. Cloning of two melanocortin (MC) receptors in spiny dogfish: MC3 receptor in cartilaginous fish shows high affinity to ACTH-derived peptides while it has lower preference to gamma-MSH. *Eur J Biochem.* 271: 4320-4331.

Knight PG, Glistler C. 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction.* 121: 503-512.

Kobayashi Y, Tsuchiya K, Yamanome T, Schiöth HB, Kawauchi H, Takahashi A. 2008. Food deprivation increases the expression of melanocortin-4 receptor in the liver of barfin flounder, *Verasper moseri*. *Gen Comp Endocrinol.* 155: 280-287.

Komiyama J, Nishimura R, Lee HY, Sakumoto R, Tetsuka M, Acosta TJ, Skarzynski DJ, Okuda K. 2008. Cortisol is a suppressor of apoptosis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod.* 78: 888-895.

7. Referencias Bibliográficas

Krozowski Z, Li KX, Koyama K, Smith RE, Obeyesekere VR, Stein-Oakley A, Sasano H, Coulter C, Cole T, Sheppard KE. 1999. The type I and type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69: 391-401.

Kucharski J, Jana B. 2005. Immuno-endocrine mechanisms connected with the creation of corpora lutea persistent in animal ovaries. *Pol J Vet Sci.* 8: 255-259.

Labbe O, Desarnaud F, Eggerickx D, Vassart G, Parmentier M. 1994. Molecular cloning of a mouse menocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues. *Biochemistry.* 33: 4543-4549.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.

Lakshmi V, Monder C. 1988. Purification and characterization of the corticosteroid 11-dehydrogenase component of the rat liver 11-hydroxysteroid dehydrogenase complex. *Endocrinology.* 123: 2390-2398.

Lang A, Kaeoket K, Kindahl H, Madej A, Einarsson S. 2004. *Reprod Domest Anim.* 39: 181-189.

Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. 1993. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology.* 133: 2690-2695.

Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa E, Silva AA, Ramírez VD. 2002. Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech.* 59: 495-502.

Latif SA, Pardo HA, Hardy MP, Morris DJ. 2005. Endogenous selective inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms 1 and 2 of adrenal origin. *Mol Cell Endocrinol.* 243: 43-50.

Lee HY, Acosta TJ, Tanikawa M, Sakumoto R, Komiyama J, Tasaki Y, Piskula M, Skarzynski DJ, Tetsuka M, Okuda K. 2007. The role of glucocorticoid in the regulation of prostaglandin biosynthesis in non-pregnant bovine endometrium. *J Endocrinol.* 193: 127-135.

7. Referencias Bibliográficas

Lee LA, Ferguson JD, Galligan DJ. 1988. The use of survival analysis to quantitate days open, advantages and implications. *Acta Vet Scand* 84: 433-435.

Liakos P, Chambaz EM, Feige JJ, Defaye G. 1998. Expresión of ACTH receptors (MC2-R and MC5-R) in the glomerulosa and the fasciculata-reticulares zones of bovine adrenal cortex. *Endocr Res.* 24: 427-432.

Liakos P, Chambaz EM, Feige JJ, Defaye G. 2000. Expression and regulation of melanocortin receptor-5 (MC5-R) in the bovine adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 159: 99-107.

Lipton JM, Catania A. 1997. Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH. *Immunol Today.* 18: 140-145.

Liptrap RM, McNally PJ. 1976. Steroid concentrations in cows with corticotropin-induced cystic ovarian follicles and the effect of prostaglandin F₂alpha and indomethacin given by intrauterine injection. *Am J Vet Res.* 37: 369-375.

Liptrap RM. 1993. Stress and reproduction in domestic animals. *Ann N Y Acad Sci.* 697: 275-284.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gen expression data using real-time cuantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods.* 25: 402-408.

Lopez-Diaz MC, Bosu WTK. 1992. A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. *Theriogenology.* 37: 1163-1183.

Lu NZ, Cidlowski JA. 2006. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol.* 16: 301-307.

Luck MR, Jungclas B. 1988. The time-course of oxytocin secretion from cultured bovine granulosa cells, stimulated by ascorbate and catecholamines. *J Endocrinol.* 116: 247-258.

Lyimo ZC, Nielen M, Ouweltjes W, Kruip TA, van Eerdenburg FJ. 2000. Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology.* 53: 1783-1795.

Lynch K, Fernandez G, Pappalardo A, Peluso JJ. 2000. Basic fibroblast growth factor inhibits apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells by regulating

7. Referencias Bibliográficas

intracellular free calcium levels through a protein kinase Cdelta-dependent pathway. *Endocrinology*. 141: 4209-4217.

Maeda A, Inoue N, Matsuda-Minehata F, Goto Y, Cheng Y, Manabe N. 2007. The role of interleukin-6 in the regulation of granulosa cell apoptosis during follicular atresia in pig ovaries. *J Reprod Dev*. 53: 481-490.

Majewska M, Lee HY, Tasaki Y, Acosta TJ, Szostek AZ, Siemieniuch M, Okuda K, Skarzynski DJ. 2012. Is cortisol a modulator of interferon tau action in the endometrium during early pregnancy in cattle? *J Reprod Immunol*. 93: 82-93.

Malven PV. 1986. Inhibition of pituitary LH release resulting from endogenous opioid peptides. *Dom Anim Endocrinol*. 3: 135-144.

Mao J, Smith MF, Rucker EB, Wu GM, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN. 2004. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. *J Anim Sci*. 82: 1967-1975.

Martin WJ, Mac Intyre DE. 2004. Melanocortin receptors and erectile function. *Eur Urol*. 45: 706-713.

Matsuda F, Inoue N, Goto Y, Manabe N. 2006. The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules. *J Reprod Dev*. 52: 695-705.

Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. 2012. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev*. 58: 44-50.

Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, David A, Becker C, Ruschendorf F, Naville D, Begeot M, Khoo B, Nurnberg P. 2005. Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet*. 37: 166-170.

Michael AE, Evagelatou M, Norgate DP, Clarke RJ, Antoniw JW, Stedman BA, Brennan A, Welsby R, Bujalska I, Stewart PM, Cooke BA. 1997. Isoforms of 11-hydroxysteroid dehydrogenase in human granulosa-lutein cells. *Mol Cell Endocrinol*. 132: 43-52.

7. Referencias Bibliográficas

Michael AE, Thurston LM, Rae MT. 2003. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction*. 126: 425-441.

Michael AE, Glenn C, Wood PJ, Webb RJ, Pellatt L, Mason HD. 2013. Ovarian 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) activity is suppressed in women with anovulatory polycystic ovary syndrome (PCOS): apparent role for ovarian androgens. *J Clin Endocrinol Metab*. 98: 3375-3383.

Mihm M, Austin EJ. 2002. The final stages of dominant follicle selection in cattle. *Domest Anim Endocrinol*. 23: 155-166.

Moberg GP. 1987. Problems in defining stress and distress in animals. *J Am Vet Med Assoc*. 191: 1207-1211.

Moberg GP. 1991. How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *J Dairy Sci*. 74: 304-311.

Montgomery A, Viveiros M, Cummings E, Liptrap R. 1997. Rate of decline of cortisol concentrations in ovarian follicles following ACTH treatment in the sow. *Can J Vet Res*. 61: 309-311.

Möstl E, Palme R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol*. 23: 67-74.

Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. 1992. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257: 1248-1251.

Mountjoy KG, Wild JM. 1998. Melanocortin-4 receptor mRNA expression in the developing autonomic and central nervous systems. *Brain Res Dev Brain Res*. 107: 309-314.

Myers M, Lamont MC, van den Driesche S, Mary N, Thong KJ, Hillier SG, Duncan WC. 2007. Role of luteal glucocorticoid metabolism during maternal recognition of pregnancy in women. *Endocrinology*. 148: 5769-5779.

Nadaraja R, Hansel W, 1976. Hormonal changes associated with experimentally produced cystic ovaries in the cow. *J Reprod Fertil*. 47: 203-208.

Nanda AS, Ward WR, Dobson H. 1989. The relationship between milk yield and cystic ovarian disease in cattle. *Br Vet J*. 145: 39-45.

7. Referencias Bibliográficas

Nanda AS, Dobson H, Ward WR. 1990. Relationship between an increase in plasma cortisol during transport-induced stress and failure of oestradiol to induce a luteinising hormone surge in dairy cows. *Res Vet Sci.* 49: 25-28.

Navarro VM, Tena-Sempere M. 2012. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol.* 8: 40-53.

Nelson ST, Martin AD, Osteras O. 2010. Risk factors associated with cystic ovarian disease in Norwegian dairy cattle. *Acta Vet Scand.* 52: 60.

Nimura M, Udagawa J, Hatta T, Hashimoto R, Otani H. 2006. Spatial and temporal patterns of expression of melanocortin type 2 and 5 receptors in the fetal mouse tissues and organs. *Anat Embryol.* 211: 109-117.

Novoselova TV, Jackson D, Campbell DC, Clark AJ, Chan LF. 2013. Melanocortin receptor accessory proteins in adrenal gland physiology and beyond. *J Endocrinol.* 217: 1-11.

Odore R, Re G, Badino P, Donn A, Vigo D, Biolatti B, Girardi C. 1999. Modifications of receptor concentrations for adrenaline, steroid hormones, prostaglandin F_{2α} and gonadotropins in hypophysis and ovary of dairy cows with ovarian cysts. *Pharmacol Res.* 39: 297-304.

Ortega HH, Lorente JA, Mira GA, Baravalle C, Salvetti NR. 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 HH, Salvetti NR, Müller LA, Amable P, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2007a. Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with Cystic Ovarian Disease. *J Comp Pathol.* 136: 222-230.

Ortega HH, Stangaferro ML, Salvetti NR, Arcangelo D. 2007b. Estudio del balance proliferación/apoptosis en estructuras foliculares de bovinos con enfermedad quística ovárica inducida experimentalmente. *Medicina* 67 (Supl. III):186.

Ortega HH, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2008. Insulin-like growth factor I in ovarian follicles and

7. Referencias Bibliográficas

follicular fluid of cows with spontaneous and induced cystic ovarian disease. *Res Vet Sci.* 84: 419-427.

Ozturk M, Smith RF, Dobson H. 1998. Effect of prolonged exposure to oestradiol on subsequent LH secretion in ewes. *J Reprod Fertil.* 114: 1-9.

Palma, GA. 2008. *Biología de la reproducción. Capítulo 2: Biología de la reproducción.* 2da. Edición. *Repro Biotec.* p. 59.

Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Müller LA, Taboada AF, Manzini RA, Ortega HH. 2007. Valoración de la exposición a luz permanente como modelo de enfermedad quística ovárica (COD) en bovinos. *Rev Med Vet.* 87: 223-226.

Paredes AH, Salvetti NR, Ortega HH, Lara HE. 2007. Liberación de Noradrenalina de diferentes estructuras foliculares de ovario de bovino. *Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile.* Iquique. Chile.

Paredes AH, Salvetti NR, Diaz AE, Dallard BE, Ortega HH, Lara HE. 2011. Sympathetic nerve activity in normal and cystic follicles from isolated bovine ovary: local effect of beta-adrenergic stimulation on steroid secretion. *Reprod Biol Endocrinol.* 9: 66.

Park E, Cockrem JF, Han KH, Kim DH, Jung MH, Chu JP. 2012. Stress-induced activation of ovarian heat shock protein 90 in a rat model of polycystic ovary syndrome. *J Obstet Gynaecol Res.* 38: 396-407.

Parrott JA, Skinner MK. 1998. Developmental and Hormonal Regulation of Keratinocyte Growth Factor Expression and Action in the Ovarian Follicle. *Endocrinology.* 139: 228-235.

Penning TM. 1997 Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocrine Rev.* 18: 281-305

Perry GA. 2012. Physiology and Endocrinology Symposium: Harnessing basic knowledge of factors controlling puberty to improve synchronization of estrus and fertility in heifers. *J Anim Sci.* 90: 1172-1182.

Peter AT, Liptrap RM. 1985. Plasma gonadotrophin levels in sows with experimental cystic ovarian follicles. *Br Vet J.* 141: 288-296.

7. Referencias Bibliográficas

Peter AT, Malven PV, Shaftoe S, Bosu WTK. 1991. Quantification of circulating beta-endorphin and white blood cells in heifers after intrauterine administration of Escherichia coli endotoxin. *Theriogenology*. 36: 1009-1014.

Peter AT. 1997. Infertility due to abnormalities of the ovaries. En: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (Ed. Youngquist, RS) WB Saunders, Philadelphia. p. 349-354.

Peter AT. 2000. Managing postpartum health and cystic ovarian disease. *Proceed Eighteenth Annual Western Canadian Dairy Seminar: Advances in Dairy Technology*. Alberta. Canada. p. 85-99.

Peter AT, Dhanasekaran N. 2003. Apoptosis of granulosa cells: a review on the role of MAPK-signaling modules. *Reprod Dom Anim*. 38: 209-213.

Peter AT. 2004. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod Dom Anim*. 39: 1-7.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29: 2003-2007.

Pierson RA, Ginther OJ. 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*. 21: 495-504.

Pierson RA, Ginther OJ. 1988. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*. 29: 21-37.

Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. 2012. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev*. 92:1235-1316.

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology*. 44: 915-923.

Rabin DS, Johnson EO, Brandon DD, Liapi C, Chrousos GP. 1990. Glucocorticoids inhibit estradiol-mediated uterine growth: possible role of the uterine estradiol receptor. *Biol Reprod*. 42: 74-80.

Ramachandrapa S, Gorrigan RJ, Clark AJ, Chan LF. 2013. The melanocortin receptors and their accessory proteins. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 4: 9.

7. Referencias Bibliográficas

Refsal KR, Jarrin-Maldonado JH, Nachreiner RF. 1987. Endocrine profiles in cows with ovarian cysts experimentally induced by treatment with exogenous estradiol or adrenocorticotrophic hormone. *Theriogenology*. 28: 871-889.

Refsal KR, Jarrin-Maldonado JH, Nachreiner RF. 1988. Basal and estradiol-induced release of gonadotropins in dairy cows with naturally occurring ovarian cysts. *Theriogenology*. 30: 679-693.

Reichardt HM, Tuckermann JP, Gottlicher M, Vujic M, Weih F, Angel P, Herrlich P, Schütz G. 2001. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J*. 20: 7168-7173.

Rey F, Rodríguez FM, Salvetti NR, Palomar MM, Barbeito CG, Alfaro NS, Ortega HH. 2010. Insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor-binding proteins in bovine cystic ovarian disease. *J Comp Pathol*. 142: 193-204.

Ribadu AY, Nakada K, Moriyoshi M, Zhang WC, Tanaka Y, Nakao T. 2000. The role of LH pulse frequency in ACTH induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim Reprod Sci*. 64: 21-31.

Ricketts ML, Verhaeg JM, Bujalska I, Howie AJ, Rainey WE, Stewart PM. 1998. Immunohistochemical localisation of type 1 11-hydroxysteroid dehydrogenase in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 83: 1325-1335.

Ricu MA, Ramirez VD, Paredes AH, Lara HE. 2012. Evidence for a celiac ganglion-ovarian kisspeptin neural network in the rat: intraovarian anti-kisspeptin delays vaginal opening and alters estrous cyclicity. *Endocrinology*. 153: 4966-4977.

Rizzo A, Campanile D, Mutinati M, Minoia G, Spedicato M, Sciorsci RL. 2011. Epidural vs intramuscular administration of lecirelin, a GnRH analogue, for the resolution of follicular cysts in dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 126: 19-22.

Roa J, Castellano JM, Navarro VM, Handelsman DJ, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2009. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides*. 30:57-66.

Roberts SJ. 1986. Cystic ovaries. In: Roberts SJ (ed.), *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases – Theriogenology*. Published by the author: Woodstock, Vermont. p. 483.

7. Referencias Bibliográficas

Robinzon B, Prough RA. 2005. Interactions between dehydroepiandrosterone and glucocorticoid metabolism in pig kidney: nuclear and microsomal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Arch Biochem Biophys.* 442: 33-40.

Robker RL, Russell DL, Yoshioka S, Chidanada Sharma S, Lydon JP, O'Malley BW, Espey LL, Richards JS. 2000. Ovulation: a multi-gene, multi-step process. *Steroids.* 65: 559-570.

Roche JF. 1996. Control and regulation of folliculogenesis-a symposium in perspective. *Rev Reprod.* 1: 19-27.

Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. 2010. Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction.* 139: 309-318.

Rodríguez FM, Salvetti NR, Colombero M, Stangaferro ML, Barbeito CG, Ortega HH, Rey F. 2013. Interaction between IGF1 and IGFBPs in bovine cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci.* 140: 14-25.

Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. 2001. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction.* 122: 215-226.

Ross M, Kaye G, Pawlina W. 2004. *Electronic Image Collection for Histology. Atext and Atlas with cell and molecular biology.* (Eds. Lippincot Williams and Wilkins). 4ta Edición.

Roth Z, Biran D, Lavon Y, Dafni I, Yakobi S, Braw-Tal R. 2012. Endocrine milieu and developmental dynamics of ovarian cysts and persistent follicles in postpartum dairy cows *J Dairy Sci.* 95: 1729-1737.

Roussel JD, Clement TJ, Aranas TJ. 1983. Changes of aldosterone in blood serum of dairy cattle during estrous cycle. *J Dairy Sci.* 66: 1734-1737.

Rutter B, Russo AF. 2000. Enfoques sobre la Dinámica, el Diagnóstico y el Tratamiento de los quistes ováricos en el Bovino. Centro Editor Dr. Edgardo Segismundo Allignani, Santa Fe, Argentina. p. 37.

Sakakura N, Takebe K, Nakagawa S. 1975. Inhibition of luteinizing hormone secretion induced by synthetic LRH by long-term treatment with glucocorticoids in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 40: 774-779.

7. Referencias Bibliográficas

Salveti NR, Gimeno EJ, Lorente JA, Ortega HH. 2004. Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. *Cells Tissues Organs*. 178: 117-125.

Salveti NR, Acosta JC, Gimeno EJ, Müller LA, Mazzini RA, Taboada AF, Ortega HH. 2007. Estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptors in normal bovine ovarian follicles and cystic ovarian disease. *Vet Pathol*. 44: 373-378.

Salveti NR, Stangaferro ML, Palomar MM, Alfaro NS, Rey F, Gimeno EJ, Ortega HH. 2010. Cell proliferation and survival mechanisms underlying the abnormal persistence of follicular cysts in bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Anim Reprod Sci*. 122: 98-110.

Salveti, NR. 2010. Caracterización de la expresión de receptores hormonales y del balance proliferación/apoptosis en las diferentes estructuras ováricas en la enfermedad quística ovárica bovina. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral. Argentina.

Salveti NR, Alfaro NS, Velázquez MM, Amweg AN, Matiller V, Díaz PU, Ortega HH. 2012. Alteration in localization of steroid hormone receptors and coregulatory proteins in follicles from cows with induced ovarian follicular cysts. *Reproduction*. 144: 723-735.

