



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ciencias Veterinarias

Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

Tesis presentada para optar por el grado académico de Doctor en Ciencias Veterinarias

“Rol biológico de las BMPs y la AMH en la patogenia de la persistencia folicular relacionada con la Enfermedad Quística Ovárica Bovina.”

Autor: MV. Pablo Uriel Díaz
Director: Dr. Hugo Héctor Ortega
Codirectora: Dra. Natalia Raquel Salvetti

Los Justos

“Un hombre que cultiva un jardín, como quería Voltaire.

El que agradece que en la tierra haya música.

El que descubre con placer una etimología.

Dos empleados que en un café del Sur juegan un silencioso ajedrez.

El ceramista que premedita un color y una forma.

Un tipógrafo que compone bien esta página, que tal vez no le agrada

Una mujer y un hombre que leen los tercetos finales de cierto canto.

El que acaricia a un animal dormido.

El que justifica o quiere justificar un mal que le han hecho.

El que agradece que en la tierra haya Stevenson.

El que prefiere que los otros tengan razón.

Esas personas, que se ignoran, están salvando el mundo”.

...Jorge Luis Borges...

Dedico este trabajo a...

Mi familia, Mariángeles, Leylén, Marta, Juan y Horacio, quienes a través de los años han incentivado en mí el espíritu creativo y el pensamiento profundo, dejándome reconocerme feliz en la belleza del conocimiento.

Agradecimientos...

A Horacio, mi viejo, quién a través de su dedicación profesional, claridad, compañía y amistad supo enseñarme una manera de vivir la Medicina Veterinaria; profesión que hoy entrañablemente compartimos.

Al Dr. Hugo Ortega, por las infinitas oportunidades, por su disposición a compartir ideas, por el esfuerzo constante y humilde para que todos sigamos creciendo junto a la ciencia y la enseñanza.

A la Dra. Natalia Salvetti, por ser una guía y compañía constante en el trabajo. Ejemplo de dedicación y esfuerzo. Pilar donde sostenerse en momentos donde el día a día nubla la mirada, por siempre mostrarnos con claridad los caminos a seguir.

A mí amigo Matías Stangaferro, por todo el trabajo compartido y aprendido. Por ser un ejemplo de responsabilidad y dedicación. Por los pensamientos compartidos acerca de cómo desarrollarnos comprometidamente con nuestra profesión.

A la Dra. Florencia Rey, por siempre estar dispuesta a ayudar, brindándose desde el conocimiento, y una humilde y generosa capacidad de enseñar.

A José Bertoli y Natalia Gareis, por su amistad y predisposición para llevar adelante todos los proyectos que emprendimos.

A Valentina Matiller, por siempre tenderme su mano de manera desinteresada.

A Matías Belotti y Antonela Stassi, que por su compañía, amistad y trabajo compartido, forman una parte importante de lo vivido en estos últimos años de tesis.

A el Dr. Eduardo Picco, que con humildad, amistad y compromiso como docente, supo mostrarme con claridad los caminos de la ciencia y la educación universitaria.

A Cristián Leiva e Iván Garzón, porque me han prestado su ayuda incondicionalmente, permitiéndome alcanzar el desarrollo final de este trabajo.

A Gustavo Hein por su aporte invaluable para la culminación de esta tesis.

A todos mis amigos/as del laboratorio, personas que compartiendo su amistad hicieron amenos los días en el laboratorio. Todos, desde sus disciplinas, han dejado su impronta en esta tesis: Melisa Velázquez, Ayelén Amweg, Celina Baravalle, Fernanda Rodriguez, Pablo Siroski, Natalia Alfaro, Carolina Andreotti, Marcelo Zayas, Elizabet Pereyra, Eugenia Baravalle, Belkis Marelli, Ignacio Liprandi, Leandro Neme, Carolina Panzani, Bibiana Dallard, María Sol Renna, Silvina Addona, Camila Beccarúa, Mónica Cadoche, Andrea Duré, Carlos Franco, Emilia Huber, Mauricio Kern, Belén Peralta, Nicolás Picciochi, Emanuel Angeli, Sofía Sacco, Paula Silvestrini, Adrián Perri, Federico Podversich, Enrique Rebelindo.

A Fabián Barberis, Luciano Cattaneo y Ernesto Quercia que aportaron desinteresadamente recursos humanos y materiales para llevar a cabo partes fundamentales de este trabajo.

A los docentes de Farmacología, Enrique Formentini, Diego Díaz David y Hector Fernandez junto a quienes di mis primeros pasos en la investigación y la docencia.

A mí Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, por brindarme el lugar para aprender mi profesión y desarrollar mi vocación por la educación y la ciencia.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme las becas que me permitieron realizar los estudios de posgrado en la carrera del Doctorado en Ciencias Veterinarias.

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

Índice general

Abreviaturas utilizadas.....	I
Índice de tablas.....	III
Índice de figuras.....	IV
Resumen.....	XVIII
Abstract.....	XX
1. Introducción.....	1
1.1. Anatomía, histología y fisiología del ovario.....	2
1.1.1. Desarrollo embrionario del ovario.....	2
1.1.2. El Ovario.....	3
1.1.3. Clasificación de los folículos.....	5
1.1.4. Ciclo estral bovino.....	6
1.1.4.1. Regulación endócrina del ciclo estral.....	7
1.1.4.2. Dinámica folicular durante el ciclo estral.....	8
1.1.4.3. Función del cuerpo lúteo durante el ciclo estral.....	12
1.2. Superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante-β (TGF-β).....	12
1.2.1. Conceptos generales.....	12
1.2.2. Ligandos.....	15
1.2.3. Receptores.....	16
1.2.4. Proteínas de unión y co-receptores.....	16
1.3. Sistema de las BMPs.....	18
1.3.1. Ligandos.....	18
1.3.2. Receptores y proteínas de unión.....	19
1.3.3. Expresión de BMPs y su rol en la foliculogénesis.....	21
1.3.3.1. BMP-1.....	21
1.3.3.2. BMP-2.....	22
1.3.3.3. BMP-4.....	22
1.3.3.4. BMP-5.....	23
1.3.3.5. BMP-6.....	23
1.3.3.6. BMP-7.....	24
1.3.3.7. BMP-8.....	25
1.3.3.8. BMP-9.....	25
1.3.3.9. BMP-15.....	26
1.4. Hormona Anti-Mülleriana (AMH).....	28
1.4.1. Conceptos generales, ligandos y receptores.....	28
1.4.2. Expresión durante la foliculogénesis.....	30
1.4.3. AMH, recuento de folículos antrales y productividad.....	31
1.4.4. AMH y enfermedades de origen ovárico.....	32
1.5. Persistencia Folicular.....	33
1.6. Enfermedad Quística Ovárica.....	36

1.6.1. <i>Definición</i>	36
1.6.2. <i>Factores predisponentes</i>	37
1.6.2.1. Factores generales.....	37
1.6.2.2. Factores Específicos.....	38
1.6.3. <i>Etiopatogenia</i>	40
1.6.3.1. Disfunción hipotálamo-hipofisaria.....	41
1.6.3.2. Disfunción ovárica-folicular.....	42
1.7. <i>Consideraciones Finales</i>	45
2. Objetivos	47
2.1. <i>Hipótesis general</i>	48
2.2. <i>Objetivo general</i>	48
2.3. <i>Objetivos específicos</i>	48
3. Materiales y Métodos	49
3.1. <i>Procedimientos generales efectuados con animales</i>	50
3.1.1. <i>Técnicas utilizadas para la obtención de muestras in vivo</i>	50
3.1.1.1. Aspiración de líquido folicular guiada por ecografía.....	50
3.1.1.2. Ovariectomía bilateral.....	50
3.1.1.2.1. Técnica por colpotomía (transvaginal).....	51
3.1.1.2.2. Técnica de laparotomía por flanco izquierdo.....	52
3.1.1.3. Técnicas para la obtención de muestras de sangre.....	53
3.1.1.3.1. A través de punción de vasos coccígeos.....	53
3.1.1.3.2. A través de un catéter endovenoso yugular.....	54
3.1.2. <i>COD espontánea</i>	54
3.1.2.1. Diagnóstico de COD espontánea.....	54
3.1.2.2. Obtención de muestras.....	55
3.1.3. <i>COD inducida mediante ACTH</i>	56
3.1.3.1. Animales.....	56
3.1.3.2. Grupos experimentales.....	57
3.1.3.3. Monitoreo de los cambios ováricos.....	57
3.1.3.4. Obtención de muestras.....	58
3.1.4. <i>Modelo de persistencia folicular</i>	58
3.1.4.1. Animales.....	58
3.1.4.2. Elección del protocolo de sincronización de celos.....	58
3.1.4.2.1. Protocolo “ovsynch”.....	59
3.1.4.2.2. Protocolo “G6G”.....	60
3.1.4.3. Grupos Experimentales.....	60
3.1.4.4. Protocolo de inducción de folículos persistentes.....	61
3.1.4.5. Monitoreo de los cambios ováricos.....	62
3.1.4.6. Toma de muestras.....	62
3.1.4.6.1 Obtención de muestras de sangre.....	62
3.1.4.6.2. Recolección y preparación de muestras de tejido ovárico.....	64

3.2. Procesamiento de las muestras.....	64
3.2.1. <i>Procesamiento del líquido folicular rico en células de la granulosa.....</i>	65
3.2.2. <i>Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas.....</i>	66
3.2.3. <i>Procesamiento de las muestras para western blot.....</i>	66
3.2.4. <i>Procesamiento de las muestras para RT-PCR.....</i>	66
3.2.4.1. Purificación de ARN.....	66
3.2.4.2. Transcripción reversa.....	67
3.3. Cuantificación de hormonas en suero y líquido folicular.....	67
3.4. Detección y cuantificación de miembros de la familia de las BMPs y AMH...	68
3.4.1. <i>Inmunohistoquímica simple.....</i>	68
3.4.2. <i>Western blot.....</i>	71
3.4.3. <i>Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....</i>	74
3.4.4. <i>Análisis digital de imágenes.....</i>	74
3.4.5. <i>Análisis de la expresión de ARNm de BMP-2, BMP-4 y BMP-6.....</i>	75
3.4.5.1. Diseño de cebadores específicos, clasificación de las muestras y validación de las condiciones de la PCR en tiempo real.....	75
3.4.5.2. PCR en tiempo real.....	76
3.4.5.3. Secuenciación de nucleótidos.....	77
3.5. Evaluación estadística.....	78
4. Resultados.....	80
4.1. Resultados de procedimientos efectuados con animales.....	81
4.1.1. <i>Diagnóstico y obtención de muestras provenientes de casos de COD espontánea.....</i>	81
4.1.2. <i>Modelo de inducción de quistes mediante ACTH.....</i>	81
4.1.3. <i>Modelo de Persistencia Folicular inducida mediante P4.....</i>	82
4.1.3.1. Ultrasonografía y dinámica de los folículos persistentes.....	82
4.1.3.2. Efectos de dosis bajas y constantes de P4 sobre la morfología folicular..	83
4.1.3.3. Efectos de dosis bajas y constantes de P4 sobre las concentraciones séricas de E2, P4 y FSH.....	85
4.1.3.4. Efectos de dosis bajas y constantes de P4 sobre la pulsatilidad y el pico preovulatorio de LH.....	86
4.1.3.5. Niveles de hormonas esteroides en suero y líquido folicular al momento de la toma de muestras.....	88
4.2. <i>Localización y expresión de BMP-2, BMP-4 y BMP-6 y BMP-1B.....</i>	89
4.2.1. <i>BMP-2.....</i>	89
4.2.1.1. Expresión génica en los grupos COD espontánea y control.....	89
4.2.1.2. Expresión proteica y localización en los grupos COD espontánea, COD inducida con ACTH y control.....	89
4.2.2. <i>BMP-4.....</i>	94
4.2.2.1. Expresión génica en los grupos COD espontánea y control.....	94
4.2.2.2. Expresión proteica y localización en los grupos COD espontánea, COD inducida con ACTH y control.....	95

4.2.3. <i>BMP-6</i>	99
4.2.3.1. Expresión génica en los grupos COD espontánea y control.....	99
4.2.3.2. Expresión proteica y localización en los grupos COD espontánea, COD inducida con ACTH y control.....	100
4.2.4. <i>BMPR-1B</i>	104
4.2.4.1. Expresión proteica y localización en los grupos COD espontánea, COD inducida con ACTH y control.....	104
4.3. Localización y expresión proteica de BMP-2, BMP-4 y BMP-6 en folículos ováricos durante la persistencia folicular inducida mediante P4	109
4.3.1. <i>BMP-2</i>	110
4.3.1.1. Expresión y localización.....	110
4.3.2. <i>BMP-4</i>	114
4.3.2.1. Expresión y localización.....	114
4.3.3. <i>BMP-6</i>	119
4.3.3.1. Expresión y localización.....	119
4.4. Especificidad de los anticuerpos	124
4.5. Localización y expresión proteica de AMH en folículos ováricos durante la persistencia folicular, en COD espontánea a campo y controles	125
4.5.1. Determinación de la concentración de AMH en líquido folicular por ELISA, en los grupos de persistencia folicular inducida, COD espontánea y controles.....	129
5. Discusión	131
5.1. Inducción experimental de la enfermedad quística ovárica: relaciones con hallazgos en la enfermedad espontánea en bovinos	132
5.2. Inducción experimental de la persistencia folicular asociada a COD	134
5.2.1. Concentraciones intermedias de progesterona: su efecto sobre la histomorfometría ovárica.....	135
5.2.2. Concentraciones intermedias de progesterona: su efecto sobre los niveles de gonadotrofinas y de hormonas esteroides.....	137
5.2.2.1. Gonadotrofinas.....	137
5.2.2.2. Esteroides gonadales.....	138
5.2.3. Conclusiones parciales.....	141
5.3. Expresión de integrantes de la subfamilia de las BMPs en ovarios de animales normales y con persistencia folicular inducida con P4, COD espontánea y COD inducida con ACTH	141
5.3.1. Expresión de BMP-2.....	142
5.3.2. Expresión de BMP-4.....	143
5.3.3. Expresión de BMP-6.....	145
5.3.4. Expresión de BMPR-1B.....	147
5.3.5. Conclusiones parciales.....	148
5.4. Expresión de AMH en folículos preovulatorios normales, en animales con COD espontánea y en la persistencia folicular inducida	150

6. Conclusiones.....	153
7. Bibliografía.....	158

Abreviaturas utilizadas

17OHP4	17-hidroxiprogesterona
ACTH	Adrenocorticotrofina
ActR	Receptor de activina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AGNEs	ácidos grasos no esterificados
ALK	Quinasa similar al receptor de activina
AMH	Hormona antimulleriana
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BAMBI	Inhibidor ligado a membrana de BMP y activina
BEN	Balance energético negativo
BMP	Proteína morfogénica del hueso
BMPR	Receptor de proteína morfogénica del hueso
BP	Proteína de unión
CC	Condición corporal
CG	Células de la granulosa
CGP	Células germinales primordiales
CL	Cuerpo Lúteo
COC	Complejo cumulus ovocito
COD	Enfermedad quística ovárica
Co-SMADs	Molécula asociada a SMAD
CRH	Hormona liberadora de corticotrofina
CSF	Factor estimulante de colonias
CT	Células de la teca
Ct	Ciclo umbral
CYP11A1	Enzima de clivaje de la cadena lateral de colesterol
CYP17A1	Enzima citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa
CYP19A1	Enzima citocromo P450 aromatasa
DAB	3-3'-diaminobencidina
DE	Desvío estándar
DEL	Días en lactancia
dNTP	Dexoxiribonucleotidos trifosfatos
E2	17 β -estradiol
ECLIA	Electroquimioluminiscencia inmunoensayo
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ESR	Receptor de estrógenos
FD	Folículo dominante
FSH	Hormona foliculoestimulante
FSHR	receptor de hormona foliculoestimulante
GDF	Factor de crecimiento y diferenciación
GDNF	Factor neurotrófico derivado de las células gliales
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
HSD	Hidroxiesteroide deshidrogenasa

IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
IGF	Factor de crecimiento análogo a insulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquinas
I-SMAD	SMAD inhibidora
LH	Hormona luteinizante
LHCGR	Receptor de hormona luteinizante/coriogonadotrofina
LHR	Receptor de hormona luteinizante
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCR	Receptor de melanocortina
MEC	Matriz extracelular
MIS	Sustancia inhibidora Mülleriana
MMLV	Virus de la leucemia murina Moloney
P10	10 días de persistencia
P15	15 días de persistencia
P4	Progesterona
P5	5 días de persistencia
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
PCOS	Síndrome Poliquístico Ovárico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PM	Peso molecular
RGM	Moléculas guía repulsivas
RIA	Radioinmunoensayo
R-SMADs	Receptor regulado por SMAD
RT-PCR	Real-time PCR
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEM	Error estándar de la media
StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
TBS-T	Buffer tris salino-Tween
TGFBR	Receptor del factor de crecimiento transformante β
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TMB	Tetrametilbenzidina
TNFs	Factor de necrosis tumoral
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
ZP	Zona pelúcida