Sandrock M, Schulz A, Merkwitz C, Schoneberg T, Spanel-Borowski K, Ricken A. 2009. Reduction in corpora lutea number in obese melanocortin-4-receptor-deficient mice. *Reprod Biol Endocrinol*. 7: 24.

Sartori R, Barros CM. 2011. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*. 124: 244-250. Sasson R, Tajima K, Amsterdam A. 2001. Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2. *Endocrinology*. 142: 802-811.

Sasson R, Winder N, Kees S, Amsterdam A. 2002. Induction of apoptosis in granulosa cells by TNF alpha and its attenuation by glucocorticoids involve modulation of Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 294: 51-59.

Savio JD, Boland MP, Hynes N, Roche JF. 1990. Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. *J Reprod Fertil*. 88: 569-579.

7. Referencias Bibliográficas

Schernthaner W, Wenigerkind H, Stojkovic M, Palma GA, Mödl J, Wolf E, Brem G. 1999. Pregnancy rate after ultrasound-guided follicle aspiration in nonlactating cows from different breeds. *Zentralbl Veterinärmed A*. 46: 33-37.

Schiöth HB, Watanobe H. 2002. Melanocortins and reproduction. *Brain Res Rev*. 38: 340-350.

Schoonmaker JN, Erickson GF. 1983. Glucocorticoid modulation of follicle-stimulating hormone-mediated granulosa cell differentiation. *Endocrinology*. 113: 1356-1363.

Sciorsci RL, Bianchi P, Minoia P. 2000. High levels of endorphin and related pathologies of veterinary concern. *Immunophar Immunot*. 22: 575-626.

Seckl JR, Walker BR. 2001. 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1—a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology*. 142: 1371-1376.

Seneda MM, Esper CR, García JM, Andrade ER, Binelli M, Oliveira JA, Nascimento AB. 2003. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*. 59: 1435-1440.

Sewer MB, Waterman MR. 2003. ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech*. 61: 300-307.

Silvia WJ, Alter TB, Nugent AM, Laranja da Fonseca LF. 2002. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest Anim Endocrinol*. 23: 167-177.

Silvia WJ, McGinnis AS, Hatler TB. 2005. A comparison of adrenal gland function in lactating dairy cows with or without ovarian follicular cysts. *Reprod Biol*. 5: 19-29.

Simmons RM, Satterfield MC, Welsh Jr. TH, Bazer FW, Spencer TE. 2010. HSD11B1, HSD11B2, PTGS2, and NR3C1 expression in the periimplantation ovine uterus: effects of pregnancy, progesterone, and interferon tau. *Biol Reprod*. 82: 35-43.

Sirois J, Fortune JE. 1988. Ovarian follicular dynamics during estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod*. 39: 308-317.

Slominski A, Ermak G, Mihm M. 1996. ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin. *J Clin Endocrinol Metab*. 81: 2746-2749.

7. Referencias Bibliográficas

Smith DF, Toft DO. 1993. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol.* 7: 4-11.

Smith RF, Ghuman SP, Evans NP, Karsch FJ, Dobson H. 2003. Stress and the control of LH secretion in the ewe. *Reprod Suppl.* 61: 267-282.

Souness GW, Latif SA, Laurenzo JL, Morris DJ. 1995. 11 alpha- and 11 beta-hydroxyprogesterone, potent inhibitors of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (isoforms 1 and 2), confer marked mineralocorticoid activity on corticosterone in the ADX rat. *Endocrinology.* 136: 1809-1812.

Souness GW, Morris DJ. 1996. 11 alpha- and 11 beta-hydroxyprogesterone, potent inhibitors of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, possess hypertensinogenic activity in the rat. *Hypertension.* 27: 421-425.

Spicer LJ, Chamberlain CS. 1998. Influence of cortisol on insulin- and insulin-like growth factor 1 (IGF-1)-induced steroid production and on IGF-1 receptors in cultured bovine granulosa cells and thecal cells. *Endocrine.* 9: 153-161.

Starowicz K, Przewlocka B. 2003. The role of melanocortins and their receptors in inflammatory processes, nerve regeneration and nociception. *Life Sci.* 73: 823-847.

Sun K, Yang K, Challis JR. 1998. Regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by progesterone, estrogen, and the cyclic adenosine 5'-monophosphate pathway in cultured human placental and chorionic trophoblasts. *Biol Reprod.* 58: 1379-1384.

Sunak N, Green DF, Abeydeera LR, Thurston LM, Michael AE. 2007. Implication of cortisol and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the development of porcine (*Sus scrofa domestica*) ovarian follicles and cysts. *Reproduction.* 133: 1149-1158.

Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil.* 101: 547-555.

Suzuki C, Yoshioka K, Iwamura S, Hirose H. 2001. Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous in Holstein heifers. *Domest Anim Endocrinol.* 20: 267-278.

7. Referencias Bibliográficas

Tannin GM, Agarwal AK, Monder C, New MI, White PC. 1991. The human gene for 11-hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution and chromosomal localization. *J Biol Chem.* 266: 16653-16658.

Taylor A, Namba K. 2001. In vitro induction of CD25+ CD4+ regulatory T cells by the neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH). *Immunol Cell Biol.* 79: 358-367.

Telleria CM, Ou J, Sugino N, Ferguson S, Gibori G. 1998. The expression of interleukin-6 in the pregnant rat corpus luteum and its regulation by progesterone and glucocorticoid. *Endocrinology.* 139: 3597-3605.

Tetsuka M, Thomas FJ, Thomas MJ, Anderson RA, Mason JI, Hillier SG. 1997. Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 82: 2006-2009.

Tetsuka M, Milne M, Simpson GE, Hillier SG. 1999a. Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, glucocorticoid receptor, and mineralocorticoid receptor genes in rat ovary. *Biol Reprod.* 60: 330-335.

Tetsuka M, Haines LC, Milne M, Simpson GE, Hillier SG. 1999b. Regulation of 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression by LH and interleukin-1 in cultured rat granulosa cells. *J Endocrinol.* 163: 417-423.

Tetsuka M, Yamamoto S, Hayashida N, Hayashi KG, Hayashi M, Acosta TJ, Miyamoto A. 2003. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in bovine follicle and corpus luteum. *J Endocrinol.* 177: 445-452.

Tetsuka M. 2007. Actions of glucocorticoid and their regulatory mechanisms in the ovary. *Anim Sci.* 78: 112-120.

Tetsuka M, Nishimoto H, Miyamoto A, Okuda K, Hamano S. 2010. Gene expression of 11 β -HSD and glucocorticoid receptor in the bovine (*Bos taurus*) follicle during follicular maturation and atresia: the role of follicular stimulating hormone. *J Reprod Dev.* 56: 616-622.

7. Referencias Bibliográficas

Thörnwall M, Dimitriou A, Xu X, Larsson E, Chhajlani V. 1997. Immunohistochemical detection of the melanocortin 1 receptor in human testis, ovary and placenta using specific monoclonal antibody. *Horm Res.* 48: 215-218.

Thurston LM, Norgate DP, Jonas KC, Chandras C, Kloosterboer HJ, Cooke BA, Michael AE. 2002. Ovarian modulators of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) activity in follicular fluid from gonadotrophin-stimulated assisted conception cycles. *Reproduction.* 124: 801-812.

Thurston LM, Jonas KC, Abayasekara DR, Michael AE. 2003a. Ovarian modulators of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) activity in follicular fluid from bovine and porcine large antral follicles and spontaneous ovarian cysts. *Biol of Reprod.* 68: 2157-2163.

Thurston LM, Chin E, Jonas KC, Bujalska IJ, Stewart PM, Abayasekara DR, Michael AE. 2003b. Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) proteins in luteinizing human granulosa-lutein cells. *J Endocrinol.* 178: 127-135.

Thurston LM, Chin E, Jonas KC, Abayasekara DRE, Michael AE. 2003c. Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) proteins in luteinizing human granulosa-lutein cells. *J Endocrinol.* 178: 127-135.

Thurston LM, Abayasekara DRE, Michael AE. 2007. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase expression and activities in bovine granulosa cells and corpora lutea implicate corticosteroids in bovine ovarian physiology. *J Endocrinol.* 193: 299-310.

Tilly JL, Billig H, Kowalski KI, Hsueh AJ. 1992. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol.* 6: 1942-1950.

Vanholder T, Opsomer G, de Kruif A. 2006. Etiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nutr Dev.* 46: 105-119.

Viveiros MM, Liptrap RM. 1999. Glucocorticoid influence on porcine granulosa cell IGF-I and steroid hormone production in vitro. *Theriogenology.* 51: 1027-1043.

7. Referencias Bibliográficas

Waddel BJ, Benediktsson R, Seckl JR. 1996. 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the rat corpus luteum: induction of messenger ribonucleic acid expression and bioactivity coincident with luteal regression. *Endocrinology*. 137: 5386-5391.

Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. 2008. Androgen actions and the ovary. *Biol Reprod*. 78: 380-389.

Webb R, Gutierrez CG, Gong JG, Campbell BK. 1998. Dynamics and aetiology of ovarian follicular cysts in post-partum dairy cattle. *Reprod Domest Anim*. 33: 285-288.

Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci*. 82: 63-74.

Webb TR, Clark AJL. 2010. Minireview: The Melanocortin 2 Receptor Accessory Proteins. *Mol Endocrinol*. 24: 475-484.

Weber A, Clark AJ, Perry LA, Honour JW, Savage MO. 1997. Diminished adrenal androgen secretion in familial glucocorticoid deficiency implicates a significant role for ACTH in the induction of adrenarche. *Clin Endocrinol*. 46: 431-437.

Whorwood CB, Franklyn JA, Sheppard MC, Stewart PM. 1992. Tissue localization of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase and its relationship to the glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 41: 21-28.

Williams CY, Harris TG, Battaglia DF, Viguie C, Karsch FJ. 2001. Endotoxin inhibits pituitary responsiveness to gonadotrophin-releasing hormone. *Endocrinology* 142: 1915-1922.

Wiltbank JN. 1966. Modification of ovarian activity in the bovine following injection of oestrogen and gonadotrophin. *J Reprod Fertil*. 1: 1-10.

Wiltbank M, Gümen A, Sartori R. 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*. 57: 21-52.

Winters TA, Cook DL, Callahan CJ, Allrich RD. 1986. Induction of ovarian cysts in cattle by injection of progesterone and oestradiol-17 β . *J Anim Sci* 63: 361.

Witchel SF, Tena-Sempere M. 2013. The Kiss1 system and polycystic ovary syndrome: lessons from physiology and putative pathophysiologic implications. *Fertil Steril*. 100: 12-22.

7. Referencias Bibliográficas

Woolums AR, Peter AT. 1994b. Cystic ovarian condition in cattle. Part II. Pathogenesis and treatment. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 16: 1247-1254.

Xiao E, Xia-Zhang L, Ferin M. 2002. Inadequate luteal function is the initial clinical cyclic defect in a 12-day stress model that includes a psychogenic component in the Rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 2232-2237.

Xing Y, Parker CR, Edwards M, Rainey WE. 2010. ACTH is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells. *J Mol Endoc.* 45: 59-68.

Yong PYK, Thing KJ, Andrew R, Walker BR, Hillier SG. 2000. Development-related increase in cortisol biosynthesis by human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 85: 4728-4733.

Youngquist RS. 1986. Cystic follicular degeneration in the cow. In: Morrow DA (ed.), *Current Therapy in Theriogenology*. WB Saunders, Philadelphia, pág. 349-354.

Zulu VC, Penny C, 1998. Risk factors of cystic ovarian disease in dairy cattle. *J Reprod Physiol.* 44: 191-195.

8. Publicaciones



Expression of melanocortin receptors *mRNA*, and direct effects of ACTH on steroid secretion in the bovine ovary

A.N. Amweg^a, A. Paredes^b, N.R. Salvetti^{a,c}, H.E. Lara^b, H.H. Ortega^{a,c,*}

^a *Department of Morphological Sciences, and Centre for Experimental Biology and Laboratory Animal Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, National University of Litoral, Santa Fe, Argentina*

^b *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Universidad de Chile, Santiago, Chile*

^c *National Research Council (CONICET), Buenos Aires, Argentina*

Received 19 July 2010; received in revised form 27 August 2010; accepted 14 September 2010

Abstract

Melanocortin receptors (MCRs) are involved in physiological responses to ACTH, as well as to α -, β - and γ -melanocyte-stimulating hormone (α -, β - and γ -MSH). Their expression has previously been analyzed in various bovine tissues; however, there are apparently no reports regarding their localization in the ovaries. In the present study, the expression of MCR mRNA in various bovine ovarian structures was characterized with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Furthermore, whether ACTH affected follicular components by affecting steroid secretion in fragments of ovarian follicular wall of medium and large antral follicles cultured in serum free medium with 1, 10, and 100 nM ACTH, was also determined. *Melanocortin receptors* mRNA was localized in the theca cells of various follicular stages, whereas only *MC3R* mRNA was weakly evident in granulosa cells. *Melanocortin receptors* 1, 2, and 3 mRNA were present in the CL, whereas in stroma, only *MC2R* mRNA was expressed. There were significant increases in estradiol and cortisol concentrations in response to ACTH in medium follicles, as well as increased concentrations of testosterone and cortisol in large follicles. These results confirmed earlier reports in other species, and demonstrated that MCRs were present in bovine ovaries. Since ACTH induced steroid secretion from the ovary *in vitro*, we inferred that melanocortin peptides could be involved in regulatory mechanisms related to ovarian functions, e.g. ovulation, steroidogenesis, and luteal function.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Ovary; POMC; ACTH; Melanocortin; Cattle

1. Introduction

Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and α -, β - and γ -melanocyte-stimulating hormone (α -, β - and γ -MSH) are derived from the post-translational processing of the precursor molecule proopiomelanocortin

(POMC) [1]. These POMC products are collectively called melanocortin peptides or melanocortins. The principal source of melanocortins is the pituitary gland, but the POMC gene is also expressed in a variety of other brain regions, as well as a number of peripheral tissues, in particular skin [2].

Recognition and cloning of melanocortin receptors (MCRs) has greatly improved the understanding of peptide-target cell interactions. To date, five MCRs (termed MC1R to MC5R) have been cloned. Express-

* Corresponding author. Tel.: 54-3496-420639-223; fax: 54-3496-428576-350.

E-mail address: hhortega@fcv.unl.edu.ar (H.H. Ortega).

sion of *MC2R* mRNA was reported in the ovaries of fish [3,4] and mice [5], and *MC5R* was identified in human ovaries [6]. Furthermore, expression of MCRs has been analyzed in various bovine tissues [7–15]. However, there are apparently no reports regarding expression of specific *MCR* mRNA or its localization in ovaries. It should, however, be considered that the interactions between melanocortins and reproduction have been clearly established, associating them with various processes related to metabolism, stress, immunity, and neuroendocrine signalling pathways [2,16].

Stress-associated stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal/ovary axis disrupted reproductive function [17]. Poor ovarian follicular development, reduced ovulation rates, and ovarian cyst formation were reported following ACTH treatment and resulting increases in glucocorticoid concentrations [18–21]. Also, high glucocorticoid concentrations during the late follicular phase of the estrous cycle can disrupt gonadotropin release [22,23].

Although these studies indicated an effect of glucocorticoids at the cellular level within the ovary, little research has been performed to understand the direct effects of ACTH on ovarian function, although there could be receptors for this hormone within the ovary of some species. Therefore, the objective of the current study was to examine the expression of *MCR* mRNA in bovine ovaries using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). We postulated that these receptors, differentially expressed in ovarian components, could mediate the actions of melanocortins directly affecting follicular development and ovarian function. To confirm this, we analyzed *in vitro* the direct effects of ACTH on constitutive follicular wall steroidogenesis.

2. Materials and methods

2.1. Collection and preparation of tissues

Ovaries from 66 randomly cycling cattle with apparently normal follicular activity were collected at a local abattoir, within 20 min after death. These ovaries were from mixed breeds of *Bos taurus* cows, assessed visually as non-pregnant and with no apparent abnormality in the reproductive system. Intact ovaries were washed in sterile PBS, refrigerated, and transported immediately to the laboratory.

Each batch of ovaries was placed on ice, and antral follicles were removed using dissecting scissors. Prior to dissection of the ovaries, follicle diameter was measured with calipers, and follicular fluid from each fol-

licle was aspirated and stored separately at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pending determination of progesterone and estradiol concentrations. Follicles with an obviously atretic appearance (debris in the antrum) were discarded. Large antral follicles were obtained only from ovaries without a visible, active CL.

For RT-PCR, follicles were classified into three categories according to their calculated diameters, as described previously [24]: small ($<5\text{ mm}$, $n = 15$), medium ($5\text{--}10\text{ mm}$, $n = 15$) or large ($>10\text{ mm}$, $n = 15$). To avoid cross contamination and damage due to manipulation, only one follicular structure was obtained from each ovary. Follicles were hemisected in PBS, and granulosa cells (GCs) were gently scraped into tubes containing approximately 20 mL of sterile PBS. The cell suspension was centrifuged at $400 \times g$ for 10 min, the supernatant discarded, and the GC pellets resuspended in Trizol LS reagent (Invitrogen, Carlsbad CA, USA). Follicular walls were further washed several times with PBS to remove residual GC. The surrounding stroma was also removed from follicular walls and regarded as theca tissues [25]. Samples of CL ($n = 5$) were also obtained from cattle in the luteal phase. All samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pending total RNA extraction. The adrenal cortex, liver, spleen and spinal cord tissue and white blood cells of a non-pregnant cow, which served as both positive and negative controls (Table 1), were obtained and conserved in the same manner.

2.2. Total RNA extraction

Total RNA was isolated from the samples after treatment with Trizol LS reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions with slight modifications. Briefly, 50 to 100 mg of tissue was homogenized with 750 μL of Trizol reagent (Invitrogen) and incubated for 10 min at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, RNA was purified by vigorously homogenizing with chloroform and incubating for 15 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. After centrifugation at $12,000 \times g$, the aqueous phase was incubated with an equal

Table 1
Positive (+) and negative (–) controls used to analyze mRNA expression of melanocortin receptors in bovine tissues.

	MC1R	MC2R	MC3R	MC4R	MC5R
Liver	–	–	+	–	+
Spleen	–	–	+	–	–
Spinal cord	+	+	+	+	+
White blood cells	+	+	+	+	+
Adrenal cortex	+	+	+	+	+

For review see [1,30].

volume of isopropanol for 60 min at -80°C and centrifuged at $12,000 \times g$ to obtain the pellet of mRNA that was then washed with 75% ethanol for 10 min at 4°C . Alcohol was replaced by DEPC-water pre-warmed at 55 to 60°C . The extracted RNA was DNase treated with deoxyribonuclease I (amplification grade; Invitrogen) to eliminate contaminating DNA, assessed for quality and quantity using a fluoroscopic method (Qubit, Invitrogen), aliquoted, and stored at -80°C pending further use.

2.3. PCR primer design

2.3.1. Melanocortin receptors specific primers

Bovine sequences for MC1R, MC2R, MC3R, MC4R and MC5R were obtained from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.htm>). Specific primers were designed to obtain PCR amplification products between 400 and 500 bp, spanning two mRNA-splicing sites, using the PrimerSelect program in the LASERGENE software (DNASar, Madison, WI, USA). The primers were purchased from Invitrogen, and the sequences are summarized (Table 2). Oligonucleotide primers and amplification products were tested using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) software to confirm gene specificity and determine exon locations,

assuring that they were not designed from any homologous regions coding for other genes.

2.3.2. Other primers

The primer sequences for cytochrome P450 aromatase (*CYP19a1*) and cytochrome P450 17 α hydroxylase/17,20-lyase (*CYP17a1*) were designed following the same rules as MCR primers, and validated to confirm bovine granulosa and theca cell mRNA purity (no cross-contamination) [26]. Primers for housekeeping genes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were described previously [27].

2.4. RT-PCR

The first strand of cDNA was synthesized in a $20 \mu\text{L}$ reaction mixture using $1 \mu\text{g}$ of total RNA. The reaction tubes contained $0.25 \mu\text{L}$ random hexamers ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), $0.4 \mu\text{L}$ dNTPs (25 mM), $4 \mu\text{L}$ $5 \times$ reaction buffer, $2 \mu\text{L}$ DTT (0.1 M), $0.5 \mu\text{L}$ ribonuclease inhibitor ($40 \text{ U}/\mu\text{L}$), and $1 \mu\text{L}$ M-MLV reverse transcriptase ($200 \text{ U}/\mu\text{L}$); all reactives were from Invitrogen). Reactions were incubated at 25°C for 10 min, 37°C for 50 min, and inactivated for 15 min at 70°C .

Each PCR assay was optimized with regard to annealing temperature and magnesium (MgCl_2) concen-

Table 2
Primer sequences, regions of the target genes and conditions used for semi-quantitative RT-PCR of bovine tissues.

Name	Sequence (5'–3')	Gene accession no.	Amplicon position	Amplicon size (bp)	Annealing temperature ($^{\circ}\text{C}$)	No. cycles
<i>MC1R</i>						
Forward	CAGCCTGCTCTTCATCACCTACTA	NM_174108	808–1229	422 bp	58.8	30
Reverse	AGCACTGCAGCACCTCTTG					
<i>MC2R</i>						
Forward	GGCATTACCATCGTGACCTTC	NM_174109	609–1057	449 bp	57.2	30
Reverse	TATATCCCTGTGGCTCCTAAAATC					
<i>MC3R</i>						
Forward	CGATCCCCGTGGTCAAC	FJ433881	771–1213	443 bp	57.4	30
Reverse	GCAACTGCCCTTCATACA					
<i>MC4R</i>						
Forward	TCGATCGCGGTGGACAGGTA	NM_174110	637–1129	493 bp	58.9	32
Reverse	TCCGCAGGGCATAAATCAGAGG					
<i>MC5R</i>						
Forward	CCAGCTGCGGCACGGTCTT	NM_001015542	512–942	431 bp	57.6	32
Reverse	GCTCTGAAAACAAACAATCTCCTT					
<i>CYP17</i>						
Forward	GGAGGCGACCATCAGAGAAGTGC	NM_174304	1105–1423	319 bp	60.8	35
Reverse	CAGCCGGGACATGAAGAGGAAGAG					
<i>CYP19</i>						
Forward	TAAAACAAAGCGCCAATCTCTACG	BTCYP19	8–348	341 bp	55.4	35
Reverse	GGAACCTGCAGTGGGAAATGA					
<i>GAPDH</i>						
Forward	CACCCTCAAGATTGTCTAGCA	BC102589	492–594	103 pb	52	31
Reverse	GGTCATAAGTCCCTCCACGA					

tration. Firstly, amplification of control samples was performed with annealing temperatures between 51 and 69 °C and MgCl₂ between 1 and 2 mM, using the gradient feature of a gradient thermal cycler Techne TC-3000G (Techne Inc, Princeton, NJ, USA). The number of PCR cycles was determined in preliminary experiments by performing 20 to 35 amplification reactions. Then, PCR was carried out in a final volume of 25 µL containing 75 ng cDNA (previously quantified by the Qubit method), 1.5 mM MgCl₂, 0.5 µM forward primer, 0.5 µM reverse primer, 0.2 mM dNTP, 2.5 µL Taq buffer 10X, and 2 U Taq polymerase (5 U/µL; all reagents from Invitrogen). For every sample, cDNA (volume, 3 µL) was added to the master-mix solution. Amplification conditions included 30 to 35 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 52 to 60.8 °C (Table 2) for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min 30 s. Finally, a final extension step at 72 °C for 10 min were performed.

The PCR products were resolved by electrophoresis alongside a 1 kb DNA ladder (BioLogicos, Buenos Aires, Argentina) through a 2% agarose gel containing GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA, USA), and visualized and digitized under UV light to confirm the presence of a single band at the appropriate size. The mRNA levels of the house-keeping gene GAPDH were similar for all follicle samples. Only samples positive for GAPDH mRNA expression were used to investigate the mRNA expression of the other genes. In addition, only granulosa samples positive for *CYP19a1* mRNA and negative for *CYP17a1* mRNA and the theca samples positive for *CYP17a1* mRNA and negative for *CYP19a1* mRNA expression were used to detect MCR mRNA expression.

2.5. Image analysis

Agarose gel images were digitized using an Olympus digital camera and PCR products analyzed using the Image Pro-Plus 3.1 program (MediaCybernetic, Bethesda, MD, USA). For these assessments, *GAPDH* mRNA was selected as an internal control, since expression of *GAPDH* mRNA remained constant in all tissues studied. In comparative PCR analysis, the absolute optical density (OD) values for each PCR product were obtained by densitometry and were normalized with *GAPDH* levels, whereas relative levels of the specific mRNA were expressed in arbitrary units.

2.6. Nucleotide sequencing

The specificity of PCR products was checked by direct sequencing, to verify amplification of the correct sequences, at the University of Maine (Orono, ME, USA) DNA sequencing facility. The resulting sequences were verified using the MegAlign Tool, in the LASERGENE software (DNASStar).

2.7. Secretion of steroids by the follicular wall

The size of bovine ovaries precluded the whole-ovary culture system used successfully with rodents [28,29], but these methods can be adapted to permit follicle wall culture. In a laminar flow hood, ovaries were rinsed, and medium and large antral follicles were taken using a scalpel and placed in Krebs-Ringer bicarbonate buffer pH 7.4 (in mM: NaCl, 118; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄, 1.2; CaCl₂, 25; NaHCO₃, 2.5; glucose, 11.5; bovine serum albumin, 0.1%; and ascorbic acid, 100 µg/mL; all were obtained from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). The culture medium had previously been equilibrated for 2 h in a humidified incubator (Forma Scientific 3154 Water-Jacketed Incubator, Asheville, NC, USA) gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ at 37 °C. Small follicles were not cultured because was technically impossible to obtain enough tissue samples without stromal contamination.

Each large antral follicle was sectioned into four fragments (one for basal and three for treatments, approximately 50 mg each). For each medium follicle, only one fragment was obtained for each follicle and different follicles were used for each treatment. The fragments were cultured on 24-well (1.5 mL medium/well) culture plate (Nunc plate, Applied Scientific, South San Francisco, CA, USA), and incubated in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4 for 20 min. After pre-culture, tissues were placed in medium with 1, 10, or 100 nM ACTH (Laboratorios ELEA, Buenos Aires, Argentina) for 3 h at 37 °C. As a control (basal secretion), tissues were incubated in the same way without ACTH. Each set of cultures (n = 4) was performed under identical conditions. Then, the culture media was taken from each well and maintained at –20 °C until assayed.

2.8. Hormone assays

Estradiol, progesterone, testosterone, and cortisol secreted into the incubation medium were measured by ELISA kits (Estradiol EIA, DSL-10-4300; Progesterone EIA, DSL-10-3900; Testosterone EIA, DSL-10-4000; Cortisol DSL-1-200; Diagnostic Systems Labo-

Table 3

Mean \pm SEM concentrations of estradiol and progesterone in the follicular fluid of small, medium, and large bovine antral follicles.

Steroid (ng/mL)	Small	Medium	Large
Estradiol	97.31 \pm 6.65 ^a	143 \pm 12.48 ^{a,b}	282.41 \pm 22.18 ^b
Progesterone	62.12 \pm 9.01	66.75 \pm 10.72	81.52 \pm 9.48

^{a,b} Within a row, means without a common superscript differed ($P < 0.05$).

ratories, Webster, TX, USA), according to the manufacturer's instructions. The concentrations of progesterone and estradiol were also determined directly in the follicular fluid. The assay sensitivity was 7 pg/mL for estradiol, 0.13 ng/mL for progesterone, 0.04 ng/mL for testosterone, and 0.10 μ g/dL for cortisol. For incubation medium, results were normalized in relation to tissue weight and expressed as hormone concentration/mg of tissue.

2.9. Statistical analyses

A statistical software package (SPSS 11.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used to perform all statistical tests. The relative levels of the specific MCRs mRNA in ovarian components and the effects of different concentrations of ACTH on the secretion of steroids in culture medium were compared by ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests. The comparison of basal secretion between medium and large antral follicles was performed using a nonpaired two-tailed Student's *t*-test. Regression analysis was used to determine the dose-response effects. For all statistical analyses, $P < 0.05$ was considered significant. Results are expressed as mean \pm SEM.

3. Results

3.1. Follicular characterization

Concentrations of estradiol and progesterone in the follicular fluid from various follicular sizes are shown (Table 3). All follicles were categorized as estrogen-active, with an increase in large antral follicles ($P < 0.05$). However, progesterone concentrations were not significantly different among follicle categories.

3.2. Melanocortin receptors mRNA expression

Expression of MCRs mRNA were compared among RT-PCR samples containing the same amount of GAPDH cDNA. Controls were performed in parallel using water (no cDNA) and RNA samples (without RT), and no PCR product was visible. All granulosa

samples were positive for *CYP19a1* mRNA and negative for *CYP17a1* mRNA, whereas theca samples were positive for *CYP17a1* mRNA and negative for *CYP19a1* mRNA expression. Data obtained in representative RT-PCRs for all primers in ovarian and control tissues are shown (Fig. 1 and 2).

The identity of the MCRs PCR products was confirmed by sequencing (range 97–99% homology with bovine sequences). *Melanocortin receptor 1* mRNA was weakly detected in the theca of small and medium antral follicles and higher ($P < 0.05$) in CL. The theca in large antral follicles, granulosa cells and stroma showed no expression. *Melanocortin receptor 2* mRNA levels were moderate in the theca cells of small and medium follicles and CL, and low ($P < 0.05$) in the theca of large antral follicles and stroma. No specific MC2R mRNA was detected in the granulosa.

The expression of MC3R mRNA was moderate in the theca cells of small antral follicles, but weak in the theca of medium and large antral follicles. The GC had a low expression, but CL a strong expression of MC3R mRNA ($P < 0.05$). No MC3R mRNA was detected in stroma. *Melanocortin receptor 4* mRNA was moderately expressed in the theca cells of small and medium antral follicles, whereas MC5R mRNA was only weakly expressed in the theca cells of small and medium antral follicles, with a decrease in the theca of large antral follicles ($P < 0.05$). No MC4R or MC5R mRNA was identified in the granulosa, CL, or stroma.

The comprehensive screening of MCRs mRNA in various organs and tissues was performed to check the specificity of the primers (Table 1, Fig. 1). In the spleen, only a moderate expression of MC3R was observed, whereas in the liver, a high expression of MC3R and low expression of MC5R were evident. In the spinal cord, the expression of all MCRs was weakly detected, except MC2R (strongly detected). In white blood cells, MC1R, MC2R and MC3R were moderately expressed, whereas MC4R and MC5R had a low expression. Finally, in the adrenal cortex a high expression of MC2R, a moderate expression of MC1R and MC3R, and a low expression of MC4R and MC5R were observed.

3.3. Effects of ACTH on the secretion of steroids by the follicular wall

After incubating for 3 h, basal levels of steroids secretion were detected in all samples, whereas secretion of estradiol, progesterone and testosterone were significantly lower in small antral follicles, and cortisol was higher in large antral follicles (Fig. 3).

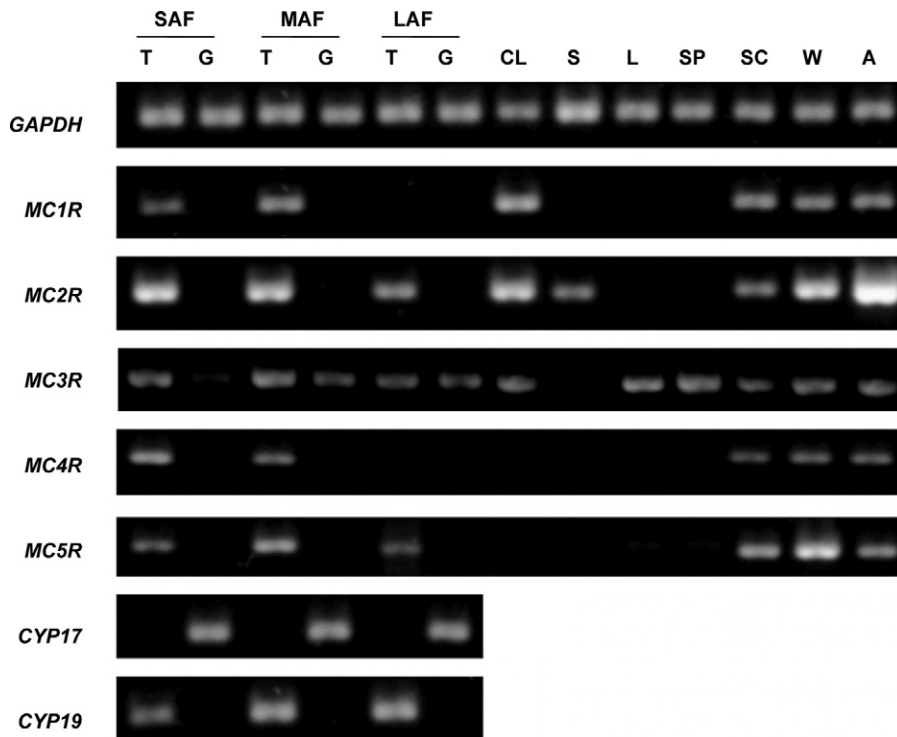


Fig. 1. Gel electrophoresis of specific RT-PCR products, showing the expression of specific primers in bovine ovarian components and control tissues.

SAF, small antral follicle; MAF, medium antral follicle; LAF, large antral follicle; G, granulosa; T, theca; CL, corpus luteum; S, stroma; L, liver; SP, spleen; SC, spinal cord; W, white blood cells; A, adrenal cortex.

In medium antral follicles, progesterone and testosterone secretion was not modified by a range of increasing doses of ACTH in the incubation medium. However there were dose-dependent increases for estradiol and cortisol, with a significant increase in response to 10 and 100 nM ACTH. In large follicles, progesterone and estradiol secretion was not modified by the presence of ACTH. A significant dose-dependent increase however was evident in testosterone and cortisol secretion. Significantly higher values of cortisol and testosterone secretion also occurred in response to 10 and 100 nM ACTH.

4. Discussion

In this study, there was clear evidence that mRNA for all MCRs was expressed in bovine ovaries. The use of bovine primers and the results of controls tissues were in agreement with the expression patterns of MCRs previously described [1,30] and were also confirmed by sequencing. Based on semi-quantitative analyses, relative levels of mRNA for various MCRs changed at each stage of follicular development. There-

fore, this study was undertaken to determine the gene expression of all components in a single study, to start to establish a relationship among various subtypes of the receptors in ovarian structures. Overall, the present results confirmed earlier reports in other species, and introduced new findings, including the existence of additional receptors in various ovarian components.

Unfortunately, there are no antibodies for MCRs for immunohistochemical or western blot studies with bovine tissues. Although we only demonstrated the presence of mRNA coding for the MCRs, not the protein, our findings confirmed previously published reports describing the presence of MC2R and MC5R in ovaries of various species [1,4]. To our knowledge, there has been no investigation into the expression and localization of MC1R, MC3R, and MC4R in reproductive organs. In this sense, although ACTH bound to all MCRs, it has been hypothesized that it exerts its effects on follicular steroidogenesis via MC2R and MC5R, thereby centralizing the studies on these receptors. Nonetheless, MC1R, MC3R and MC4R might also mediate actions related to other functions in ovarian physiology.

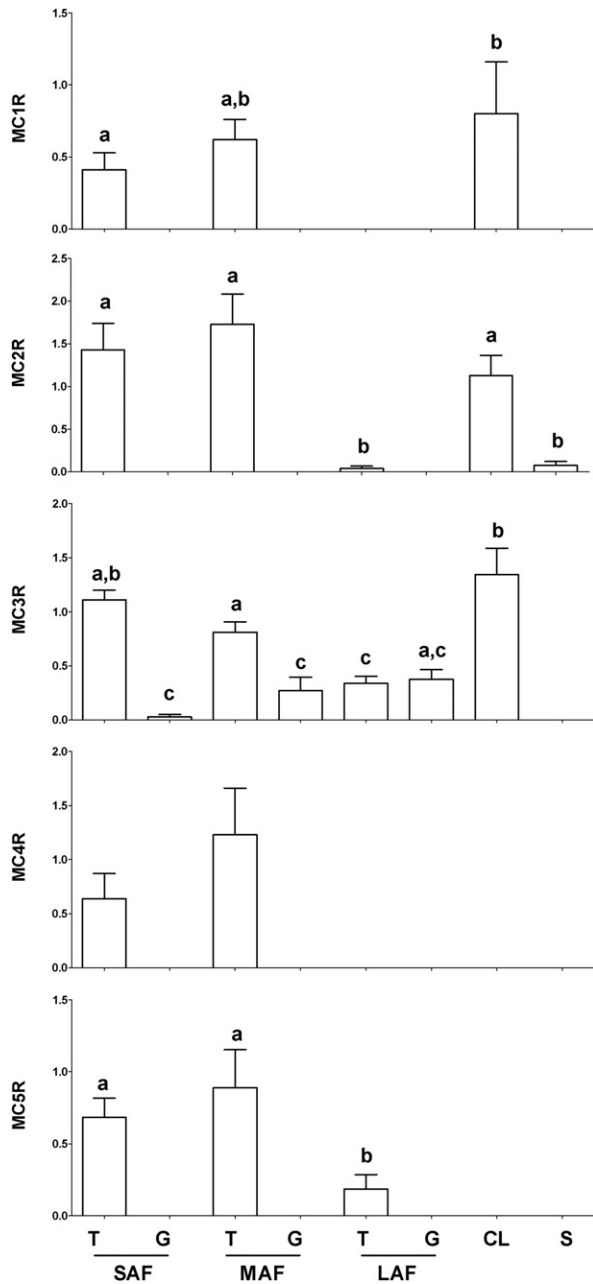


Fig. 2. Mean (\pm SEM) relative expression of melanocortin receptors (mRNA MCRs/mRNA GDPH) in bovine ovarian components and control tissues.