Índice de tablas

Tabla 1:	Clasificación morfológica de folículos ováricos más empleada para bovinos.	6
Tabla 2:	Miembros de la familia de las BMPs con sus nombres alternativos.	19
Tabla 3:	Relación entre ligandos, receptores y SMADs dentro de la familia de las BMPs.	20
Tabla 4:	Efectos de las BMPs en la ovocitogénesis y foliculogénesis en rumiantes.	29
Tabla 5:	Detalle de los anticuerpos primarios utilizados y las condiciones de uso en la técnica de inmunohistoquímica.	69
Tabla 6:	Detalle de los anticuerpos secundarios utilizados, y las condiciones de uso en la técnica de inmunohistoquímica.	70
Tabla 7:	Detalle de los anticuerpos primarios utilizados en la técnica de western blot	72
Tabla 8:	Detalle de los anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de western blot	73
Tabla 9:	Pares de cebadores (secuencia de cebadores forward/reverse, 5'→3') usados para PCR en tiempo real.	76
Tabla 10:	Promedios de la concentración basal, frecuencia pulsátil, concentración y amplitud de los pulsos de LH durante la fase folicular y lútea media en controles y a los 5, 10 y 15 días de persistencia en los animales tratados con P4	88

Índice de figuras

Figura 1:	Desarrollo embrionario del ovario.	3
Figura 2:	Estructura del ovario. Fol: folículo, CL: cuerpo lúteo.	4
Figura 3:	Estructura de un folículo antral.	5
Figura 4:	Etapas de las fases folicular y lútea en asociación con los cambios en las concentraciones circulantes de 17β -estradiol (E2) y progesterona (P4) durante el ciclo estral bovino.	7
Figura 5:	Esquema de los principales mecanismos de regulación endócrina del eje hipotálamo hipófisis gónadal. CL: cuerpo lúteo. GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas. FSH: hormona foliculoestimulante. LH: hormona luteinizante. P4: progesterona. E2: estradiol.	9
Figura 6:	Esquema de las concentraciones hormonales y la dinámica de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. FSH: hormona foliculoestimulante. LH: hormona luteinizante. $PGF2\alpha$: prostaglandina $F2\alpha$. FD: folículo dominante. FA: folículo atrésico.	13
Figura 7:	Representación esquemática de las citoquinas involucradas en la foliculogénesis. Interacciones y localizaciones basadas en un modelo humano con inferencias realizadas a partir de modelos animales. O: ovocito; PG: células pre-granulosa; G: células de la granulosa; PT: células pre-tecales; T: células de la teca. Las flechas negras indican producción de citoquinas; las flechas rojas sólidas indican interacciones positivas, mientras las flechas sólidas azules indican interacciones negativas. Las flechas punteadas indican posibles interacciones; las flechas alineadas indican un sinergismo potencial.	14
Figura 8:	Mecanismo de señalización de BMPs a través de proteínas SMADs. Las BMPs se unen a dos tipos de receptores, induciendo fosforilación de los R-SMADs, los que forman complejos con las Co-SMADs, que viajan al núcleo, donde regulan la transcripción de genes blanco. Uno de éstos es el gen I-SMAD, el cual suprime la señalización interactuando con el receptor tipo I inhibiendo la formación del complejo R-SMAD-Co-SMAD.	21

Figura 9:	Expresión de las BMPs en diferentes estadios del desarrollo folicular en mamíferos. El sistema de BMPs actúa promoviendo el desarrollo folicular y el crecimiento celular, regulando las funciones de los distintos componentes de los folículos ováricos. CGP: células germinales primordiales.	28
Figura 10:	Esquema del efecto inhibitorio de AMH sobre las distintas poblaciones foliculares. Nótese el efecto de R- (retroalimentación negativa) sobre el crecimiento de folículos primarios, preantrales y antrales pequeños, participando de esta manera en la selección del FD, y sobre la población de folículos primordiales, impidiendo que éstos dejen el pool de reserva ovárico evitando su temprano agotamiento. CG: células de la granulosa. CT: células de la teca.	30
Figura 11:	Modelo de la regulación de la producción de AMH en la vaca. Ovario: La mayor expresión de AMH (flechas rojas) se da a nivel de las células de la granulosa externas y en las células del cumulus de folículos antrales pequeños (1 a 5 mm). Folículo: factores intrafoliculares como BMPs pueden mejorar la expresión de AMH, mientras FSH actúa como un factor inhibitorio. Sangre: AMH decrece en los días siguientes al estro como consecuencia a la acción negativa de la FSH periovulatoria sobre la población de folículos secretores de altas concentraciones de AMH.	31
Figura 12:	Técnica de aspirado folicular guiado por ecografía.	51
Figura 13:	Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje transvaginal.	52
Figura 14:	Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje por flanco izquierdo.	53
Figura 15:	Colocación del catéter endovenoso yugular.	54
Figura 16:	Diagnóstico ecográfico de COD. A: ovario con un quiste folicular B: ovario contralateral con escaso desarrollo folicular. En ambos ovarios no se detecta la presencia de cuerpo lúteo. C: cuerno uterino con ausencia de tono.	55
Figura 17:	Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes foliculares mediante ACTH. D: día.	57

- Figura 18:** Diseño experimental para la inducción de persistencia folicular. Luego de la sincronización de celos, las vacas del grupo tratado recibieron un dispositivo intravaginal de liberación lenta de progesterona para inducir la persistencia folicular. La dinámica de desarrollo folicular fue monitoreada diariamente por ultrasonografía y los niveles en sangre de hormonas esteroideas y gonadotróficas fueron evaluados a los tiempos indicados en la figura. Las ovariectomías fueron realizadas en fase folicular en los controles y a los 5, 10 y 15 días de persistencia folicular en los animales tratados. 62
- Figura 19:** Secuencia de imágenes ecográficas que muestran el desarrollo folicular en un animal del grupo tratado (P15) hasta los 15 días de persistencia, que evolucionó hasta el estadio de quiste folicular. OI: Ovario Izquierdo, OD: Ovario Derecho, CL: Cuerpo lúteo. 63
- Figura 20:** Esquema de la procedencia de las muestras destinadas a distintos estudios. 65
- Figura 21:** Marcadores de PM para SDS-PAGE, amplio espectro (Rainbow™, RPN800E, GE Healthcare). 72
- Figura 22:** (A) Máximo diámetro del folículo dominante y del folículo persistente en vacas controles (●) y tratadas (■), respectivamente. Se muestran las medias (\pm EEM) del diámetro folicular interno y las diferencias con el folículo preovulatorio de controles. (B) Fotos seleccionadas de ultrasonidos de folículos preovulatorios en vacas controles y tratadas, y de folículos con 5, 10 y 15 días de persistencia folicular de las vacas tratadas. 83
- Figura 23:** Imágenes microscópicas representativas (A) y análisis histomorfométrico (B) del espesor de la pared folicular de folículos preovulatorios controles y de folículos con 5, 10 y 15 días de persistencia. Se observó un efecto significativo del tiempo ($p < 0,01$) sobre el espesor de ambas capas de células, y una disminución en el espesor de las capas de células de la granulosa y teca interna hacia el día 15 de persistencia en relación a los folículos preovulatorios controles ($*p < 0,05$). Los valores representan la media \pm EEM. G: granulosa; T: teca. Barras = 50 μ m. 84

- Figura 24:** Concentraciones séricas de E2, P4 y FSH en vacas controles (●) y tratadas (■). Los resultados se expresan como la media ± EEM. Los datos fueron analizados de acuerdo al tiempo de ovulación en controles (día 0). D: efecto de los días de protocolo experimental; T: efecto del tratamiento; D*T: interacción entre días de protocolo experimental y tratamiento. 86
- Figura 25:** Perfiles representativos de LH, se observa la aparición del pico de LH en vacas controles (A) y la ausencia del mismo en las vacas tratadas con P4 (B). Las muestras de sangre fueron tomadas cada 2 h por un total de 48 h, desde las 56 h hasta las 104 h posteriores a la inyección de PGF2α. 87
- Figura 26:** Se muestran perfiles representativos de la frecuencia pulsátil de LH. Las muestras de sangre fueron tomadas cada 12 min por 8 h, comenzando 48 h después de la PGF2α para la fase folicular (A, B), al día 5, 10 y 15 de persistencia folicular (C, D, E, respectivamente) y en el día 10 después de la ovulación, durante la mitad de la fase lútea (F). 87
- Figura 27:** Concentraciones de E2, P4, 17OHP4, y testosterona en suero y líquido folicular al momento de la ovariectomía. Las barras representan las medias ± EEM para cada hormona en suero o líquido folicular. Las barras con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$). 90
- Figura 28:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media ± DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 91
- Figura 29:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en el grupo COD inducida con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media ± DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular ($p < 0,05$). Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 92

- Figura 30:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular ($p < 0,05$). Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 92
- Figura 31:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 93
- Figura 32:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 93
- Figura 33:** Imágenes representativas de la inmunomarcación de BMP-2 en distintas categorías foliculares de los grupos control, COD espontánea e inducida con ACTH. Se muestra además un control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m. 94
- Figura 34:** Expresión de ARNm de BMP-4 determinado por PCR en tiempo real en células foliculares de casos de COD espontánea (barra verde) en relación a ovarios controles (barra anaranjada). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 95
- Figura 36:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en el grupo COD inducida con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 96