SAF, small antral follicle; MAF, medium antral follicle; LAF, large antral follicle; G, granulosa; T, theca; CL, corpus luteum; S, stroma; L, liver; SP, Spleen; SC, spinal cord; W, white blood cells; A, adrenal cortex.

^{a,b}Means without a common superscript differed ($P < 0.05$).

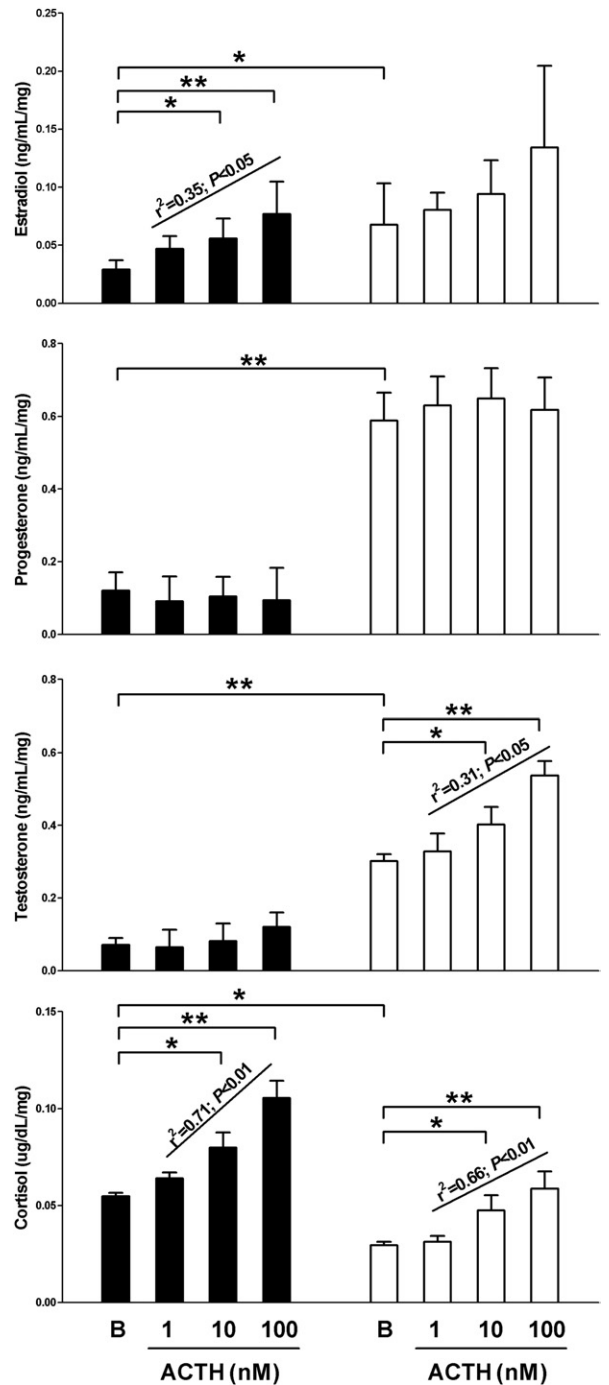


Fig. 3. Mean (\pm SEM) effects of ACTH on the secretion of steroids by the follicular wall of medium (black bar) and large (white bar) bovine antral follicles. Differences relative to basal secretion and differences in basal secretion between medium and large antral follicles are indicated: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

Dose-response effects are also indicated.

Few studies have addressed the role of MCRs in mediating the effects of melanocortins on reproduction. It is well known that ACTH is acutely released from the pituitary gland in response to stressor stimulation and is the primary signal for adrenal cortisol biosynthesis. The stress-induced release of glucocorticoids is known to inhibit the immune [31], reproductive [20,32], and endocrine [33] systems. Furthermore, exogenous ACTH treatment in cattle, which increases endogenous cortisol secretion, induces follicular cysts [34,35]. An intra-ovarian effect of ACTH has been demonstrated in fish, where ACTH suppresses gonadotrophin-stimulated E2 production in ovarian follicles, and the expression of MC2R in ovaries and testes suggest a role for ACTH in modulating gonadal function throughout MCRs [4]. In agreement with this, in the present study, MC2R mRNA (the major signaling receptor for ACTH in the adrenal gland) and MC5R mRNA were expressed mainly in the theca cells of small and medium follicles, but not in the CL. Because theca cells express *CYP17a1*, a key enzyme in the steroidogenic pathway that produces the precursors of cortisol [4,36], it was expected that cortisol secretion could be stimulated by ACTH, by the presence of their receptors in theca.

In this study, basal secretion of estradiol, progesterone and testosterone were lower in medium than in large antral follicles, in agreement with previous results [37]. In contrast, basal cortisol secretion was higher in medium antral follicles than in large antral follicles. Giving ACTH to gilts during the luteal phase significantly elevated both plasma and intrafollicular cortisol concentrations [38] without disrupting gonadotrophin secretion [39]. Acosta et al [40] reported a temporal rise in follicular cortisol concentrations occurred around the preovulatory LH surge in cattle and that although concentrations of active glucocorticoids were suppressed during ovarian follicular development and maturation, they were increased during the ovulatory process triggered by an LH surge, suggesting a functional role for ACTH in the stimulation of ovarian cortisol secretion. In addition, that the follicular wall of medium antral follicles had higher levels of MCRs could be related to the stimulatory effect of ACTH on estradiol and cortisol secretion. The expression of MC2R could also be associated with the stimulatory effect of ACTH on testosterone secretion in large antral follicles, perhaps associated with a decrease in P450 aromatase activity. If we take into account the differentiation of follicular walls, the increased ACTH secretion previously reported during stress in cattle [41] could be responsible

for the increase in testosterone that characterized cystic follicles during COD in cattle.

By contrast, evidence has accumulated to support the role of the immune system in reproduction. In these processes, cytokines act through either a paracrine or autocrine mechanism and are involved in follicle rupture and remodeling, leukocyte infiltration, angiogenesis, steroid hormone production, and oocyte maturation [42,43]. In addition, many features of the ovulatory process are common in the inflammatory process, and ovulation is often likened to an acute inflammation [43,44]. In these contexts, our findings contributed to the hypothesis that attributed anti-cytokine and anti-inflammatory effects to melanocortin peptides [45]. Virtually all cells responsive to the anti-inflammatory effect of melanocortins express MC1R, the receptor with the greatest affinity for α -MSH [1]. Consistent with the idea of multiple receptor involvement in the anti-inflammatory effects of melanocortins, we found the evident expression of MC1R and MC3R in the CL and some components of the follicular wall, which could indicate a close interaction between the immune and reproductive functions mediated by melanocortins. Also, although neither MC3R nor MC4R knockout mice have shown any obvious malfunction in reproduction [2], the CL was decreased in MC4R^{-/-} mice [46], supporting a role in the ovarian physiology.

To conclude, we demonstrated for the first time that MCRs mRNA were present in bovine ovaries and that ACTH affected steroid secretion in bovine ovarian follicles. We inferred that melanocortins, through their stimulatory effect on steroid secretion, could be directly involved in the regulatory mechanisms of ovarian function.

Acknowledgments

We are grateful to Michael López Cepeda for technical support. This study was supported by a grant from the Argentine National Agency for the Promotion of Science and Technology (ANPCyT) (PICT 2007-01193) and MINCYT (Argentina)-CONICYT (Chile) International cooperation grant CH/08/04.

References

- [1] Catania A, Gatti S, Colombo G, Lipton JM. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol Rev* 2004;56:1–29.

- [2] Schioth HB, Watanobe H. Melanocortins and reproduction. *Brain Res Brain Res Rev* 2002;38:340–50.
- [3] Aluru N, Vijayan MM. Molecular characterization, tissue-specific expression, and regulation of melanocortin 2 receptor in rainbow trout. *Endocrinology* 2008;149:4577–88.
- [4] Alsop D, Ings JS, Vijayan MM. Adrenocorticotrophic hormone suppresses gonadotropin-stimulated estradiol release from zebrafish ovarian follicles. *PLoS One* 2009;4:e6463.
- [5] Nimura M, Udagawa J, Hatta T, Hashimoto R, Otani H. Spatial and temporal patterns of expression of melanocortin type 2 and 5 receptors in the fetal mouse tissues and organs. *Anat Embryol (Berl)* 2006;211:109–17.
- [6] Chhajlani V. Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem Mol Biol Int* 1996;38:73–80.
- [7] Raikhinshstein M, Hanukoglu I. Mitochondrial-genome-encoded RNAs: differential regulation by corticotropin in bovine adrenocortical cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10509–13.
- [8] Vanetti M, Schonrock C, Meyerhof W, Holtt V. Molecular cloning of a bovine MSH receptor which is highly expressed in the testis. *FEBS Lett* 1994;348:268–72.
- [9] Liakos P, Chambaz EM, Feige JJ, Defaye G. Expression and regulation of melanocortin receptor-5 (MC5-R) in the bovine adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* 2000;159:99–107.
- [10] Haegeman A, Coopman F, Jacobs K, Mattheeuws M, Van ZA, Peelman L. Bovine melanocortin receptor 4: cDNA sequence, polymorphisms and mapping. *Anim Genet* 2001;32:189–92.
- [11] Maudet C, Taberlet P. Holstein's milk detection in cheeses inferred from melanocortin receptor 1 (MC1R) gene polymorphism. *J Dairy Sci* 2002;85:707–15.
- [12] Doghman M, Delagrangre P, Blondet A, Berthelon MC, Durand P, Naville D, et al. Agouti-related protein antagonizes glucocorticoid production induced through melanocortin 4 receptor activation in bovine adrenal cells: a possible autocrine control. *Endocrinology* 2004;145:541–7.
- [13] Valle E, Habermann FA, Moore SS, Crews DH, Benkel BF. Genomic localization and SNP discovery in the bovine melanocortin receptor 4 gene (MC4R). *Anim Genet* 2004;35:351–2.
- [14] Gan HY, Li JB, Wang HM, Gao YD, Liu WH, Li JP, et al. [Relationship between the melanocortin receptor 1 (MC1R) gene and the coat color phenotype in cattle]. *Yi Chuan* 2007;29:195–200.
- [15] Mohanty TR, Seo KS, Park KM, Choi TJ, Choe HS, Baik DH, et al. Molecular variation in pigmentation genes contributing to coat colour in native Korean Hanwoo cattle. *Anim Genet* 2008;39:550–3.
- [16] Hohmann JG, Teal TH, Clifton DK, Davis J, Hruby VJ, Han G, et al. Differential role of melanocortins in mediating leptin's central effects on feeding and reproduction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278:R50–9.
- [17] Moberg GP. A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animals. *J Anim Sci* 1987;65:1228–35.
- [18] Kawate N, Inaba T, Mori J. Changes in plasma concentrations of gonadotropins and steroid hormones during the formation of bovine follicular cysts induced by the administration of ACTH. *J Vet Med Sci* 1996;58:141–4.
- [19] Liptrap RM, McNally PJ. Steroid concentrations in cows with corticotropin-induced cystic ovarian follicles and the effect of prostaglandin F2alpha and indomethacin given by intrauterine injection. *Am J Vet Res* 1976;37:369–75.
- [20] Liptrap RM. Stress and reproduction in domestic animals. *Ann N Y Acad Sci* 1993;697:275–84.
- [21] Dobson H, Ribadu AY, Noble KM, Tebble JE, Ward WR. Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle. *J Reprod Fertil* 2000;120:405–10.
- [22] Barb CR, Kraeling RR, Rampacek GB, Fonda ES, Kiser TE. Inhibition of ovulation and LH secretion in the gilt after treatment with ACTH or hydrocortisone. *J Reprod Fertil* 1982;64:85–92.
- [23] Li PS, Wagner WC. In vivo and in vitro studies on the effect of adrenocorticotrophic hormone or cortisol on the pituitary response to gonadotropin releasing hormone. *Biol Reprod* 1983;29:25–37.
- [24] Peter AT, Levine H, Drost M, Bergfeldt DR. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology* 2009;71:1343–57.
- [25] Sudo N, Shimizu T, Kawashima C, Kaneko E, Tetsuka M, Miyamoto A. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: relationship among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). *Mol Cell Endocrinol* 2007;264:197–203.
- [26] Lagaly DV, Aad PY, Grado-Ahuir JA, Hulsey LB, Spicer LJ. Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Mol Cell Endocrinol* 2008;284:38–45.
- [27] Shibaya M, Matsuda A, Hojo T, Acosta TJ, Okuda K. Expressions of estrogen receptors in the bovine corpus luteum: cyclic changes and effects of prostaglandin F2alpha and cytokines. *J Reprod Dev* 2007;53:1059–68.
- [28] Acuna E, Fornes R, Fernandois D, Garrido MP, Greiner M, Lara HE, et al. Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:64.
- [29] Dorfman M, Ramirez VD, Stener-Victorin E, Lara HE. Chronic-intermittent cold stress in rats induces selective ovarian insulin resistance. *Biol Reprod* 2009;80:264–71.
- [30] Getting SJ. Targeting melanocortin receptors as potential novel therapeutics. *Pharmacol Ther* 2006;111:1–15.
- [31] Sapolsky RM. Stress hormones: good and bad. *Neurobiol Dis* 2000;7:540–2.
- [32] Echterkamp SE. Relationship between LH and cortisol in acutely stressed beef cows. *Theriogenology* 1984;22:305–11.
- [33] Vighio GH, Liptrap RM. Plasma hormone concentrations after administration of dexamethasone during the middle of the luteal phase in cows. *Am J Vet Res* 1990;51:1711–4.
- [34] Ribadu AY, Nakada K, Moriyoshi M, Zhang WC, Tanaka Y, Nakao T. The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim Reprod Sci* 2000;64:21–31.
- [35] Ortega HH, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, et al. Insulin-like growth factor I in sera, ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous or induced cystic ovarian disease. *Res Vet Sci* 2008;84:419–27.
- [36] Garverick HA, Baxter G, Gong J, Armstrong DG, Campbell BK, Gutierrez CG, et al. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. *Reproduction* 2002;123:651–61.
- [37] Gregoraszczyk EL, Wojtowicz AK, Ptak A, Nowak K. In vitro effect of leptin on steroids' secretion by FSH- and LH-treated porcine small, medium and large preovulatory follicles. *Reprod Biol* 2003;3:227–39.

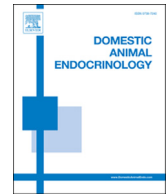
- [38] Montgomery A, Viveiros M, Cummings E, Liptrap R. Rate of decline of cortisol concentrations in ovarian follicles following ACTH treatment in the sow. *Can J Vet Res* 1997;61:309–11.
- [39] Frautschy SA, Liptrap RM. Anovulation and plasma hormone concentrations after administration of dexamethasone during the middle of the luteal phase in sows undergoing estrous cycles. *Am J Vet Res* 1988;49:1270–5.
- [40] Acosta TJ, Tetsuka M, Matsui M, Shimizu T, Berisha B, Schams D, et al. In vivo evidence that local cortisol production increases in the preovulatory follicle of the cow. *J Reprod Dev* 2005;51:483–9.
- [41] Dobson H, Smith RF. Stress and reproduction in farm animals. *J Reprod Fertil Suppl* 1995;49:451–61.
- [42] Kucharski J, Jana B. Immuno-endocrine mechanisms connected with the creation of corpora lutea persistent in animal ovaries. *Pol J Vet Sci* 2005;8:255–9.
- [43] Bukovsky A, Caudle MR. Immune physiology of the mammalian ovary - a review. *Am J Reprod Immunol* 2008;59:12–26.
- [44] Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* 1994;50:233–8.
- [45] Lipton JM, Catania A. Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH. *Immunol Today* 1997;18:140–5.
- [46] Sandrock M, Schulz A, Merkwitz C, Schoneberg T, Spaniel-Borowski K, Ricken A. Reduction in corpora lutea number in obese melanocortin-4-receptor-deficient mice. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:24.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Domestic Animal Endocrinology

journal homepage: www.domesticanimalendo.com

Ovarian localization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD): effects of ACTH stimulation and its relationship with bovine cystic ovarian disease

A.N. Amweg^{a,b}, N.R. Salvetti^{a,b}, M.L. Stangaferro^b, A.H. Paredes^c, H.H. Lara^c,
F.M. Rodríguez^{a,b}, H.H. Ortega^{a,b,*}

^aLaboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina

^bInstituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, (CONICET), Argentina

^cLaboratorio de Neuroquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Chile

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2013

Received in revised form 15 July 2013

Accepted 16 July 2013

Keywords:

Cystic ovarian disease

ACTH

Cow

Cortisol

11 β HSD

ABSTRACT

Cystic ovarian disease (COD) is an important cause of infertility in cattle, and ACTH has been involved in regulatory mechanisms related to ovarian function associated with ovulation, steroidogenesis, and luteal function. Here, we examined the localization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β HSD1) and 11 β HSD2 proteins in the ovary of healthy cows and animals with spontaneous and ACTH-induced COD and the in vitro response of the follicular wall exposed to ACTH. After stimulation by ACTH, we documented changes in 11 β HSD expression and cortisol secretion by the follicular wall of large antral and follicular cysts. Follicular cysts showed a higher constitutive expression of both enzymes, whereas ACTH induced an increase in 11 β HSD1 in tertiary follicles and follicular cysts and a decrease in 11 β HSD2 in follicular cysts. Moderate expression of 11 β HSD1 was observed by immunohistochemistry in granulosa of control animals, with an increase ($P < 0.05$) from primary to secondary, tertiary, and atretic follicles. The level of immunostaining in theca interna was lower than that in granulosa. The expression of 11 β HSD2 was lower in the granulosa of primary follicles than in that of secondary, tertiary, and atretic follicles and was lower in the theca interna than in the granulosa. In ACTH-induced and spontaneously occurring follicular cysts, differences from controls were observed only in the expression of 11 β HSD1 in the granulosa, being higher ($P < 0.05$) than in tertiary follicles. These findings indicate that follicular cysts may be exposed to high local concentrations of active glucocorticoids and indicate a local role for cortisol in COD pathogenesis and in regulatory mechanisms of ovarian function.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Stress-associated stimulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal/ovarian axis has been reported to disrupt the reproductive function and has been associated with the pathogenesis of bovine cystic ovarian disease (COD) [1]. Poor follicle development, reduced ovulation rates, and

follicular cyst formation have been reported in association with ACTH treatment and increased concentrations of glucocorticoids [2–5]. Recently, we have confirmed the expression of ACTH receptors in bovine ovaries [6]. The fact that ACTH is able to induce steroid secretion from the ovary in vitro strongly indicates that ACTH could be involved in regulatory mechanisms related to ovarian function associated with ovulation, steroidogenesis, and luteal function [6].

The most widely accepted hypothesis to explain the formation of follicular cysts is that LH release from the

* Corresponding author.