- Figura 37:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 97
- Figura 38:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 98
- Figura 39:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 98
- Figura 40:** Imágenes representativas de la inmunomarcación de BMP-4 en distintas categorías foliculares de los grupos control, COD espontánea e inducida con ACTH. Se muestra además un control negativo de la inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m. 99
- Figura 41:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 100

- Figura 42:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en el grupo COD inducida con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 101
- Figura 43:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 102
- Figura 44:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 102
- Figura 45:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 103
- Figura 46:** Imágenes representativas de la inmunomarcación de BMP-6 en distintas categorías foliculares de los grupos control, COD espontánea e inducida con ACTH. Se muestra además un control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m. 104

- Figura 47:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMPR-1B en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). 105
- Figura 48:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMPR-1B en el grupos COD inducida con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 106
- Figura 49:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMPR-1B en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 106
- Figura 50:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMPR-1B en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 108
- Figura 51:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMPR-1B en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 108
- Figura 52:** Imágenes representativas de la inmunomarcación de BMPR-1B en distintas categorías foliculares de los grupos control, COD espontánea e inducida con ACTH. Se muestra además un control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m. 109

- Figura 53:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$) 110
- Figura 54:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 111
- Figura 55:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). 112
- Figura 56:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE.* indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular ($p < 0,05$). 112
- Figura 57:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular ($p < 0,05$). 113
- Figura 58:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 113

- Figura 59:** Imágenes representativas de la inmunomarcación de BMP-2 en distintas categorías foliculares de los grupos control, P5, P10 y P15. Se muestra además un control negativo de la inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m. 114
- Figura 60:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 115
- Figura 61:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 116
- Figura 62:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 117
- Figura 63:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). 118
- Figura 64:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 118

- Figura 65:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 118
- Figura 66:** Imágenes representativas de la inmunomarcación de BMP-4 en distintas categorías foliculares de los grupos control, P5, P10 y P15. Se muestra además un control negativo de la inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m. 119
- Figura 67:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 120
- Figura 68:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 121
- Figura 69:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$). 122

- Figura 70:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$). 122
- Figura 71:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) y números (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$). 123
- Figura 72:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$). 123
- Figura 73:** Imágenes representativas de la inmunomarcación de BMP-6 en distintas categorías foliculares de los grupos control, P5, P10 y P15. Se muestra además un control negativo de la inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m. 124
- Figura 74:** Los inmunoblot muestran la especificidad de los anticuerpos utilizados. Las flechas indican las bandas correspondientes al peso molecular de cada proteína. 125

- Figura 75:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMH en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 126
- Figura 76:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMH en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$). 127
- Figura 77:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMH en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$). 127
- Figura 78:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMH en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$). 128
- Figura 79:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMH en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$). 128

- Figura 80:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMH en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$). 129
- Figura 81:** Imágenes representativas de la inmunomarcación de AMH en distintas categorías foliculares de los grupos control, COD espontánea, P5, P10 y P15. Se muestra además un control negativo de la inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m. 130
- Figura 82:** Determinación de AMH en líquido folicular de folículos con 5, 10 y 15 días de persistencia (P5, P10, P15), de quistes espontáneos a campo y controles. Las barras representan la media \pm DE y las letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$). 129

Resumen

La enfermedad quística ovárica es una enfermedad dinámica que genera importantes pérdidas en la industria láctea, caracterizada por una falla en la ovulación, anestro y persistencia folicular. Factores locales participan de manera autocrina y paracrina en la comunicación entre las células foliculares, regulando el desarrollo folicular. El objetivo de esta tesis fue estudiar la participación de las BMPs y AMH en alteraciones ováricas asociadas a la etiopatogenia de la COD. Se utilizaron muestras provenientes de animales con COD espontánea, inducida con ACTH, controles preovulatorios y de un modelo de inducción de folículos persistentes con dosis bajas de progesterona. Los modelos experimentales resultaron apropiados para el estudio de la persistencia folicular y la COD. Se demostró en animales con persistencia folicular un patrón pulsátil de LH de alta frecuencia, baja amplitud y concentración. Además, se encontraron similitudes en las concentraciones de hormonas esteroides entre folículos persistentes y quistes, así como en sus características histomorfométricas. Se hallaron expresiones elevadas de BMP-4, BMP-6, BMP-1B y sostenidas de BMP-2 en folículos persistentes y quistes. AMH presentó concentraciones elevadas en líquido folicular de folículos con 10 y 15 días de persistencia. Los resultados obtenidos permiten suponer que el desequilibrio en la expresión de factores locales puede cumplir un rol importante en la etiopatogenia de la COD, alterando sistémica y localmente el equilibrio del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Este trabajo aporta herramientas para una profunda comprensión de la etiopatogenia de la COD, mejorando así sus posibilidades de diagnóstico, tratamiento y consecuentemente la eficiencia reproductiva de los rodeos.

Abstract

Cystic ovarian disease is a dynamic disease that generates significant economic losses to the dairy industry. It is characterized by ovulation failure, anestrus and follicular persistence. Local factors regulate follicular development through follicular cells communication in an autocrine-paracrine way. The aim of this work was to study the involvement (role) of BMPs and AMH in ovarian abnormalities associated with COD pathogenesis. Samples from animals with spontaneous COD, ACTH induced COD, preovulatory controls follicles and persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone were used. Experimental models were suitable for the study of follicle persistence and COD. In animals with follicular persistence was demonstrated that LH pulsatility showed high frequency, low amplitude and low concentration. Furthermore, we found similarities between steroid hormones concentrations in persistent follicles and cysts, as well as their histomorphometric characteristics. High expression of BMP-4, BMP-6, BMP-1B and sustained BMP-2 in persistent follicles and cysts were found. AMH showed high concentrations in follicular fluid of follicles with 10 and 15 days of persistence. These data suggest that the imbalance in the expression of local factors can play an important role in the pathogenesis of COD, altering the local and systemic balance of the hypothalamus-pituitary-gonadal axis. This study provides tools for a deeper understanding of the pathogenesis of COD, improving their chances of diagnosis, treatment and consequently the reproductive efficiency of the dairy herds.

1. Introducción

1.1. Anatomía, histología y fisiología del ovario

1.1.1. Desarrollo embrionario del ovario

Las gónadas se originan del lado ventro-medial de los mesonefros, donde la proliferación del epitelio celómico y una condensación del mesénquima subyacente forman una pequeña formación llamada “cresta gonadal” que en bovinos se desarrolla entre los 28 y 32 días de gestación (Noden y de Lahunta, 1985; Rüsse y Sinowatz, 1991). Inicialmente no contiene células germinales primordiales, las cuales, en este momento, están localizadas en el epitelio del saco vitelino. Desde este lugar, las células germinales primordiales migran hasta alcanzar las crestas gonadales. En bovinos esta migración ocurre entre los 30 a 64 días de gestación (Rüsse y Sinowatz, 1991). Luego, el mesénquima de las crestas gonadales es invadido por proliferaciones de epitelio dando origen a los “cordones corticales y medulares (cordones sexuales primarios)”. Los cordones sexuales se disgregan en grupos de células (*clusters*) y se desarrollan dentro de la *rete ovarii* y el tejido vascular del ovario (Lin y col., 2002; Smitz y Cortvrindt, 2002). Los cordones medulares contribuyen a la formación de la médula de la futura gónada y los cordones corticales a la corteza. Mientras en la gónada la mayoría de las células germinales primordiales siguen proliferando, antes de nacer el número decrece dramáticamente como resultado del proceso de apoptosis. En la vaca, el número máximo de células germinales primordiales es de aproximadamente 2.100 millones, y termina reduciéndose a 130 mil al momento del nacimiento (Erickson, 1966a,b). Una vez que llegan a las gónadas y se ubican en los cordones sexuales, estas células diploides que realizan mitosis se denominan ovogonias (Kaipia y Hsueh, 1997; Oktem y Oktay, 2008). Después de sucesivas divisiones mitóticas, el ADN de la ovogonia se replica y se lleva a cabo la primera división meiótica, quedando ésta detenida en la fase de diplotene de la profase I. Así, se terminan de formar los ovocitos primarios que aún permanecen en *clusters* o sincitios celulares. Seguidamente las células epiteliales de los cordones sexuales emiten procesos citoplasmáticos entre las ovogonias interconectadas (*clusters*), dividiéndolas en ovocitos rodeados por una sola capa de células foliculares (pre-granulosas) planas. Concurrentemente, una lámina basal es depositada en la superficie de las células granulosas, aislando efectivamente el nuevo folículo primordial del estroma ovárico. En la vaca, alrededor del día 90 de gestación ya están presentes folículos primordiales totalmente formados (Yang y Fortune, 2008) y cuando la ontogenia del ovario finaliza, los folículos quedan ubicados en la

corteza periférica dentro de una matriz de fibroblastos, colágeno y elastina (figura 1) (Aerts y Bols, 2010)