E-mail address: hhortega@fcv.unl.edu.ar (H.H. Ortega).

hypothalamus-pituitary is altered [7–12]. In this sense, exogenous glucocorticoids prolong the estrous cycles of cattle [13,14], presumably by inhibiting LH secretion by the anterior pituitary [15,16] and by directly inhibiting the follicular function [17–19]. Exogenous ACTH treatment in cattle increases endogenous cortisol secretion, thus inducing follicular cysts [2,5,20]. It has been proposed that the action of glucocorticoids on ovarian function would be antagonistic to that on reproductive function [21], with a direct effect on granulosa cells down-regulating the production of steroids and prostaglandins and the expression of LH receptors [18,22,23]. Because ovulation is an inflammatory event characterized by increased synthesis of interleukins and prostaglandins [24–26], an increased generation of anti-inflammatory glucocorticoids during ovulation would help limit inflammatory process in the ovary [27–29]. However, extreme situations could affect the normal ovulatory mechanism, altering the estrous cycle.

Although the ovary would not be able to produce glucocorticoids *de novo* [30], ACTH is able to stimulate cortisol secretion from cultured bovine follicular walls [6]. Moreover, the access of active cortisol to target tissues is regulated by the relative expression of two 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) enzymes: a bidirectional 11 β HSD type 1 (11 β HSD1), which mainly activates corticosterone to cortisol, and 11 β HSD type 2 (11 β HSD2), which inactivates cortisol to cortisone [31,32].

Both 11 β HSD1 and 11 β HSD2 mRNAs have been identified in the bovine ovary [32], and their expression and activity have been associated with follicular development and maturation [33,34]. In follicular fluid of bovine follicular cysts, changes have been observed in the profile of these enzymes, with a decrease in 11 β HSD1 activity [35]. Although mRNA expression of the two 11 β HSD isoforms has been detected in bovine ovaries, little is known about 11 β HSD protein expression and localization. In the present study, we examined the *in vivo* expression of 11 β HSD1 and 11 β HSD2 proteins in the ovary of healthy cows and animals with spontaneous and ACTH-induced COD, and we studied the effect of *in vitro* stimulation of the follicular wall with ACTH on 11 β HSD1 and 11 β HSD2 protein expression, as well as changes in steroid hormones secretion.

2. Materials and methods

2.1. *In vivo* ACTH treatment

All the procedures were approved by the Institutional Ethics and Security Committee (Faculty of Veterinary Sciences – Universidad Nacional del Litoral, Argentina) and are consistent with [36]. Fifteen nulliparous Holstein heifers (age, 18–24 mo; body weight, 400–450 kg) were assigned to the control ($n = 10$) or treated ($n = 5$) groups.

Ovulation of all heifers was hormonally synchronized by the OvSynch protocol [37]. All heifers received 10 μ g of a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analog (buserelin acetate, Gonaxal; Biogénesis-Bagó, Garín, Argentina) on day –9 (see below), 150 μ g of a prostaglandin F2 α analog (D+Cloprostenol, Enzaprost D-C; Biogénesis-Bagó) on day –2, and 10 μ g of a GnRH analog on day 0. The time of the

ovulation was monitored by transrectal ultrasonography and was designated as day 1 of the estrous cycle (Fig. 1), because, as described by Pursley et al [37], ovulation occurs 24 to 32 h after the second injection of GnRH.

The model of ACTH-induced ovarian follicular cysts used in the present study has been previously described [5,20,38,39]. Briefly, beginning on day 15 of a synchronized estrous cycle, 5 heifers received subcutaneous injections of 1 mg of a synthetic polypeptide with ACTH activity (Synacthen Depot; Novartis, Basel, Switzerland) every 12 h for 7 d (treated group). The other 10 animals received saline solution (1 mL) (control group).

Ovarian ultrasonographic examinations were performed in all animals, using a real-time, B-mode scanner equipped with a 5-MHz, linear-array, transrectal transducer (Honda HS101V, Tokyo, Japan) [40]. The growth and regression of follicles >5 mm, corpora lutea, and follicular cysts were monitored. Daily ovarian ultrasonography was performed through a complete estrous cycle in untreated (control) heifers (21–23 d) and from day 14 (day 0 = day of ovulation) until ovariectomy on approximately day 48 in ACTH-treated heifers. Follicular cysts detected by ultrasonography were defined as any follicular structure with a diameter ≥ 20 mm present for ≥ 10 d, without ovulation or corpus luteum (CL) formation [5]. The first day of follicular cyst formation was the day a follicle attained ≥ 20 mm in diameter, and the ovaries were removed 10 d later by flank laparotomy (approximately day 48). In 5 heifers of the estrus-synchronized control group, ovariectomy was conducted when the dominant follicle reached a diameter >10 mm, in the absence of an active CL, to obtain preovulatory follicles (approximately day 18). The remaining 5 animals of the estrus-synchronized control group were subjected to daily blood sampling for hormonal determinations.

To clarify the effects of ACTH on steroid hormone concentrations, blood samples were taken from the coccygeal vein from 5 estrus-synchronized control and 5 ACTH-treated heifers every 24 h between day 15 and day 28 (Fig. 1). In addition, samples were collected just before ovariectomy in control and treated animals. Blood tubes were refrigerated after collection, and serum was separated within 2 h and stored at –20°C until hormone analysis.

2.2. Collection of spontaneous cysts

For immunohistochemistry, ovaries with spontaneous follicular cysts were collected from cows at local dairy farms. The diagnosis and confirmation was done with transrectal ultrasonography (5-MHz linear transducer, Honda HS101V). Ten Argentinean Holstein cows that showed ≥ 1 follicular cysts of ≥ 20 mm in diameter persisting for at least 10 d in the absence of a CL were selected. The ovaries were removed by transvaginal ovariectomy, and blood samples were collected just before surgery for hormone analysis.

For tissue culture, ovaries with large antral follicles (>10 mm; $n = 12$) and with spontaneous follicular cysts ($n = 12$) were collected at a local abattoir, within 20 min of death, from mixed breeds of Argentinean Holstein cows assessed visually as being nonpregnant without macroscopic

abnormalities in the reproductive system and immediately were transported to the laboratory.

2.3. Immunohistochemistry

Histologic ovarian sections from ACTH-treated cows, cows with spontaneous follicular cysts obtained from dairy herds, and estrus-synchronized controls were used for immunohistochemistry to locate and quantify the protein expression of 11 β HSD1 and 11 β HSD2 in follicular walls. During the dissection of the ovaries, the external follicular diameter was measured with calipers, and follicular fluid from each follicle was aspirated and stored separately at -20°C . The health status of the follicles was confirmed by the hormone concentrations in the follicular fluid, considering normal follicles (healthy, nonatretic) those with high concentrations of estradiol ($>150\text{ pg/mL}$), low progesterone (80 ng/mL), and low testosterone-to-estrogen ratio. Ovaries were fixed in 4% buffered formaldehyde for 8 h at 4°C , dehydrated, and embedded in paraffin. Sections ($5\text{ }\mu\text{m}$ thick) were mounted on slides previously treated with 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and primarily stained with hematoxylin–eosin for a preliminary observation of all ovarian structures. For immunohistochemical studies, follicles were classified into the following groups: primary, secondary, tertiary (antral), and atretic follicles and follicular cysts [20,38,41,42].

The details, suppliers, and concentrations of the antibodies used are reported in Table 1. Each antibody was measured in at least 5 sections of each ovary from each animal. The homology between the target peptide of each antibody and the correspondent bovine protein was tested with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST software; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) to determine the peptide location and to confirm antigen specificity.

A streptavidin-biotin immunoperoxidase method was performed as previously described [43,44]. Briefly, after deparaffinization, microwave pretreatment (antigen retrieval) was performed by incubating the sections in 0.01M citrate buffer (pH 6). Endogen peroxidase activity was inhibited with 3% (vol/vol) H_2O_2 in methanol, and nonspecific binding was blocked with 10% (vol/vol) normal goat serum. All sections were incubated with the primary antibodies for 18 h at 4°C and then for 30 min at room temperature with biotinylated secondary antibodies selected specifically for each of the 2 types of primary antibodies used. The antigens were visualized by streptavidin-peroxidase (BioGenex, San Ramon, CA), and 3,3-diaminobenzidine (Liquid DAB-Plus Substrate Kit; Zymed, San Francisco, CA) was used as the chromogen. Finally, the slides were washed in distilled water, counterstained with Mayer hematoxylin, dehydrated, and mounted.

To verify immunoreaction specificity, adjacent control sections were subjected to the same immunohistochemical method, replacing primary antibodies with nonimmune serum. To exclude the possibility of nonsuppressed endogenous peroxidase activity, some sections were incubated with diaminobenzidine alone.

Microscopic images were digitized with a CCD color video camera (Motic 2000; Motic China Group, Xiamen, China) mounted on a conventional light microscope (Olympus BH-2; Olympus Co, Tokyo, Japan), with an objective magnification of $\times 40$, and analyzed with the Image Pro-Plus 3.0.1 system (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). The microscope was prepared for Koehler illumination. This was achieved by recording a reference image of an empty field for the correction of unequal illumination (shading correction) and calibrating the measurement system with a reference slide to determine background threshold values. The reference slides contained a series of tissue sections stained in the absence of a primary antibody. The positive controls were used as interassay controls to maximize the levels of accuracy and robustness of the method [44–46]. The methodologic details of image analysis as a valid method to quantify protein expression have been described previously [38,44,45–50]. The percentage of the immunopositive-stained area was calculated separately in each follicular wall layer (granulosa and theca) from at least 50 images of the primary, secondary, tertiary, and atretic follicles and follicular cysts.

2.4. In vitro ACTH treatment and Western blot analysis

To analyze the effect of ACTH stimulation on the protein expression of 11 β HSD1 and 11 β HSD2 in vitro, follicular wall samples from cystic and large antral follicles collected at a local abattoir were used in the tissue culture assay (basal and ACTH-treated) and then processed for immunoblotting.

The protocol for in vitro ACTH treatment has been previously applied to bovine follicular walls to determine the effect of ACTH on the release of steroid hormones in vitro [6]. Briefly, in a laminar flow hood, ovaries were rinsed, follicular fluid was aspirated, and large antral follicles or follicular cysts were taken with a scalpel and placed in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4. The culture medium had been previously equilibrated for 2 h in a humidified incubator (3154 Water-Jacketed Incubator; Forma Scientific, Asheville, NC) gassed with 95% O_2 and 5% CO_2 at 37°C .

Table 1
Antibodies, suppliers, and dilutions used for IHC and WB analysis.

Antibodies	Clone/source	Dilution
Primary antibodies		
11 β HSD1	Polyclonal, ab39364; Abcam (Cambridge, MA)	IHC: 1:100 WB: 1:500
11 β HSD2	Polyclonal, ab37800; Abcam (Cambridge, MA)	IHC: 1:80 WB: 1:500
Secondary antibodies		
Biotinylated anti-rabbit IgG	Goat Polyclonal, 65-6140; Zymed (San Francisco, CA)	IHC: 1:100
Anti-rabbit IgG peroxidase	Goat Polyclonal (Amersham, UK)	WB: 1:1,000

Abbreviations: IHC, immunohistochemistry; WB, Western blot.

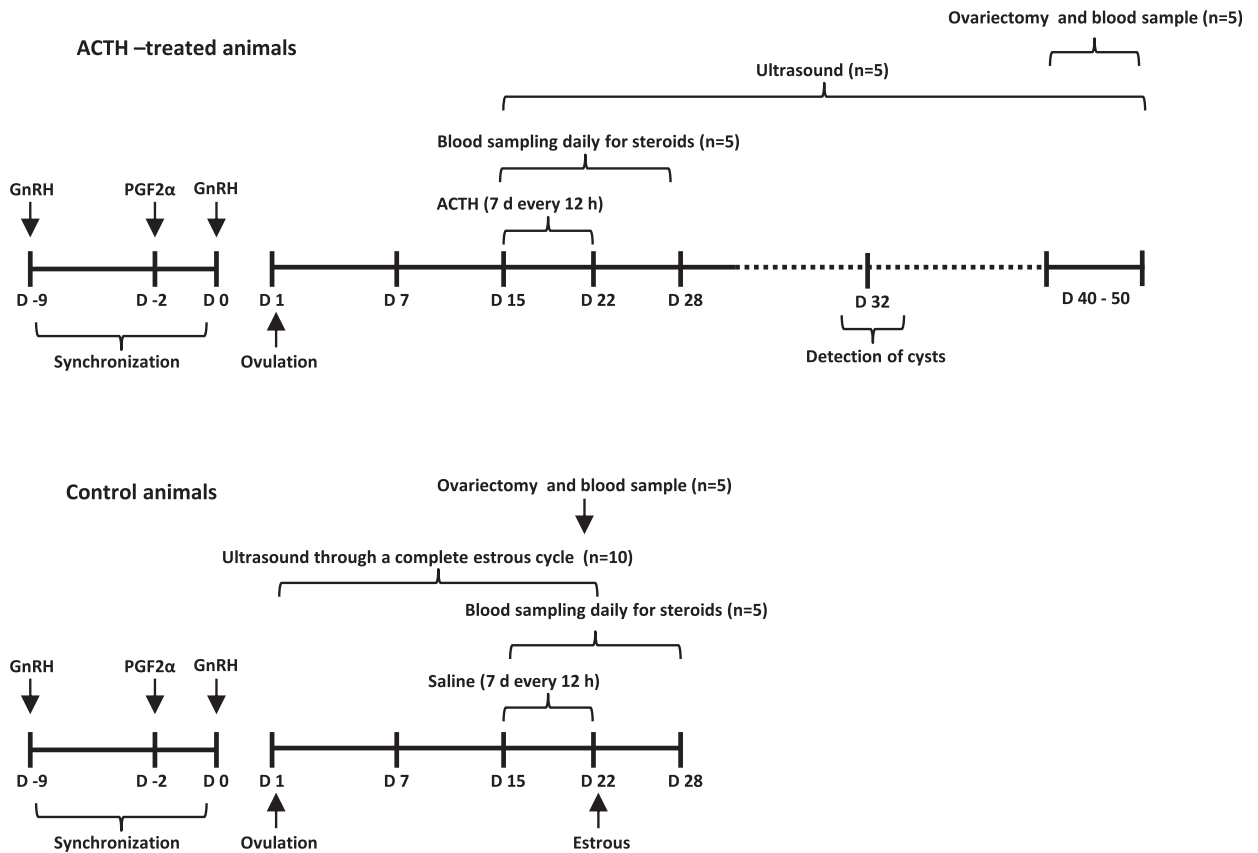


Fig. 1. Experimental design for the induction of follicular cysts. Holstein heifers were synchronized and treated with ACTH or saline, every 12 h, from days 15 to 22 of the estrus cycle. Follicular dynamics were followed by daily ultrasound scanning, and blood steroid hormones were measured as indicated. Ovariectomy was performed to obtain preovulatory follicles from control animals and cysts persisting for at least 10 d from treated animals. D, day; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; PGF2 α , prostaglandin F2 α .

Each follicle was sectioned into 2 fragments (one for basal effects and one for ACTH treatment, approximately 50 mg each). The fragments were cultured on 24-well (1.5 mL medium/well) culture plates (Nunc plate; Applied Scientific, South San Francisco, CA), and incubated in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4, for 20 min. After preculture, treated tissues were placed in medium with 100nM ACTH (Laboratorios ELEA, Buenos Aires, Argentina) for 3 h at 37°C. This dose has been described for a high cortisol secretion response in antral follicles in *in vitro* follicular wall cultures [6]. Control tissues were incubated in the same way without ACTH. Then, the culture medium was taken from each well and maintained at -20°C until hormone assays, and follicular wall samples were immediately frozen at -80°C until used for the determination of 11 β HSDs protein expression by Western blot analysis. Each set of cultures, constituted by 6 follicular cysts and 6 large antral follicles (basal and ACTH-treated each), was performed twice, under identical conditions.

The tissue samples were homogenized in radioimmuno-precipitation assay lysis buffer and a protease inhibitor cocktail (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche, Mannheim, Germany), as previously described [15,39]. An aliquot of 40 μ g of proteins was

separated by SDS-PAGE (10% resolving gel). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham, Buckinghamshire, UK), blocked for 1 h in 2% wt/vol nonfat milk in Tris-buffered saline that contained 0.05% vol/vol Tween 20 (Sigma-Aldrich), and then incubated overnight at 4°C with specific primary antibodies (Table 1). After washing, membranes were treated for 1 h with the corresponding secondary peroxidase-conjugated antibody (Table 1). Immunopositive bands were visualized with a chemiluminescent detection kit (Amersham). To test specificity of the antibodies, bovine adrenal tissues were processed with the same protocol.

The exposed films were scanned at 1,200 dpi, and the protein expression levels of 11 β HSD1 and 11 β HSD2 were analyzed by densitometry with the Image Pro-Plus 3.0.1 system to obtain an integrated optical density value.

2.5. Hormone assays

The concentrations of estradiol, progesterone, testosterone, and cortisol in serum and follicular fluid from ACTH-treated cows, cows with spontaneous cysts, and controls, as well as in the incubation medium of tissue cultures, were measured by ELISA kits (Estradiol EIA,

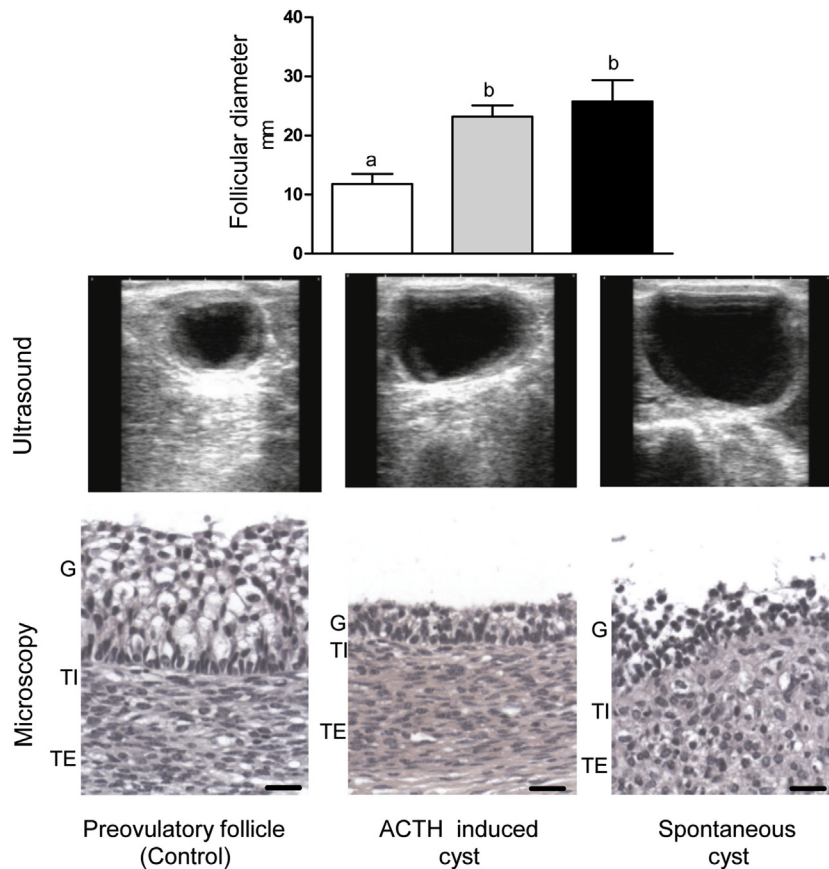


Fig. 2. Morphologic characteristics of preovulatory follicles and follicular cysts at the time of ovariectomy. Mean \pm SEM follicular diameter, selected ultrasound pictures, and histologic features are shown. Bars with different letters are different ($P < 0.05$). In microscopy image, scale bars = 20 μ m. G, granulosa; TE, theca externa; TI, theca interna.