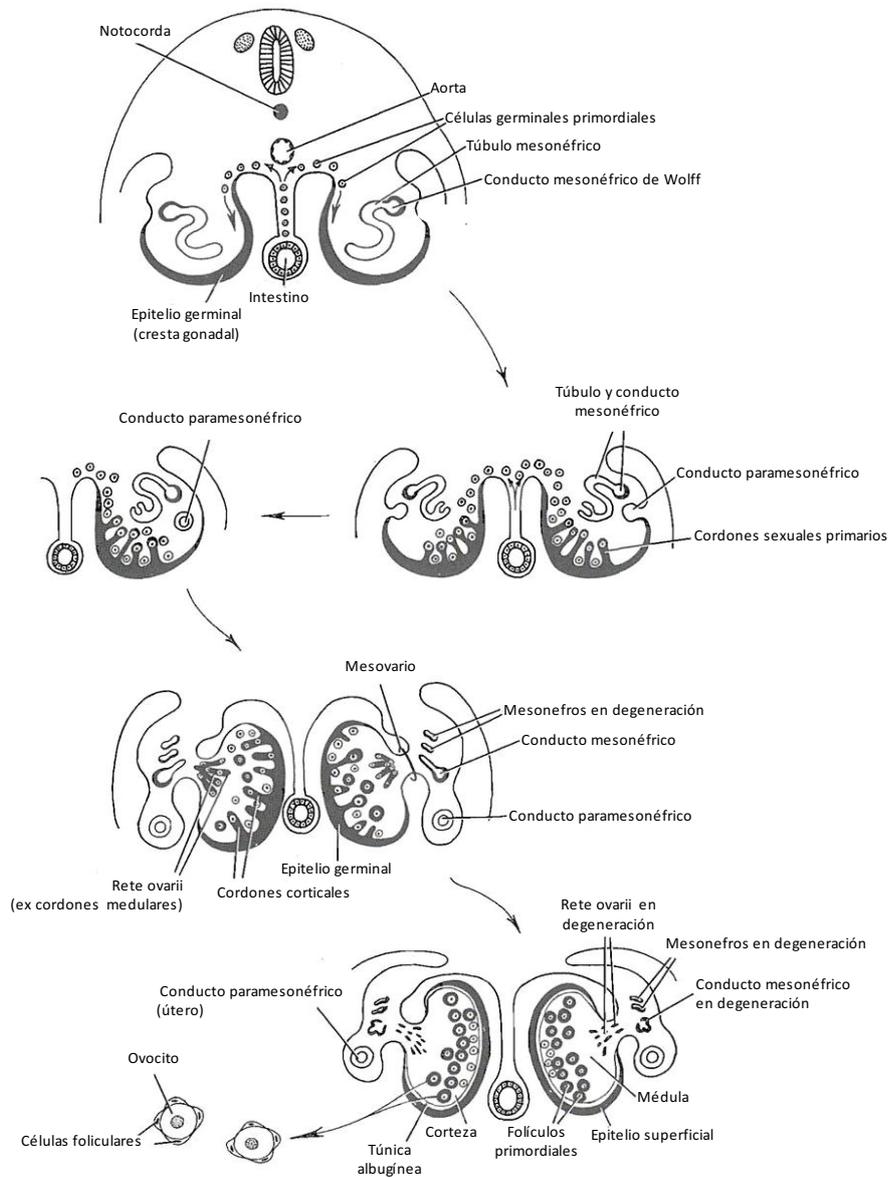


Figura 1. Desarrollo embrionario del ovario (Adaptado de Pansky, 1982)

1.1.2. El Ovario

El ovario es una glándula endócrina y exocrina, capaz de sintetizar hormonas y de liberar en cada ciclo reproductivo una célula germinal, el ovocito. Estos complejos procesos de biosíntesis y desarrollo celular se llevan a cabo en un ambiente muy complejo, donde factores endocrinos, paracrinos y autocrinos entran en relación para lograr la correcta

regulación de estos acontecimientos (Field y col., 2014). En el bovino, el ovario está constituido por una médula interna y una corteza externa, rodeada por un epitelio cuboidal superficial (epitelio germinativo) el cual se encuentra ubicado por encima de una capa densa de tejido conectivo, llamada túnica albugínea (Hafez y Hafez, 2002). La médula es el área compuesta principalmente por tejido conectivo en la que se encuentran gran cantidad de fibras nerviosas, vasos sanguíneos y linfáticos, así como también los componentes de la rete ovarii. Por su parte, la corteza contiene folículos en distintos estadios de desarrollo, cuerpos hemorrágicos, cuerpos lúteos y cuerpos albicans (cuerpos blancos) inmersos en una malla de tejido conectivo muy celular que da sostén y es el origen de varios componentes de los folículos (células tecales) y posteriores cuerpos lúteos (células luteínicas pequeñas) (Dellmann, 1994) (figura 2). En el ovario adulto, los ovocitos se encuentran rodeados por una o más capas de células que cumplen múltiples funciones, como protección, nutrición y sostén, que crecen gradualmente en número y forman eventualmente un folículo esférico lleno de líquido (Geneser, 2005). El folículo es el compartimiento que permite al ovario cumplir su doble función de gametogénesis y esteroidogénesis. Es una unidad fisiológica equilibrada cuyo funcionamiento y estructura dependen de factores externos y locales, los que llevan a una sucesión de transformaciones subcelulares y moleculares en sus diversos componentes: el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca (Hafez y Hafez, 2002) (figura 3).

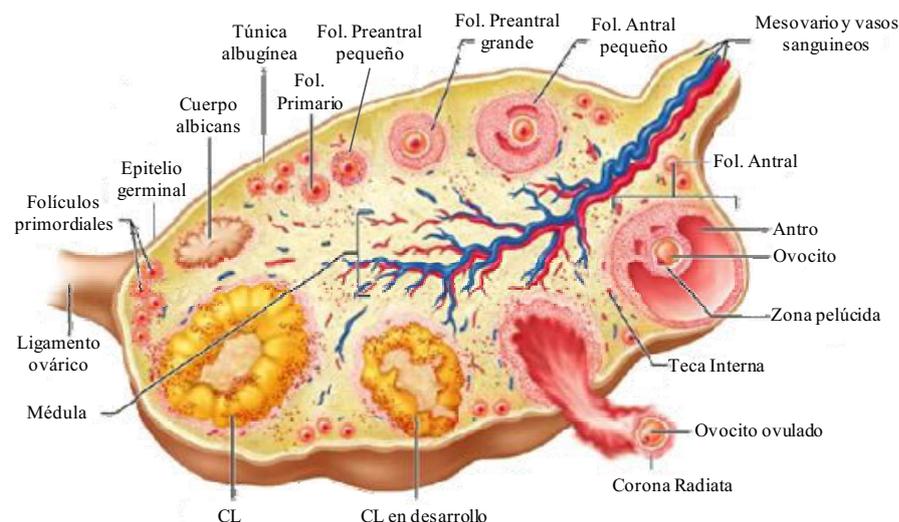


Figura 2: Estructura del ovario. Fol: folículo, CL: cuerpo lúteo. (Adaptado de Ebnesahidi, 2006).

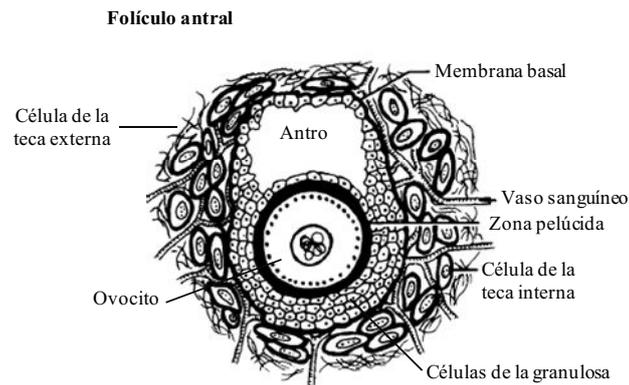


Figura 3: Estructura de un folículo antral (Adaptado de Reece, 2015).

1.1.3. Clasificación de los folículos

En orden de poder estudiar sistemáticamente a los folículos presentes en el ovario es importante poder realizar una correcta clasificación de ellos. Una clasificación específica para la especie bovina fue realizada por Braw-Tal y Yossefi, (1997). En ésta, los folículos primordiales (tipo I) están caracterizados por un ovocito quiescente, detenido en profase I de la meiosis, y rodeado por un número limitado (<10) de células de la granulosa planas. Estos folículos primordiales constituyen las reservas ováricas, a partir de las cuales los folículos son reclutados para su posterior desarrollo. En una primera fase de crecimiento, las células de la granulosa sufren una transformación y pasan de ser células planas a ser células cúbicas y su número se incrementa. Primeramente se forma una categoría folicular intermedia llamada folículo de transición (tipo I+) en donde se pueden observar una mezcla de células de la granulosa planas y cúbicas rodeando al ovocito. Un folículo primario (tipo II) está caracterizado por una capa completa o una capa y media de células de la granulosa cúbicas, rodeada por una lámina basal. En una segunda fase de crecimiento la capa de células de la granulosa continúa creciendo. Cuando éstas llegan a ser al menos unas 40, se evidencia el inicio del crecimiento del ovocito por un rápido aumento de su diámetro. El crecimiento del ovocito también induce la formación de la zona pelúcida, siendo esta capa parcialmente formada en los folículos preantrales pequeños (tipo III), y completa en los folículos preantrales grandes (tipo IV) (Braw-Tal y Yossefi, 1997). Las células de la teca derivan del estroma intersticial y están presentes como células individuales sobre la lámina basal de los folículos primarios (Hirshfield, 1991). Las primeras células de la teca interna pueden ser identificadas en los folículos tipo III, pero se distingue completa y claramente en los folículos

tipo IV. La formación del antro folicular comienza cuando el folículo alcanza las 250 células de la granulosa. Inicialmente aparecen como parches llenos de líquido entre las células de la granulosa, y finalmente cuando se produce la coalescencia de estos parches en una sola cavidad, el folículo pasa a llamarse “antral” (tipo V) (Smitz y Cortvrindt, 2002) (tabla 1).

Tabla 1: Clasificación morfológica de folículos ováricos más empleada para bovinos (Adaptado de Braw-Tal y Yossefi, 1997; Aerts y Bols, 2010)

Folículo	Capas de CG	Nº de CG	Diámetro folicular (µm)	Diámetro del ovocito (µm)	Presencia de ZP	Presencia de TI
Primordial (tipo I)	1	<10 planas	<40	30	No	No
Primario (tipo II)	1-1,5	10-40 Cúbicas	40-80	31	No	No
Preantral pequeño (tipo III)	2-3	41-100	81-130	49	No	No
Preantral grande (tipo IV)	4-6	101-250	131-250	69	+	+
Antral (tipo V)	>6	>250	250-500	93	++	++

CG: células de la granulosa, Nº: número de, ZP: zona pelúcida, TI: teca interna.

1.1.4 Ciclo estral bovino

El ciclo estral representa el patrón cíclico de la actividad ovárica que lleva a las hembras bovinas a pasar de un periodo no receptivo a uno de receptividad que finalmente permite el apareamiento y el subsecuente establecimiento de la preñez. El comienzo de los ciclos estrales ocurre en el momento de la pubertad. Esta ocurre en vaquillonas entre los 6-12 meses de edad, dependiendo de la raza y generalmente a un peso de 200-250 kg. La duración normal de un ciclo estral en vacas es de 18-24 días. El ciclo consiste en dos fases: la fase lútea (14-18 días) y la fase folicular (4-6 días). La fase lútea es el período que sigue a la ovulación y es donde se presenta un cuerpo lúteo (CL) estructural y funcionalmente completo, mientras la fase folicular es el período que sigue a la lisis del CL (luteólisis) hasta la ovulación. Durante la fase folicular ocurre la maduración final y la ovulación del folículo preovulatorio. Estas fases con frecuencia son llamadas *estro* (etapa donde se produce el comportamiento estral), *metaestro* (etapa donde se produce la ovulación), *diestro* (etapa donde el CL es funcionalmente competente) y *proestro* (etapa donde se da el crecimiento final del folículo preovulatorio) (Forde y col., 2011) (figura 4).

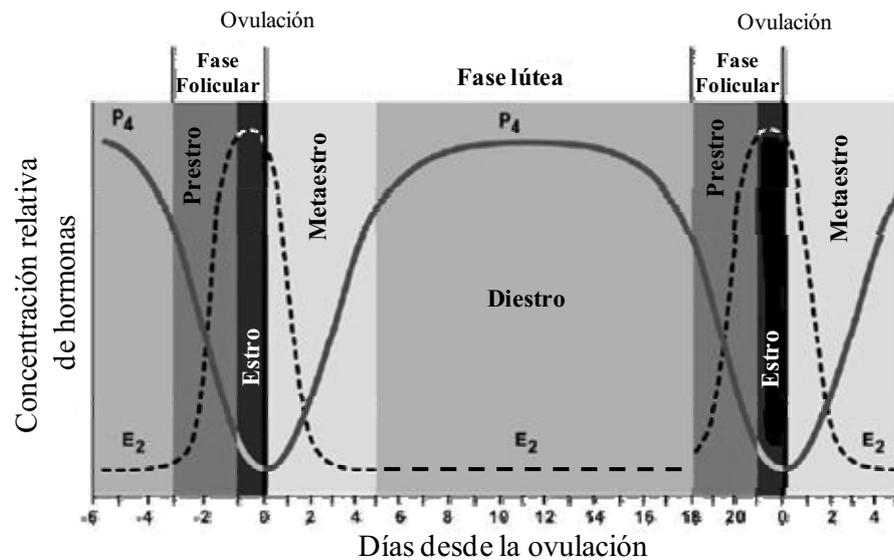


Figura 4: Etapas de las fases folicular y lútea en asociación con los cambios en las concentraciones circulantes de 17β-estradiol (E2) y progesterona (P4) durante el ciclo estral bovino. (Adaptado de Peter y col., 2009).

1.1.4.1. Regulación endócrina del ciclo estral

Las vacas son animales poliéstricos continuos y muestran comportamiento de celo aproximadamente cada 21 días. Resumidamente, el ciclo es regulado por las hormonas del hipotálamo (hormona liberadora de gonadotrofinas; GnRH, *del inglés: gonadotropin-releasing hormone*), la adenohipófisis (hormona foliculoestimulante; FSH, *del inglés: follicle stimulating hormone* y hormona luteinizante; LH, *del inglés: luteinizing hormone*), los ovarios (progesterona; P4, 17β-estradiol; E2, e inhibina) y el útero (prostaglandina F2α; PGF2α). Estas hormonas funcionan a través de mecanismos de retroalimentación negativa y positiva que gobiernan el control del ciclo estral (Roche, 1996). La GnRH controla el ciclo a través de sus acciones sobre la adenohipófisis regulando la secreción de las gonadotrofinas LH y FSH (Schally y col., 1971) (figura 5). La secreción pulsátil de niveles basales de GnRH desde el centro tónico del hipotálamo y el pico preovulatorio de GnRH desde el centro cíclico del hipotálamo previenen la desensibilización de su receptor en las células gonadotropas de la pituitaria anterior. Después del transporte de GnRH desde el hipotálamo a la hipófisis vía el sistema porta hipofisario (Moenter y col., 1992), la GnRH se une a un receptor de membrana acoplado a proteína G presente en las células gonadotropas (Kakar y col., 1993). Esta unión produce la liberación de calcio intracelular que activa la vía de transducción de señal de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que culmina con la liberación de FSH y LH desde compartimentos de almacenaje ubicados en el citoplasma (Weck y col., 1998). La

FSH es reservada en gránulos secretorios dentro del citosol por cortos períodos de tiempo, mientras LH es almacenada por largos períodos durante el ciclo estral (Farnworth, 1995). Las células gonadotropas de la adenohipófisis pueden ser mono-hormonales, liberando únicamente LH o FSH, o bi-hormonales, liberando ambas gonadotropinas (Molter-Gérard y col., 2000).

Durante la fase folicular, un incremento en las concentraciones de E2, debido al rápido crecimiento y proliferación celular que sufre el folículo dominante (FD), sumado a la caída concomitante de los niveles circulantes de P4 producidos debido a la luteolisis, inducen un pico de GnRH y permiten la aparición de conducta sexual y la receptividad a la monta (Frandsen y col., 2003). Este pico preovulatorio de GnRH induce picos coincidentes de FSH y LH (Sunderland y col., 1994). Solamente cuando la P4 se encuentra en concentraciones séricas basales y los pulsos de LH se suceden cada 40 a 70 min por 2 o 3 días, el FD puede ovular (Roche, 1996), la ovulación se da 10 a 14 hs después de comenzado el estro y es seguida por el comienzo de la fase luteal. Este período es también conocido como metaestro y tiene una duración de 3 a 4 días. Está caracterizado por la formación del CL a partir del cuerpo hemorrágico (folículo ovulado). Luego de la ovulación las concentraciones de P4 comienzan a incrementarse debido a la formación del CL, en el cual las células de la granulosa y de la teca interna se luteinizan y producen P4 que permitirá el establecimiento y mantenimiento de la preñez o la reanudación de un nuevo ciclo estral si no hubo fertilización del ovocito ovulado (Niswender, 1981). Durante el diestro, la P4 se mantiene elevada y se suceden repetidamente ondas de crecimiento folicular estimuladas por la liberación de FSH desde la adenohipófisis. Sin embargo, los FDs que crecen durante esta fase no llegan a ovular. La P4 que es dominante en esta fase, ejerce retroalimentación negativa y sólo permite la secreción de pulsos de LH de gran amplitud pero de baja frecuencia que no desencadenan la ovulación del FD (Rahe y col., 1980). Finalmente durante el proestro, la P4 cae debido al proceso de luteólisis a partir de la secreción de PGF2 α desde el útero (Hansel y Convey, 1983).