DSL-10-4300; Progesterone EIA, DSL-10-3900; Testosterone EIA, DSL-10-4000; Cortisol DSL-1-200; Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX), according to the manufacturer's instructions. The assay sensitivity was 7 pg/mL for estradiol, 0.13 ng/mL for progesterone, 0.04 ng/mL for testosterone, and 0.10 μ g/dL for cortisol. For the incubation medium, results were normalized in relation to tissue weight and were expressed as hormone concentration per milligram of tissue [6].

2.6. Statistical analyses

A statistical software package (SPSS 11.0 for Windows; SPSS Inc, Chicago, IL) was used to perform all statistical tests. The serum concentrations of steroids in ACTH-treated and control animals during the experimental protocol were analyzed by multivariate ANOVA to determine the time and treatment effects and treatment-by-time interaction.

The immunohistochemical data and hormone concentrations in serum and follicular fluid from ACTH-treated cows, cows with spontaneous cysts, and controls were compared by ANOVA, followed by Duncan multiple range tests. The protein expression and hormone concentrations in the culture media between ACTH-treated and control

tissues were compared with a nonpaired 2-tailed Student *t* test. For all statistical analyses, $P < 0.05$ was considered significant. Results are expressed as mean \pm SEM.

3. Results

3.1. Ultrasonography and follicular morphology

3.1.1. ACTH-treated animals

The successful induction of COD with the ACTH treatment in heifers was confirmed by observing ovarian morphology and hormone concentrations. Ovarian follicular cysts were induced in all ACTH-treated animals. Detection of cysts began on day 32.5 ± 4 , and the mean diameter of cysts was 23.2 ± 1.9 mm, larger ($P < 0.05$) than the mean diameter of ovulatory follicles, which was 11.8 ± 1.7 mm at ovariectomy (approximately day 18). Ultrasonographically, the cysts appeared as uniformly non-echogenic ovarian structures with a wall thickness of ≤ 3 mm. Microscopically, healthy developing follicles, follicles showing different degrees of atresia, and 1 large cyst (in one ovary) with a complete and intact multilaminar granulosa layer were observed. Corpora lutea were absent in all cases (Fig. 2).

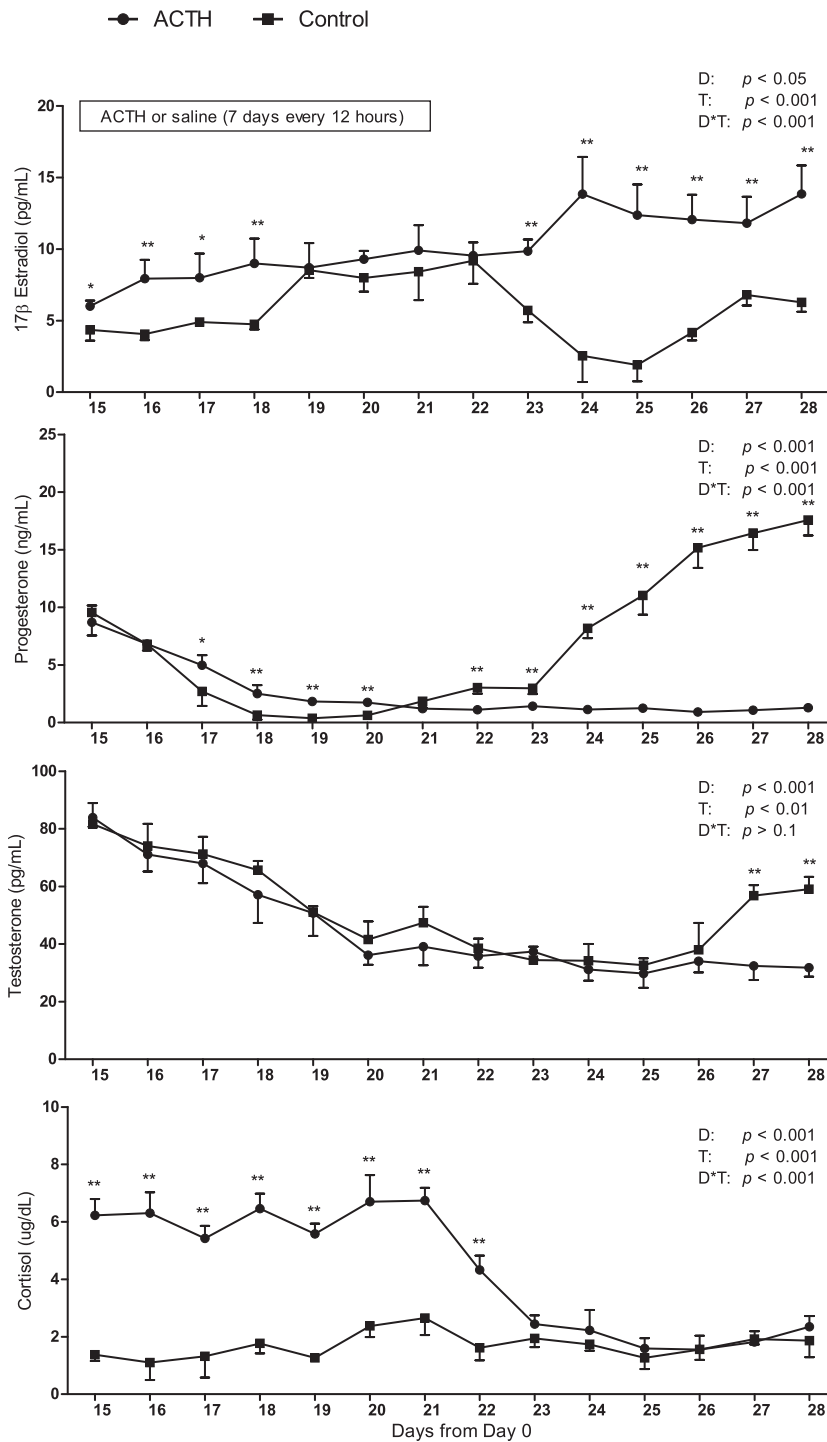


Fig. 3. Serum levels of estradiol, progesterone, testosterone, and cortisol in ACTH-treated and control animals during the experimental protocol. Results are mean \pm SEM. Data were analyzed according to the time after the ovulation (day 1) in the previous synchronized cycle. Values with superscripts indicate differences ($*P < 0.05$ and $**P < 0.01$) between ACTH-treated and controls in each time point ($n = 5$ animals per group). D, day of experimental protocol effect; T, treatment effect; D*T, day of experimental protocol-by-treatment interaction.

3.1.2. Control animals

Daily ultrasound monitoring in control untreated heifers during a complete estrous cycle showed normal

follicular dynamics. The preovulatory follicle was detected on day 15, and its mean diameter was 11.8 ± 1.7 mm at ovariectomy (approximately day 18). Histologically, ovaries

exhibited follicles in various stages of development, including primary, secondary, and tertiary follicles, as well as atretic follicles and CL from previous cycles (Fig. 2).

3.1.3. Animals with COD diagnosed at the dairy farm

Ultrasonographically, spontaneous follicular cysts diagnosed at the dairy farm were similar to ACTH-induced cysts, with a mean diameter of 25.8 ± 3.6 mm, larger than ovulatory follicles in control animals ($P < 0.05$), but not different from induced follicular cysts ($P > 0.1$). Microscopically, healthy developing follicles, atretic follicles, and 1 or 2 large cyst(s) with a complete granulosa of variable thickness, with degeneration signs in some cases, were also observed. Corpora lutea were absent in all cases (Fig. 2).

3.2. Effects of ACTH on blood steroid hormone concentrations

Daily blood samples in estrus-synchronized heifers (controls) and ACTH-treated animals during the treatment and 1 wk after completion of treatment showed effects of the treatment and time ($P < 0.05$) on concentrations of all hormones and a treatment-by-time interaction in estradiol, progesterone, and cortisol (Fig. 3).

Estradiol was higher ($P < 0.05$) in blood of ACTH-treated animals during treatment (days 15–18). At the beginning of the subsequent estrous cycle (days 23–28), estradiol decreased ($P < 0.05$) in control animals and continued to increase ($P < 0.05$) in ACTH-treated animals. In ACTH-treated animals, progesterone was greater ($P < 0.05$) at the end of the treatment (days 17–20) and then decreased

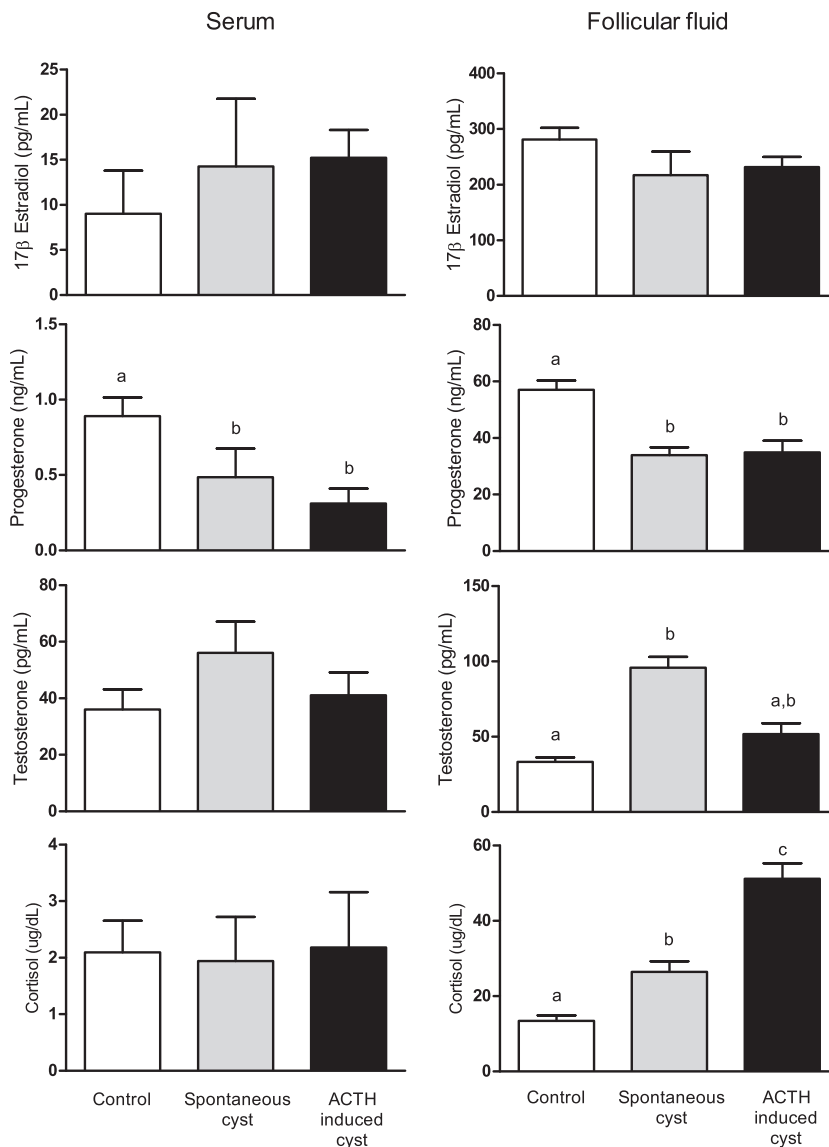


Fig. 4. Serum levels of estradiol, progesterone, testosterone, and cortisol in serum and follicular fluid at the time of ovariectomy. Bars represent the mean \pm SEM for each hormone in serum or follicular fluid. Bars with different letters are different ($P < 0.05$) ($n = 5$ animals for controls and ACTH-induced cysts and $n = 10$ for spontaneous follicular cysts).

and increased ($P < 0.05$) in estrus-synchronized controls from day 22 because of the formation of a new CL after ovulation. Testosterone showed a similar profile in both groups until day 27, when testosterone increased ($P < 0.05$) in control animals. Cortisol was greater ($P < 0.05$) during ACTH treatment (days 15–21) and then decreased to control values after day 23.

3.3. Steroid hormone concentrations in serum and follicular fluid at sampling time

The concentrations of estradiol, progesterone, testosterone, and cortisol in serum and follicular fluid of ACTH-treated animals, cows with spontaneous cysts obtained at the dairy herd, and estrus-synchronized heifers (controls) at ovariectomy are shown in Figure 4. Control animals had greater ($P < 0.05$) progesterone concentration in serum, although always <1 ng/mL. Estradiol and cortisol did not change ($P > 0.05$), whereas testosterone tended to increase ($P = 0.06$) in serum from cows with spontaneous cysts.

In follicular fluid, estradiol was similar in all groups but tended ($P = 0.055$) to decrease in ACTH-induced follicular cysts in relation to preovulatory follicles. Progesterone was lower ($P < 0.05$) in spontaneous and induced follicular cysts than in preovulatory follicles. Testosterone was greater ($P < 0.05$) in spontaneous follicular cysts than in preovulatory follicles. Cortisol concentration increased ($P < 0.05$) in animals with COD.

3.4. Immunolocalization of 11 β HSDs proteins

To obtain information about the localization of 11 β HSD proteins in different follicular structures, their expression was evaluated by immunohistochemistry and quantitative image analysis. In estrus-synchronized control animals, a moderate expression of 11 β HSD1 was observed in granulosa, with an increase from primary to atretic follicles ($P < 0.05$) (Figs. 5 and 6). The immunopositive area in theca interna was lower than that in granulosa ($P < 0.05$), and no differences were found across the different follicle stages. The expression of 11 β HSD2 was lower in the granulosa layer of primary follicles than in secondary, tertiary, and atretic follicles ($P < 0.05$). The level of immunostaining of 11 β HSD2 in theca interna was lower than in granulosa ($P < 0.05$). In addition, secondary follicles showed a lower expression than tertiary and atretic follicles ($P < 0.05$). The theca externa layer had a weak or absent immunostaining for 11 β HSD1 and 11 β HSD2, and the expression was not quantified because the values did not differ from the background.

In follicular cysts of ACTH-treated heifers and spontaneously happening at the dairy herd, differences were observed only in 11 β HSD1 expression in granulosa relative to controls (Fig. 7). The immunopositive area of 11 β HSD1 was higher in the granulosa of tertiary follicles and follicular cysts of animals with ACTH-induced COD than in tertiary follicles of estrus-synchronized controls ($P < 0.05$) (Figs. 6 and 7). In animals with spontaneous cysts, the staining in follicular cysts was also higher than that in tertiary follicles of controls ($P < 0.05$) (Figs. 6 and 7). The immunopositive area of 11 β HSD1 decreased in atretic follicles from both animals with spontaneous cysts and animals with ACTH-

induced cysts, in relation to preovulatory follicles from control animals ($P < 0.05$).

3.5. Effects of ACTH on 11 β HSD1 and 11 β HSD2 protein expression in the follicular wall

The analysis of the expression of 11 β HSD1 and 11 β HSD2 by Western immunoblot in the follicular wall of preovulatory and follicular cysts obtained at the abattoir is presented in Figure 8. The 11 β HSD1 antibody recognized bands of 34 and 68 kDa, corresponding to monomeric and dimeric forms, and the dimeric form is the most functionally relevant. By contrast, the 11 β HSD2 antibody recognized a band of 48 kDa. After 3 h of incubation, basal expression of both enzymes was found in all samples, with higher ($P < 0.05$) expression in follicular cysts than in preovulatory follicles. These differences persisted in ACTH-stimulated tissues. After ACTH stimulation, an increase ($P < 0.05$) was found in 11 β HSD1 expression in large antral follicles and follicular cysts with a decreased 11 β HSD2 expression (Fig. 8).

3.6. Effects of ACTH on secretion of steroids by the follicular wall

Steroid concentrations in the incubation medium of follicular wall cultures of preovulatory follicles and follicular

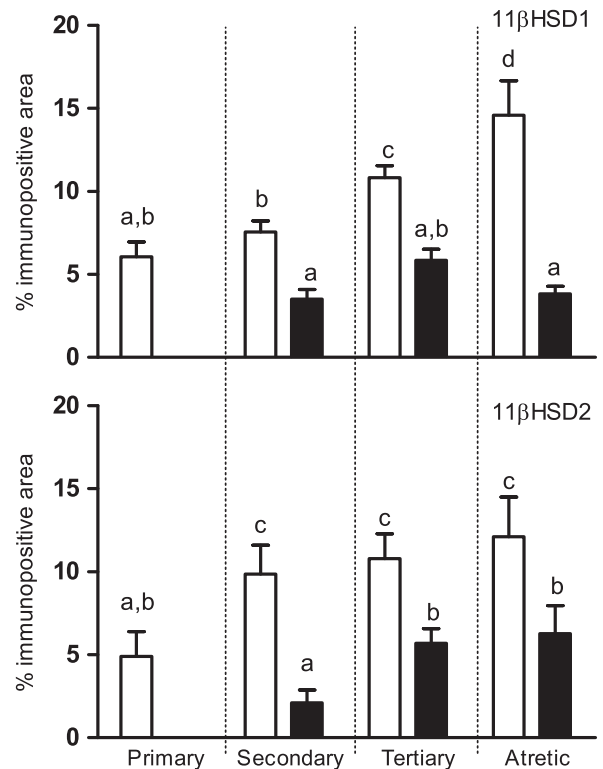


Fig. 5. Relative expression (measured as percentage of immunopositive area) of 11 β HSD1 and 11 β HSD2 in granulosa (white bars) and theca interna (black bars) of primary, secondary, tertiary, and atretic follicles from the estrus-synchronized control group. Values represent mean \pm SEM. Bars with different letters are different ($P < 0.05$). 11 β HSD1, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; 11 β HSD2, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2.