1.1.4.2. Dinámica folicular durante el ciclo estral

El crecimiento, desarrollo y maduración de los folículos ováricos es un proceso fundamental para lograr una alta eficiencia reproductiva en los animales domésticos. Un número fijo de folículos primordiales es establecido durante el desarrollo fetal. El crecimiento

inhibina contenidas en su líquido folicular, que también se presenta francamente aumentado (Hillier, 1994). Las elevadas concentraciones de E2 e inhibina ejercen retroalimentación negativa a nivel adenohipofisario reduciendo la FSH a niveles basales (Sunderland y col., 1994; Ginther y col., 2000 a,b). Este efecto negativo de los estrógenos sobre LH y FSH podría tener como objetivos las células bi-hormonales (FSH y LH) directamente a nivel adenohipofisario disminuyendo por diversos mecanismos el contenido de FSH de estas células, pasando a ser células mono-hormonales de LH que se suman a la población mono-hormonal de LH no afectada por los E2. Estos cambios explican la capacidad de las células gonadotropas de reservar concentraciones elevadas de LH para promover el pico preovulatorio de LH (Molter-Gérard y col., 2000). El FD se vuelve cada vez más sensible a la LH (Ginther y col., 2000a) y continúa creciendo a pesar de que las concentraciones de FSH decrecen. El cambio de un crecimiento dependiente de FSH (Adams y col., 1992) a uno LH dependiente (Kulick y col., 1999) se lleva a cabo por la presencia del receptor de LH (LHR) en las células de la granulosa (Xu y col., 1995). Este receptor está localizado en las células de la granulosa y de la teca interna de folículos sanos, en diferentes estadios del desarrollo folicular (Camp y col., 1991). A medida que el folículo crece los LHR de las células de la teca se incrementan y las células de la granulosa los adquieren, siendo de esta manera, seleccionados para llegar a ser el/los FD de esa onda de crecimiento (Xu y col., 1995; Bao y col., 1997; Braw-Tal y Roth, 2005). Por otra parte, se ha sugerido que incrementos transitorios en las concentraciones de LH circulante que ocurren en o alrededor de el momento de selección folicular (Ginther y col., 2003), permite al FD continuar la producción de E2 y crecer en un medio con bajas concentraciones de FSH (Ireland y Roche, 1983). Durante la fase luteal temprana se dan pulsos de LH de menor amplitud y mayor frecuencia (20–30 pulsos/24 h), en la mitad de la fase lútea (mitad de diestro) los pulsos incrementan su amplitud y reducen su frecuencia (6–8 pulsos/24 h). En ambos casos los pulsos son de una amplitud y frecuencia insuficiente para lograr la maduración y subsecuente ovulación del FD (Rahe y col., 1980). Así, el FD producido en la fase luteal del ciclo sufre atresia, caída en la producción de E2 e inhibina y como consecuencia queda abolida la retroalimentación negativa que ejercía sobre el eje hipotálamo-hipofisario y la secreción de FSH puede aumentar, conduciendo a la emergencia de una nueva onda de crecimiento folicular. La producción de altas concentraciones de E2 es una característica distintiva del FD (Ireland y Roche, 1982; Ireland y Roche, 1983) y antes de que aparezcan diferencias visibles en el diámetro folicular, este futuro FD tiene mayores concentraciones de E2 en el líquido folicular

comparado con los demás folículos en su cohorte (Fortune, 1994; Sunderland y col., 1994; Mihm y col., 2000).

La síntesis de E2 es dependiente de la producción de andrógenos en las células de la teca y su subsecuente aromatización en las células de la granulosa, pasando así de andrógenos a estrógenos, a este mecanismo dónde dos células participan conjuntamente en la producción de andrógenos se lo denomina, dos células/dos gonadotrofinas (Fortune y Quirk, 1988). La producción de E2 por los folículos en crecimiento depende de la correcta frecuencia pulsátil de LH (Crowe y col., 2001a,b). La unión de LH a su receptor en las células de la teca conduce a la conversión del colesterol a testosterona a través de una serie de reacciones catalíticas. Una vez producida, la testosterona difunde hacia las células de la granulosa donde es convertida a E2 por la CYP19A1 (Dorrington y col., 1975). El estradiol sintetizado tiene roles locales sobre el desarrollo folicular y sistémicos ejerciendo retroalimentación positiva sobre el eje hipotálamo/hipofisario. Durante la fase folicular del ciclo, cuando las concentraciones de P4 son bajas, estas altas concentraciones de E2 producidas por el FD inducen un pico de GnRH desde el hipotálamo que estimula un pico de LH hipofisario de amplitud y frecuencia suficiente para estimular la maduración final y la ovulación de este FD (Sunderland y col., 1994). Las concentraciones elevadas de E2 también inducen la expresión de manifestaciones de celo necesarias para un apareamiento exitoso (Ireland, 1987) (figura 6). Otros factores intra-ováricos juegan un rol importante en la regulación del ciclo estral actuando indirectamente alterando la síntesis de E2 o directamente ejerciendo retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo/hipofisario. En este sentido la biodisponibilidad del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I, del inglés: *insulin like growth factor I*), contribuye al crecimiento, proliferación y capacidad esteroideogénica del futuro FD (Mihm y col., 2000; Rivera y Fortune, 2003; Canty y col., 2006), indirectamente afectando la retroalimentación negativa del E2 sobre el eje hipotálamo-hipofisario. Este mecanismo en adición a la adquisición temprana de LHR en las células de la granulosa son considerados los mecanismos más importantes que dirigen el proceso de selección del FD (Lucy, 2007). La superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β , del inglés: *transforming growth factors β*), conformada por más de 30 proteínas estructuralmente relacionadas, también tiene un rol de importancia en el control del ciclo estral, así la activina puede incrementar la producción de E2 en el líquido folicular (Knight y Glistler, 2003), mientras la foliculostatina impide esta acción de la activina, en conjunto ambas pueden alterar el mecanismo de retroalimentación ejercido por E2 (Phillips y de Kretser, 1998). Asimismo, la inhibina, que fue detectada en las

células de la granulosa de la vaca, juega un rol de importancia impidiendo la secreción de FSH desde la adenohipófisis (Findlay y col., 2002).

1.1.4.3. Función del cuerpo lúteo durante el ciclo estral

El CL se origina a partir de las células del folículo ovulatorio. La LH es la mayor hormona luteotrópica en las vacas (Hansel, 1966), y es la responsable de estimular la luteinización de las células de la granulosa y de la teca interna del folículo preovulatorio (Alila y Hansel, 1984). Una de las funciones del CL es producir suficiente P4 para poder asegurar el mantenimiento de una gestación si el proceso de fertilización se llevó a cabo y existe un embrión dentro del útero. En este sentido, la P4 secretada por el CL produce una reducción en la secreción de gonadotrofinas y previene la aparición del estro (Forde y col., 2011). Por otra parte, las concentraciones elevadas de P4 durante la fase lútea del ciclo alteran el patrón de expresión de genes en el útero (Forde y col., 2009). Durante la mitad de la fase lútea, estas concentraciones elevadas de P4 producen una regulación hacia abajo del receptor nuclear de P4 en el epitelio luminal del endometrio (Kimmins y MacLaren, 2001). Si hacia el día 16 del ciclo, no ha sido detectada en cantidad suficiente la señal de reconocimiento materno de la preñez (interferón tau), se desencadena el proceso de luteólisis del CL. Así, la PGF2 α , el mayor agente luteolítico en rumiantes, es secretado por el útero (Baird y col., 1976; Kindahl y col., 1976; Nett y col., 1976; Lamothe y col., 1977). El receptor de oxitocina existente en el útero se une a la oxitocina proveniente de la neurohipófisis y a aquella proveniente del propio CL, propagándose de esta manera la secreción episódica de PGF2 α desde el útero, esta prostaglandina se dirige hacia el ovario a través de un mecanismo de contracorriente que le permite pasar desde la vena uterina directamente a la arteria ovárica. Así, durante la luteólisis se reducen las concentraciones circulantes de P4, las concentraciones de E2 se incrementan, la GnRH se libera del hipotálamo y el animal entra en una nueva fase folicular (Forde y col., 2011).