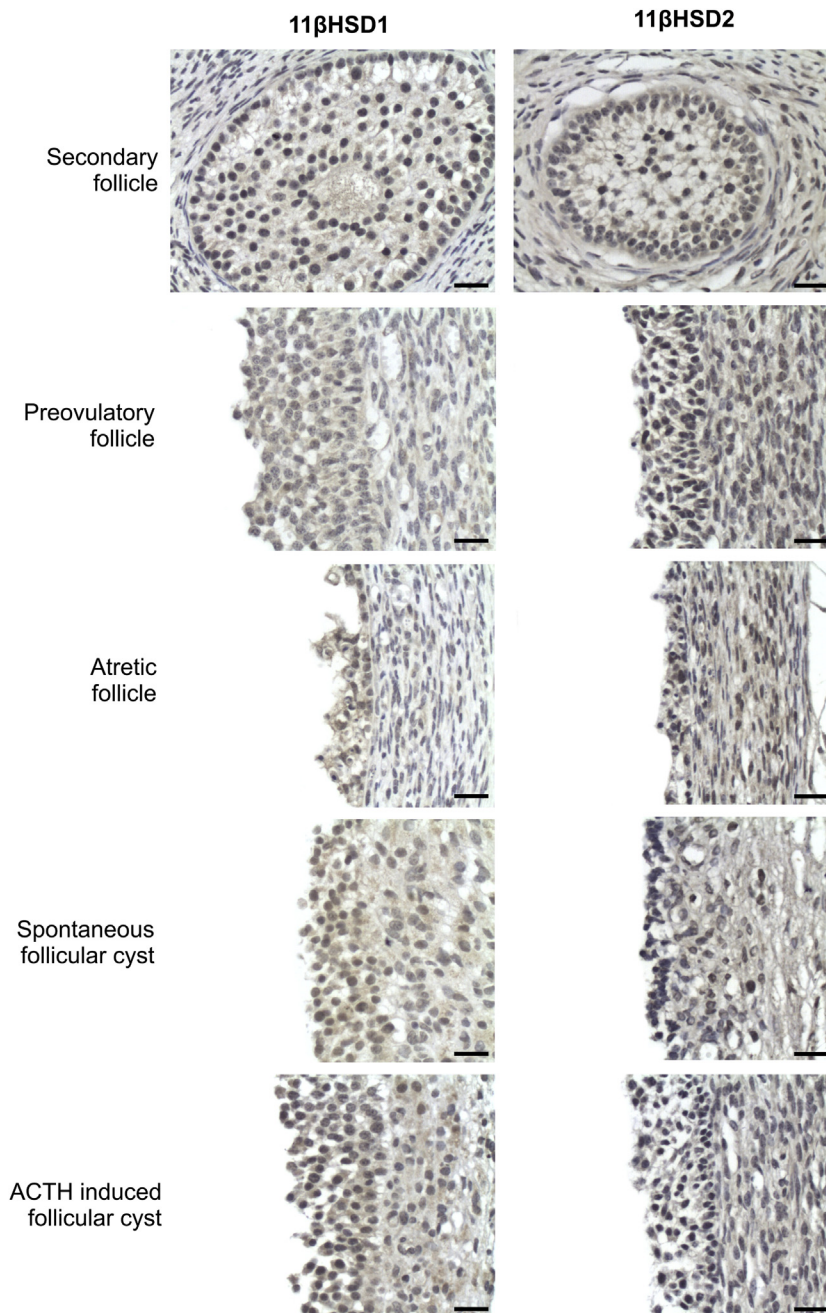


Fig. 6. Representative images of 11 β HSD1 and 11 β HSD2 immunostaining in secondary, preovulatory, and atretic follicles of the estrus-synchronized control group and follicular cysts of spontaneous and ACTH-induced COD groups. Scale bars = 20 μ m. COD, cystic ovarian disease; 11 β HSD1, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; 11 β HSD2, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2.

cysts obtained at the abattoir are presented in Figure 9. After 3 h of incubation, basal concentrations of steroid secretion were detected in all samples, with higher ($P < 0.05$) concentrations of estradiol and testosterone in follicular cysts than in large antral follicles. By contrast, progesterone showed a lower basal secretion in follicular cysts. These differences persisted in ACTH-stimulated tissues. After ACTH stimulation, testosterone and cortisol secretions increased

($P < 0.05$) in large antral and follicular cysts. In addition, estradiol increased ($P < 0.05$) in follicular cysts in response to ACTH.

4. Discussion

Treatment with ACTH resulted in changes in serum steroid concentrations. Estradiol, progesterone, and cortisol

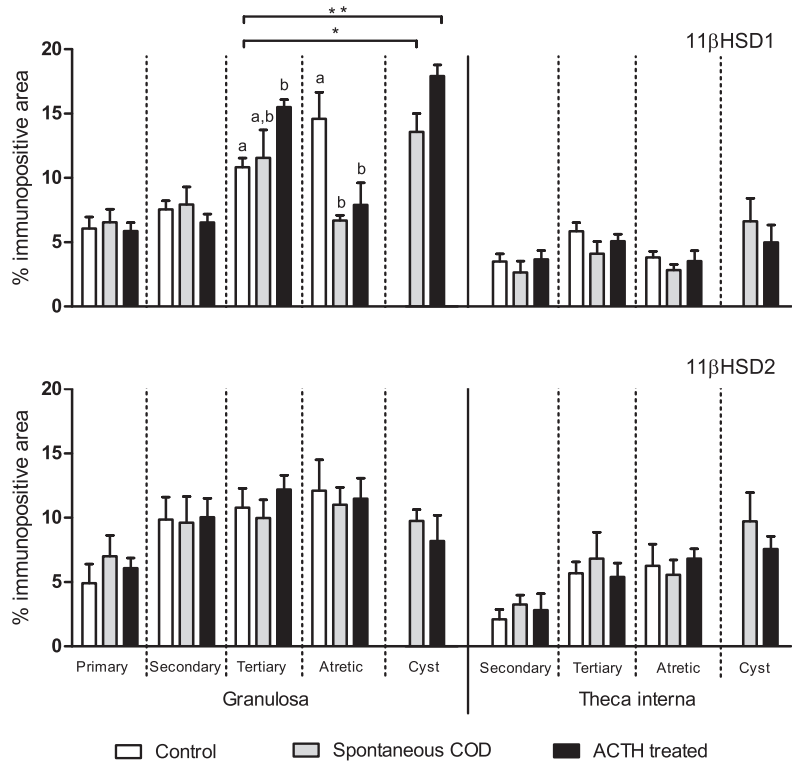


Fig. 7. Relative expression (measured as percentage of immunopositive area) of 11 β HSD1 and 11 β HSD2 in granulosa and theca interna of primary, secondary, tertiary, and atretic follicles and follicular cysts in estrus-synchronized controls, spontaneous COD, and ACTH-induced COD groups. Values represent mean \pm SEM. Bars with different letters within each follicle category are different ($P < 0.05$). Differences relative to the expression in follicular cysts in relation to control tertiary follicles are also indicated: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. COD, cystic ovarian disease; 11 β HSD1, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; 11 β HSD2, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2.

concentrations increased during ACTH treatment, whereas testosterone showed no changes. After ACTH treatment, estradiol remained increased, whereas progesterone did not increase as in controls. This would reflect follicular persistence and lack of luteinization, respectively. This is consistent with results of Dobson et al [5], who described that estrogen remains high until approximately day 30 and proposed that estradiol, along with inhibin (but not ACTH, cortisol, or progesterone), exerts a strong negative feedback on FSH secretion [51]. However, these investigators did not analyze the concentration of testosterone.

Cortisol in follicular fluid was higher in cysts than in controls, confirming the existence of a mechanism to regulate its intrafollicular concentration. Cortisol concentration in follicular fluid was even greater in animals treated with ACTH, confirming our previous results that indicated a direct action of ACTH in the follicular wall [6]. In this sense, no alterations have been detected in adrenal function or in serum cortisol concentration between normal cycling cows and cows with ovarian follicular cysts [52], in agreement with our results. We found differences in serum cortisol only during treatment but not at the time of cyst formation. Thus, we found no evidence that cyclic cows and cows with COD differed in adrenal function. Because glucocorticoid is synthesized only in the adrenal cortex and is delivered systemically to the whole body, the presence of

an enzymatic pathway is crucial for glucocorticoids to modulate local concentration of active glucocorticoids [31,32].

It is well known that ACTH is acutely released from the pituitary gland in response to stressor stimulation and is the primary signal for adrenal cortisol biosynthesis. The stress-induced release of glucocorticoids is known to inhibit the immune [53], reproductive [4,54], and endocrine [55] systems. The expression of 11 β HSD1 and 11 β HSD2 in bovine ovarian tissues, together with the reported direct glucocorticoid action in cultured follicular cells [19,22,56], indicates that the bovine ovary is a glucocorticoid target organ that is also capable of modulating the local glucocorticoid environment [32]. In addition, the expression of melanocortin receptors (MCRs) in the follicular wall could indicate that the ovarian follicle is a direct target organ of ACTH, indicating a role for this hormone in modulating gonadal function through MCRs. Specifically, MC2R (the main signaling receptor for ACTH in the adrenal gland) mRNA and MC5R mRNA are expressed in the theca of bovine antral follicles [6]. Because the theca expresses CYP17A1, a key enzyme in the steroidogenic pathway that produces the precursors of cortisol [57], it was expected that cortisol secretion could be stimulated by ACTH, by the presence of its receptors in theca. In this sense, when we analyzed steroid hormone secretion in vitro, basal secretion

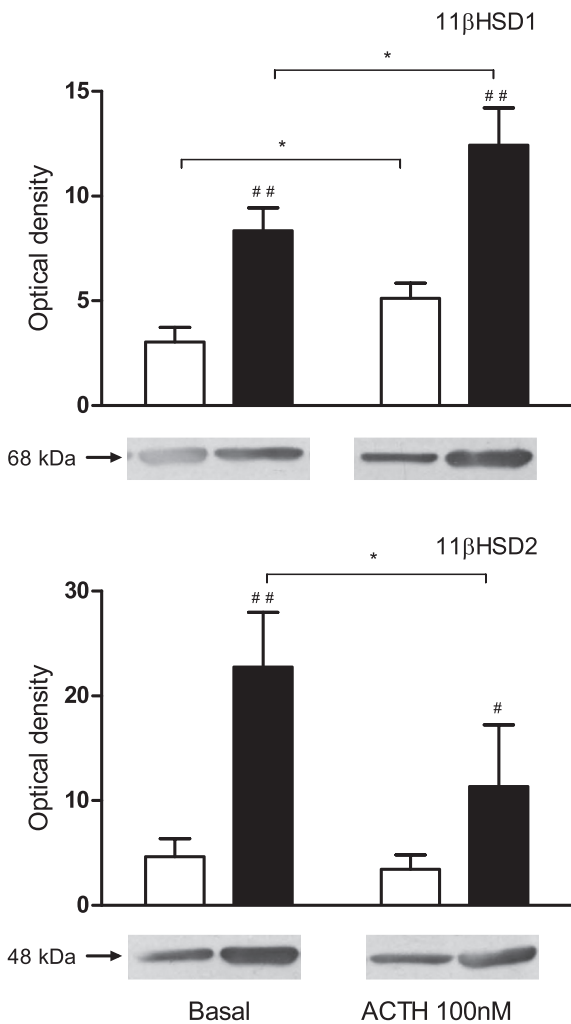


Fig. 8. Effects of ACTH on the expression of 11βHSD1 and 11βHSD2 analyzed by Western immunoblot analysis in the follicular wall of cultured preovulatory follicles (white bars) and follicular cysts (black bars). Values represent mean \pm SEM. Differences in basal and stimulated secretion between preovulatory follicles and follicular cysts are indicated: * $P < 0.05$. Differences relative to basal secretion are also indicated: # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$. 11βHSD1, 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1; 11βHSD2, 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2.

of estradiol and testosterone was lower in large antral follicles than in follicular cysts. In contrast, basal progesterone secretion was higher in preovulatory than in follicular cysts. However, ACTH stimulation has an effect on estradiol secretion by follicular cysts wall and also a stimulatory effect on testosterone and cortisol in the follicular wall of both preovulatory follicles and follicular cysts. These results are in agreement with our previous results in the bovine ovary [6].

Administration of ACTH to gilts during the luteal phase increases both serum and follicular cortisol concentrations [58] without disrupting gonadotropin secretion [59]. Acosta et al [21] reported a temporal increase in follicular cortisol concentration around the preovulatory LH surge in cattle. However, although concentrations of active

glucocorticoids were decreased during ovarian follicular development and maturation, glucocorticoids were increased during the ovulatory process triggered by an LH surge, suggesting a functional role for ACTH in the stimulation of ovarian cortisol secretion. In addition, the fact that the follicular wall of antral follicles had higher expression of MCRs could be related to the stimulatory effect of ACTH on estradiol and cortisol secretion. The expression of MC2R could also be associated with the stimulatory effect of ACTH on testosterone secretion in large antral follicles, perhaps associated with a decrease in P450 aromatase activity. If we take into account the differentiation of follicular walls, the increased ACTH secretion previously reported during stress in cattle could be responsible for the increase in testosterone that characterizes follicular cysts during COD in cattle [60].

In this study, we documented the immunolocalization of enzymes that catalyzed activation or inactivation of cortisol in the bovine ovary. In this sense, immunohistochemistry is currently the only technique that allows an integrative analysis of the cellular localization of proteins in nearby tissue compartments when it is not possible to separate cell populations to perform other more sensitive and specific techniques. We demonstrated that all follicular stages in the bovine ovary express 11βHSD1 and 11βHSD2 in a developmentally related way. In healthy ovaries, immunostaining of 11βHSD1 in granulosa increased as follicles matured and remained constant in theca cell layers. In addition, atretic follicles reached the highest expression of 11βHSD1 in granulosa. However, 11βHSD2 protein expression increased from secondary follicles onward in the granulosa and from tertiary follicles onward in the theca. Spontaneous and induced COD showed similar immunopatterns with differences only in the levels of 11βHSD1 in granulosa in relation to controls. Granulosa of follicular cysts evidenced higher levels of 11βHSD1 in relation to tertiary follicles of controls, and the expression in atretic follicles of COD ovaries was lower than that in healthy ovaries. The pattern of expression evidenced by immunohistochemistry is partially related to that previously described by other investigators.

With the use of real-time PCR, Tetsuka et al [33] showed that gene expression of 11βHSD1 mRNA in healthy follicles increased as follicles matured, both in granulosa and theca. In addition, the expression of 11βHSD2 mRNA was low and unchanged during follicular maturation, whereas in atretic follicles a drastic increase in the expression of 11βHSD2 was observed by these investigators. [33] In another study, using PCR and Western blot analysis, Thurston et al [34] documented changes in 11βHSD protein expression and cofactor-dependent enzyme activities across the bovine ovarian cycle in granulosa. Trends in 11βHSD activities that depend on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and the oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide paralleled changes in the expression of the 11βHSD1 and 11βHSD2 proteins, which in turn reflected the expression of mRNA encoding these enzyme proteins. These investigators suggested that the balance of 11βHSD enzyme activities may be set, to a large extent, at the level of enzyme translation, if not at the level of enzyme transcription. This could explain the differences observed

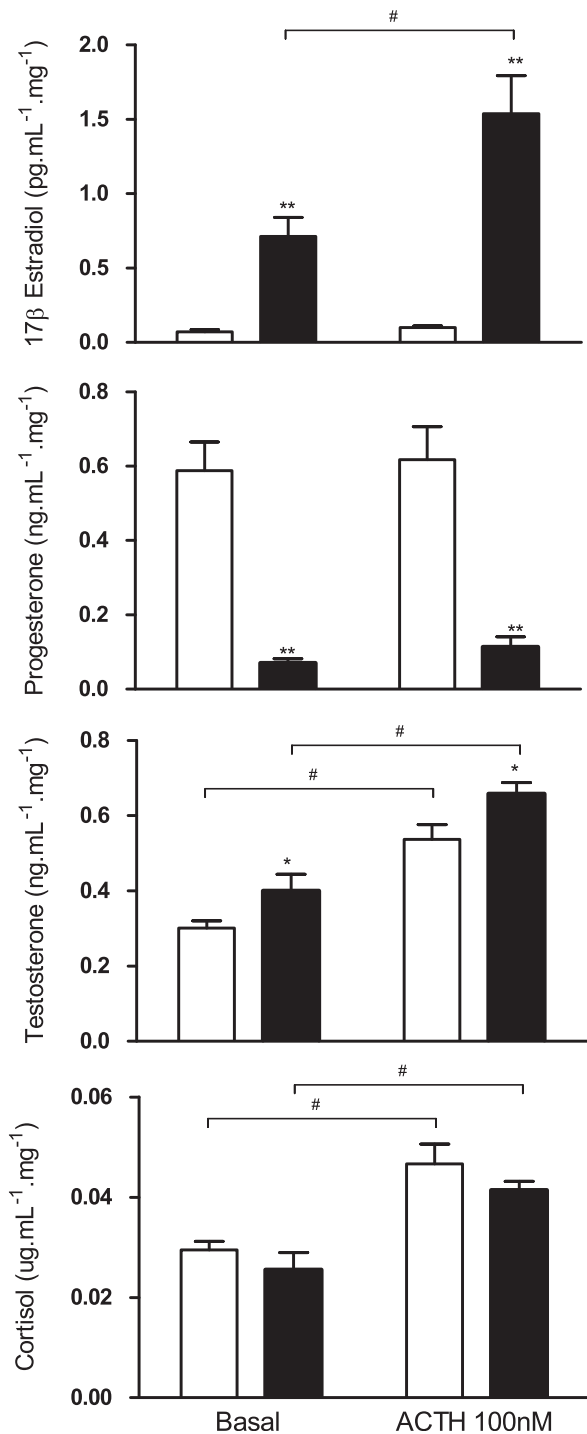


Fig. 9. Effects of ACTH on the secretion of estradiol, progesterone, testosterone, and cortisol by the follicular wall of large antral follicles (white bar) and follicular cysts (black bar). Bars represent the mean \pm SEM. Differences in basal and stimulated secretion between preovulatory follicles and follicular cysts are indicated: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. Differences relative to basal secretion are also indicated: # $P < 0.05$ ($n = 6$ replicates).

between gene expression analyzed by PCR and protein localization studied by immunohistochemistry. In this study, we described changes in 11 β HSD expression and

cortisol release in the follicular wall of large antral follicles and follicular cysts after the stimulation by ACTH. Follicular cysts showed a higher expression of both enzymes at basal conditions, whereas ACTH induced an increase in 11 β HSD1 in both follicular categories and a decrease in 11 β HSD2 in follicular cysts. This response is similar to that induced by the preovulatory gonadotropin surge that induces the expression of 11 β HSD1 and decreases the expression of 11 β HSD2 in follicles [61,62]. This results in a rapid increase in follicular cortisol just before follicular rupture [63]. The physiological importance of this event is not clear but may either enhance oocyte maturation [64,65] or prevent excess inflammation caused by ovulation [21,27]. Although this mechanism may temporarily increase the local concentration of glucocorticoids, forming an integral part of the regulatory mechanism in ovarian physiology, this could be part of a process leading to the formation of follicular cysts.

It has been established that glucocorticoids modulate ovarian function in cattle. Taking into account that the circulating concentration of cortisol is largely unchanged throughout the bovine estrous cycle [66–68], this enzymatic system may play an important role in regulating ovarian glucocorticoid action. However, the regulatory mechanisms have not been fully elucidated. In humans, the relative expression of 11 β HSD1 and 11 β HSD2 has been shown to determine the concentration of cortisol in follicles [62]. In addition, the levels of enzyme cofactors also influence the activities of 11 β HSDs, and it has been found that follicular fluid of large antral follicles and cysts contain ovarian modulators of 11 β HSD activity that depended on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. Moreover, because of a decreased content of 11 β HSD stimuli accompanied by increased content of 11 β HSD inhibitors, the follicular fluid of cysts exerts a net inhibitory effect on 11 β HSD2 activity [35], with a decreased inactivation of cortisol in follicular cysts [69]. By contrast, because progesterone is a strong intrafollicular inhibitor of 11 β HSD1 activity [70–75], ovulation failure and consequent lack of luteinization and low progesterone concentration, characteristic of COD, could exacerbate 11 β HSD1 activity and cortisol production.

As has been previously determined by many investigators cysts undergo 1 of 3 fates: cysts may remain dominant for a prolonged period without other follicular growth, cysts may lose dominance and be replaced by a cyst from a new follicular wave (cyst turnover), or cysts may lose dominance and a new dominant follicle may develop and ovulate [76,77]. Delay of follicle regression after ovulation is a possible cause of cysts because a preovulatory follicle that cannot be ovulated will not grow further if it regresses immediately; therefore, no follicular cysts will be formed. In terms of the implications of these findings in the intra-ovarian COD pathogenesis, this study has shown that COD ovaries are exposed to higher concentration of cortisol and have the ability to further increase these concentrations in response to specific stimuli. Previous works have shown alterations in the apoptosis rate in follicles from cows with spontaneous and induced follicular cysts, and these findings support the notion that follicular persistence is an important component of COD pathogenesis [20,78]. In addition, in bovine and rat follicular cysts, we have previously described changes in cell differentiation, mostly

related to overexpression of cytoskeletal components [43,49]. In this context, the ability of glucocorticoids to inhibit granulosa apoptosis [79] may also be important in limiting atresia in persistent antral follicles (and may even prevent apoptotic degeneration of follicular cysts) [69,80,81]. In addition, glucocorticoids have been shown to stimulate granulosa differentiation [18] and so may participate in the differentiation of granulosa described in follicular cysts.

Stress-associated stimulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal/ovary axis has been reported to disrupt reproductive function and has been associated with bovine COD pathogenesis [1]. Poor follicle development, reduced ovulation rates, and follicular cyst formation have been reported in association with ACTH treatment and increased concentrations of glucocorticoids [2–5]. Recently, we have confirmed the expression of ACTH receptors in bovine ovaries [6], and the fact that ACTH is able to induce steroid secretion and changes in 11 β HSD expression from the ovary strongly indicates that ACTH could be involved in regulatory mechanisms related to ovarian function associated with ovulation, steroidogenesis, and COD pathogenesis. In conclusion, these findings indicate that ovarian follicles may be exposed to high local concentrations of active glucocorticoids and may indicate a local role for cortisol in COD pathogenesis and in regulatory mechanisms of ovarian function.

Acknowledgments

This study was supported by the Argentine National Agency for the Promotion of Science and Technology (ANPCyT) grant PICT 2007-1193/PICT 2011-1274 and by MINCYT (Argentina)-CONICYT (Chile) International cooperation grant CH/08/04.

References

- [1] Moberg GP. Problems in defining stress and distress in animals. *J Am Vet Med Assoc* 1987;191:1207–11.
- [2] Liptrap RM, McNally PJ. Steroid concentrations in cows with corticotropin-induced cystic ovarian follicles and the effect of prostaglandin F₂alpha and indomethacin given by intrauterine injection. *Am J Vet Res* 1976;37:369–75.
- [3] Kawate N, Inaba T, Mori J. Changes in plasma concentrations of gonadotropins and steroid hormones during the formation of bovine follicular cysts induced by the administration of ACTH. *J Vet Med Sci* 1996;58:141–4.
- [4] Liptrap RM. Stress and reproduction in domestic animals. *Ann N Y Acad Sci* 1993;697:275–84.
- [5] Dobson H, Ribadu AY, Noble KM, Tebble JE, Ward WR. Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotropic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle. *J Reprod Fertil* 2000;120:405–10.
- [6] Amweg AN, Paredes A, Salvetti NR, Lara HE, Ortega HH. Expression of melanocortin receptors mRNA, and direct effects of ACTH on steroid secretion in the bovine ovary. *Theriogenology* 2011;75: 628–37.
- [7] Kesler DJ, Garverick HA, Caudle AB, Bierschwal CJ, Elmore RG, Youngquist RS. Testosterone concentrations in plasma of dairy cows with ovarian cysts. *J Dairy Sci* 1979;62:1825–8.
- [8] Cook DL, Parfet JR, Smith CA, Moss GE, Youngquist RS, Garverick HA. Secretory patterns of LH and FSH during development and hypothalamic and hypophysial characteristics following development of steroid-induced ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J Reprod Fertil* 1991;91:19–28.
- [9] Hamilton SA, Garverick HA, Keisler DH, Xu ZZ, Loos K, Youngquist RS, Salfen BE. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol Reprod* 1995;53:890–8.
- [10] Yoshioka K, Iwamura S, Kamomae H. Ultrasonic observations on the turnover of ovarian follicular cysts and associated changes of plasma LH, FSH, progesterone and oestradiol-17 beta in cows. *Res Vet Sci* 1996;61:240–4.
- [11] Gümen A, Sartori R, Costa FM, Wiltbank MC. A GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure can induce development of follicular cysts. *J Dairy Sci* 2002;85:43–50.
- [12] Vanholder T, Opsomer G, de Kruif A. Etiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nutr Dev* 2006;46:105–19.
- [13] Kanchev LN, Dobson H, Ward WR, Fitzpatrick RJ. Concentration of steroids in bovine peripheral plasma during the oestrous cycle and the effect of betamethasone treatment. *J Reprod Fertil* 1976;48:341–5.
- [14] Stoebel DP, Moberg GP. Effect of adrenocorticotropic and cortisol on luteinizing hormone surge and estrous behavior of cows. *J Dairy Sci* 1982;65:1016–24.
- [15] Li PS, Wagner WC. In vivo and in vitro studies on the effect of adrenocorticotropic hormone or cortisol on the pituitary response to gonadotropin releasing hormone. *Biol Reprod* 1983;29:25–37.
- [16] Padmanabhan V, Keech C, Convey EM. Cortisol inhibits and adrenocorticotropic has no effect on luteinizing hormone-releasing hormone-induced release of luteinizing hormone from bovine pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 1983;112:1782–7.
- [17] Hsueh AJ, Erickson GF. Glucocorticoid inhibition of FSH-induced estrogen production in cultured rat granulosa cells. *Steroids* 1978; 32:639–48.
- [18] Schoonmaker JN, Erickson GF. Glucocorticoid modulation of follicle-stimulating hormone-mediated granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 1983;113:1356–63.
- [19] Spicer LJ, Chamberlain CS. Influence of cortisol on insulin- and insulin-like growth factor 1 (IGF-1)-induced steroid production and on IGF-1 receptors in cultured bovine granulosa cells and thecal cells. *Endocrine* 1998;9:153–61.
- [20] Salvetti NR, Stangaferro ML, Palomar MM, Alfaro NS, Rey F, Gimeno EJ, Ortega HH. Cell proliferation and survival mechanisms underlying the abnormal persistence of follicular cysts in bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Anim Reprod Sci* 2010;122:98–110.
- [21] Acosta TJ, Tetsuka M, Matsui M, Shimizu T, Berisha B, Schams D, Miyamoto A. In vivo evidence that local cortisol production increases in the preovulatory follicle of the cow. *J Reprod Dev* 2005; 51:483–9.
- [22] Kawate N, Inaba T, Mori J. Effects of cortisol on the amounts of estradiol-17 β and progesterone secreted and the numbers of luteinizing hormone receptors in cultured bovine granulosa cells. *Anim Reprod Sci* 1993;32:15–25.
- [23] Kol S, Ben-Shlomo I, Payne DW, Ando M, Rohan RM, Adashi EY. Glucocorticoids suppress basal (but not interleukin-1-supported) ovarian phospholipase A2 activity: evidence for glucocorticoid receptor-mediated regulation. *Mol Cell Endocrinol* 1998;137: 117–25.
- [24] Espey LL. Ovulation as an inflammatory reaction—a hypothesis. *Biol Reprod* 1980;22:73–106.
- [25] Terranova PF, Rice VM. Review: cytokine involvement in ovarian processes. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:50–63.
- [26] Ando M, Kol S, Kokia E, Ruutiainen-Altman K, Sirois J, Rohan RM, Payne DW, Adashi EY. Rat ovarian prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2: periovulatory expression of granulosa cell-based interleukin-1 dependent enzymes. *Endocrinology* 1998; 139:2501–8.
- [27] Hillier SG, Tetsuka M. An anti-inflammatory role for glucocorticoids in the ovaries? *J Reprod Immunol* 1998;39:21–7.
- [28] Andersen CY. Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis. *J Endocrinol* 2002;173:211–7.
- [29] Michael A, Thurston LM, Rae MT. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction* 2003;126:425–41.
- [30] Tetsuka M. Actions of glucocorticoid and their regulatory mechanisms in the ovary. *Anim Sci J* 2007;78:112–20.
- [31] Krozowski Z, Li KX, Koyama K, Smith RE, Obeyesekere VR, Stein-Oakley A, Sasano H, Coulter C, Cole T, Sheppard KE. The type I and type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *J Steroid Biochem* 1999;69:391–401.
- [32] Tetsuka M, Yamamoto S, Hayashida N, Hayashi KG, Hayashi M, Acosta TJ, Miyamoto A. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in bovine follicle and corpus luteum. *J Endocrinol* 2003;177:445–52.

- [33] Tetsuka M, Nishimoto H, Miyamoto A, Okuda K, Hamano S. Gene expression of 11 β -HSD and glucocorticoid receptor in the bovine (*Bos taurus*) follicle during follicular maturation and atresia: the role of follicular stimulating hormone. *J Reprod Dev* 2010;56: 616–22.
- [34] Thurston LM, Abayasekara DR, Michael AE. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase expression and activities in bovine granulosa cells and corpora lutea implicate corticosteroids in bovine ovarian physiology. *J Endocrinol* 2007;193:299–310.
- [35] Thurston LM, Jonas KC, Abayasekara DR, Michael AE. Ovarian modulators of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) activity in follicular fluid from bovine and porcine large antral follicles and spontaneous ovarian cysts. *Biol Reprod* 2003;68: 2157–63.
- [36] Guide for the care and use of Agricultural Animals in Research and Teaching. Federation of Animal Science Societies. Third edition. 2010.
- [37] Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF $_{2\alpha}$ and GnRH. *Theriogenology* 1995;44: 915–23.
- [38] Ortega HH, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. Insulin-like growth factor I in sera, ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous or induced cystic ovarian disease. *Res Vet Sci* 2008;84: 419–27.
- [39] Salvetti NR, Alfaro NS, Velázquez MM, Amweg AN, Matiller V, Díaz PU, Ortega HH. Alteration in localization of steroid hormone receptors and coregulatory proteins in follicles from cows with induced ovarian follicular cysts. *Reproduction* 2012;144: 723–35.
- [40] Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* 1988;39:308–17.
- [41] Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 2008;69: 72–80.
- [42] Peter AT, Levine H, Drost M, Bergfeld DR. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology* 2009;71: 1343–57.
- [43] Salvetti NR, Gimeno EJ, Lorente JA, Ortega HH. Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. *Cells Tissues Organs* 2004;178:117–25.
- [44] Ortega HH, Salvetti NR, Padmanabhan V. Developmental programming: prenatal androgen excess disrupts ovarian steroid receptor balance. *Reproduction* 2009;137:865–77.
- [45] Ranefall P, Wester K, Andersson AC, Busch C, Bengtsson E. Automatic quantification of immunohistochemically stained cell nuclei based on standard reference cells. *Anal Cell Pathol* 1998;17: 111–23.
- [46] Ortega HH, Rey F, Velazquez MM, Padmanabhan V. Developmental programming: effect of prenatal steroid excess on intraovarian components of insulin signaling pathway and related proteins in sheep. *Biol Reprod* 2010;82:1065–75.
- [47] Baravalle C, Salvetti NR, Mira GA, Lorente JA, Ortega HH. The role of ACTH in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome in rats: hormonal profiles and ovarian morphology. *Physiol Res* 2007;56: 67–78.
- [48] Salvetti NR, Acosta JC, Gimeno EJ, Müller LA, Mazzini RA, Taboada AF, Ortega HH. Estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptors in normal bovine ovarian follicles and cystic ovarian disease. *Vet Pathol* 2007;44:373–8.
- [49] Ortega HH, Salvetti NR, Müller LA, Amable P, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with cystic ovarian disease. *J Comp Pathol* 2007;136:222–30.
- [50] Ortega HH, Salvetti NR, Amable P, Dallard BE, Baravalle C, Barbeito CG, Gimeno EJ. Intraovarian localization of growth factors in induced cystic ovaries in rats. *Anat Histol Embryol* 2007; 36:94–102.
- [51] Baird DT, Campbell BK, Mann GE, McNeilly AS. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Reprod Fertil* 1991;43:125–38.
- [52] Silvia WJ, McGinnis AS, Ben Hatler T. A comparison of adrenal gland function in lactating dairy cows with or without ovarian follicular cysts. *Reprod Biol* 2005;5:19–29.
- [53] Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 2000;21:55–89.
- [54] Echternkamp SE. Relationship between LH and cortisol in acutely stressed beef cows. *Theriogenology* 1984;22:305–11.
- [55] Vighio GH, Liptrap RM. Plasma hormone concentrations after administration of dexamethasone during the middle of the luteal phase in cows. *Am J Vet Res* 1990;11:1711–4.
- [56] Luck MR, Jungclas B. The time-course of oxytocin secretion from cultured bovine granulosa cells, stimulated by ascorbate and catecholamines. *J Endocrinol* 1988;116:247–58.
- [57] Garverick HA, Baxter G, Gong J, Armstrong DG, Campbell BK, Gutierrez CG, Webb R. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. *Reproduction* 2002;123: 651–61.
- [58] Montgomery A, Viveiros M, Cummings E, Liptrap R. Rate of decline of cortisol concentrations in ovarian follicles following ACTH treatment in the sow. *Can J Vet Res* 1997;61:309–11.
- [59] Frautschy SA, Liptrap RM. Anovulation and plasma hormone concentrations after administration of dexamethasone during the middle of the luteal phase in sows undergoing estrous cycles. *Am J Vet Res* 1988;49:1270–5.
- [60] Dobson H, Smith RF. Stress and reproduction in farm animals. *J Reprod Fertil Suppl* 1995;49:451–61.
- [61] Tetsuka M, Thomas FJ, Thomas MJ, Anderson RA, Mason JI, Hillier SG. Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2006–9.
- [62] Yong PY, Thong KJ, Andrew R, Walker BR, Hillier SG. Development-related increase in cortisol biosynthesis by human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4728–33.
- [63] Harlow CR, Jenkins JM, Winston RM. Increased follicular fluid total and free cortisol levels during the luteinizing hormone surge. *Fertil Steril* 1997;68:48–53.
- [64] Fateh M, Ben-Rafael Z, Benadiva Jr CA, Mastroianni L, Flickinger GL. Cortisol levels in human follicular fluid. *Fertil Steril* 1989;51: 538–41.
- [65] Michael AE, Collins TD, Norgate DP, Gregory L, Wood PJ, Cooke BA. Relationship between ovarian cortisol:cortisone ratios and the clinical outcome of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *Clin Endocrinol* 1999;51:535–40.
- [66] Garverick HA, Erb RE, Niswender GD, Callahan CJ. Reproductive steroids in the bovine, 3: changes during the estrous cycle. *J Anim Sci* 1971;32:946–56.
- [67] Roussel JD, Clement TJ, Aranas TJ. Changes of aldosterone in blood serum of dairy cattle during estrous cycle. *J Dairy Sci* 1983;66: 1734–7.
- [68] Lyimo ZC, Nielen M, Ouweltjes W, Kruij TA, van Eerdenburg FJ. Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology* 2000;53:1783–95.
- [69] Sunak N, Green DF, Abeysdeera LR, Thurston LM, Michael AE. Implication of cortisol and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the development of porcine (*Sus scrofa domestica*) ovarian follicles and cysts. *Reproduction* 2007;133: 1149–58.
- [70] Sun K, Yang K, Challis JR. Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by progesterone, estrogen, and the cyclic adenosine 5'-monophosphate pathway in cultured human placental and chorionic trophoblasts. *Biol Reprod* 1998;58:1379–84.
- [71] Thurston LM, Norgate DP, Jonas KC, Chandras C, Kloosterboer HJ, Cooke BA, Michael AE. Ovarian modulators of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) activity in follicular fluid from gonadotrophin-stimulated assisted conception cycles. *Reproduction* 2002; 124:801–12.
- [72] Souness GW, Latif SA, Laurenzo JL, Morris DJ. 11 alpha- and 11 beta-hydroxyprogesterone, potent inhibitors of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (isoforms 1 and 2), confer marked mineralocorticoid activity on corticosterone in the ADX rat. *Endocrinology* 1995; 136:1809–12.
- [73] Souness GW, Morris DJ. 11 alpha- and 11 beta-hydroxyprogesterone, potent inhibitors of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, possess hypertensinogenic activity in the rat. *Hypertension* 1996;27: 421–5.
- [74] Latif SA, Pardo HA, Hardy MP, Morris DJ. Endogenous selective inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms 1 and 2 of adrenal origin. *Mol Cell Endocrinol* 2005;243: 43–50.
- [75] Robinzon B, Prough RA. Interactions between dehydroepiandrosterone and glucocorticoid metabolism in pig kidney: nuclear and microsomal 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Arch Biochem Biophys* 2005;442:33–40.

- [76] Cook DL, Smith CA, Parfet JR, Youngquist RS, Brown EM, Garverick HA. Fate and turnover rate of ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J Reprod Fertil* 1990;90:37–46.
- [77] Calder MD, Manikkam M, Salfen BE, Youngquist RS, Lubahn DB, Lamberson WR, Garverick HA. Dominant bovine ovarian follicular cysts express increased levels of messenger RNAs for luteinizing hormone receptor and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta(4), delta(5) isomerase compared to normal dominant follicles. *Biol Reprod* 2001;65:471–6.
- [78] Isobe N, Yoshimura Y. Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle. *J Reprod Dev* 2007;53:1119–24.
- [79] Sasson R, Tajima K, Amsterdam A. Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2. *Endocrinology* 2001;142:802–11.
- [80] Amsterdam A, Tajima K, Sasson R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol* 2002;64:843–50.
- [81] Komiyama J, Nishimura R, Lee HY, Sakumoto R, Tetsuka M, Acosta TJ, Skarzynski DJ, Okuda K. Cortisol is a suppressor of apoptosis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 2008;78:888–95.