1.2. Superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β)

1.2.1. Conceptos generales

La generación de ovocitos maduros y competentes es la culminación de un proceso largo y altamente organizado. La foliculogénesis se compone de eventos interrelacionados y

altamente coordinados, que incluyen el reclutamiento de folículos primordiales, la proliferación de las células de la granulosa y de la teca, maduración del ovocito, esteroidogénesis y la ovulación (Richards y col., 1987; Richards y Hedin, 1988; McLaughlin y McIver, 2009).

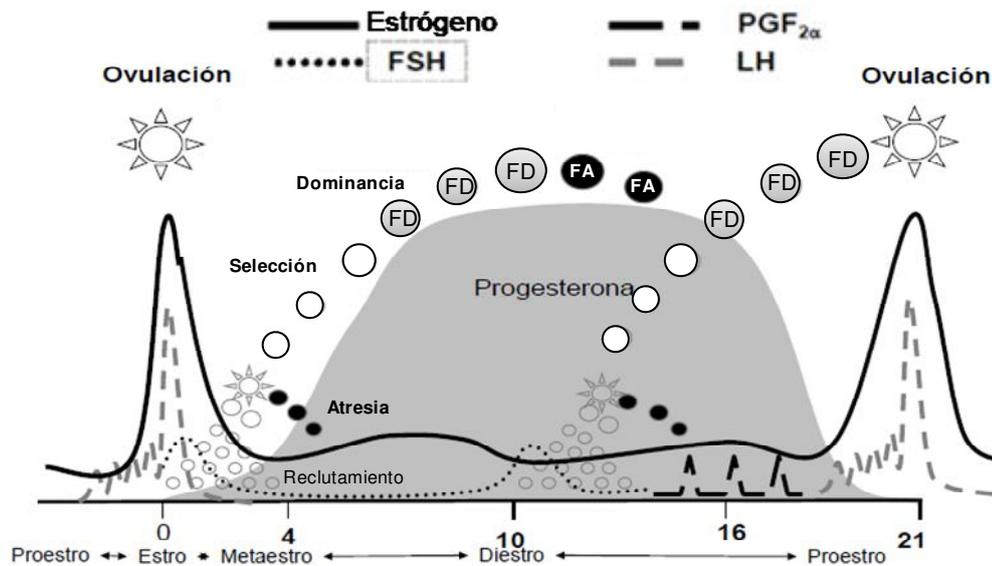


Figura 6: Esquema de las concentraciones hormonales y la dinámica de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. FSH: hormona foliculoestimulante. LH: hormona luteinizante. PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}. FD: folículo dominante. FA: folículo atrésico. (Adaptado de Rippe, 2009).

Cada uno de estos estadios envuelve una comunicación paracrina entre el ovocito y las capas de las células de la granulosa y de la teca, mediada principalmente por una gran cantidad de hormonas y citoquinas (Eppig, 1985, 2001; Richards y Hedin, 1988; Buccione y col., 1990; Oktay y col., 2000; Skinner, 2005; Su y col., 2008; Wigglesworth y col., 2013). En este sentido, una numerosa cantidad de factores intraováricos actúan de manera autocrina y paracrina comunicando bidireccionalmente, las células de la teca interna, las células de la granulosa y el ovocito, contribuyendo a coordinar la proliferación y diferenciación celular dentro del folículo (Otsuka, 2010) (figura 7).

Las citoquinas son proteínas de señal solubles mejor conocidas por sus propiedades como inmunoreguladores, pero en la actualidad se las reconoce como factores de crecimiento que regulan la proliferación, diferenciación, función y destino de las células (Orsi, 2008; Orsi y Tribe, 2008). Ellos incluyen a las interleuquinas (ILs), factor estimulante de colonias (CSFs, del inglés: *colony stimulating factors*), factor de necrosis tumoral (TNFs, del inglés: *tumour necrosis factors*), TGFs y varias hormonas peptídicas tales como la prolactina. Las citoquinas son las llaves para el éxito reproductivo, creando un ambiente embriotrófico con

una regulación inmune que permite la gametogénesis, fertilización, desarrollo temprano del embrión, su implantación y el posterior crecimiento fetal (Field y col., 2014).

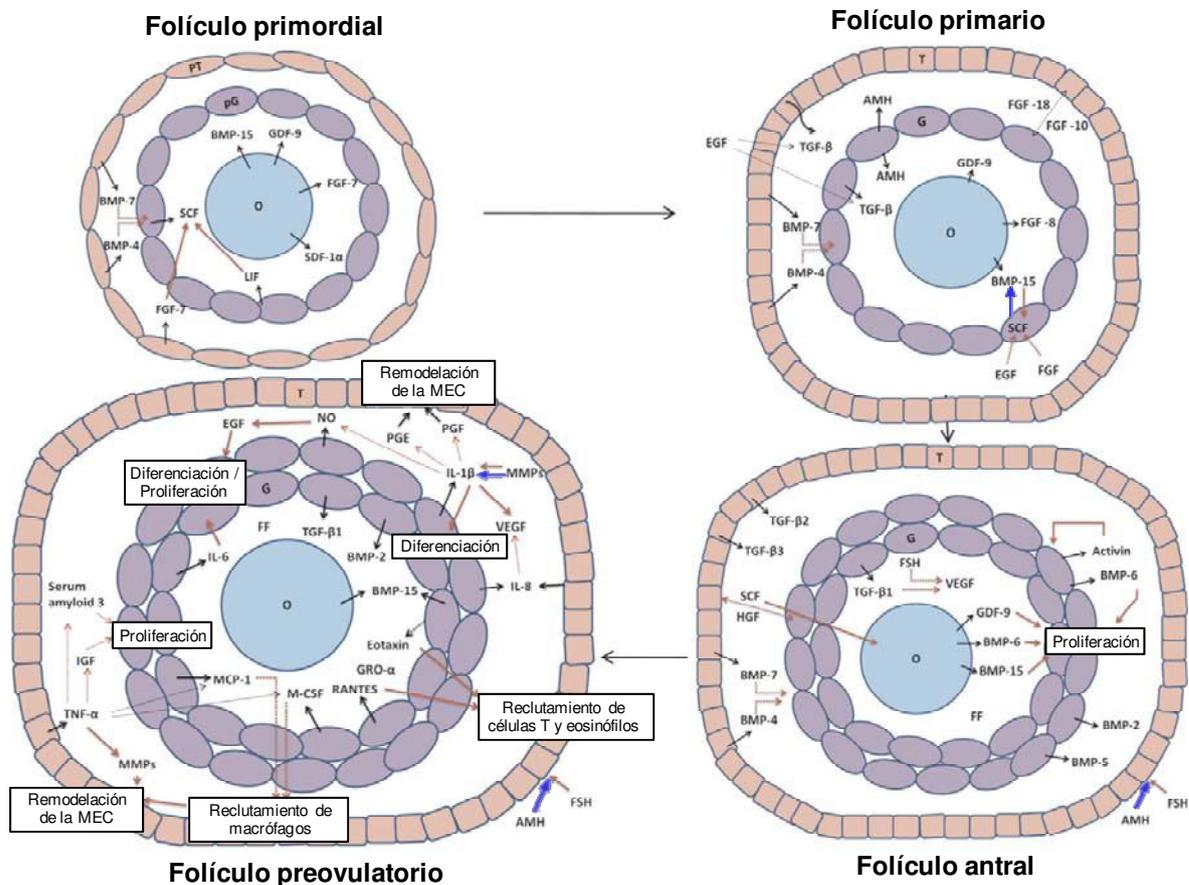


Figura 7: Representación esquemática de las citoquinas involucradas en la foliculogénesis. Interacciones y localizaciones basadas en un modelo humano con inferencias realizadas a partir de modelos animales. O: ovocito; PG: células pre-granulosa; G: células de la granulosa; PT: células pre-tecales; T: células de la teca. Las flechas negras indican producción de citoquinas; las flechas rojas sólidas indican interacciones positivas, mientras las flechas sólidas azules indican interacciones negativas. Las flechas punteadas indican posibles interacciones; las flechas alineadas indican un sinergismo potencial. (Adaptado de Field y col., 2014).

El crecimiento del ovocito dentro de los folículos preantrales y la maduración dentro de los folículos antrales, son procesos dependientes de factores intraováricos, los cuales están presentes en el líquido folicular (Hsieh y col., 2009; Padhy y col., 2009). La concentración de estos factores dentro del líquido folicular está relacionada positivamente con sus niveles sanguíneos (Qiao y Feng, 2011). Cualquier desbalance o disfunción en estos factores junto con la alteración del microambiente del líquido folicular puede resultar en una foliculogénesis anormal y en desordenes en el crecimiento y maduración ovocitario (Artini y col., 2007; Frank y col., 2008; Padhy y col., 2009).

Numerosos estudios realizados en diversas especies han demostrado la expresión de los diferentes miembros de la superfamilia de TGF- β en los componentes del folículo ovárico,

tanto en el ovocito como en las células somáticas que lo acompañan, en función al estadio de desarrollo folicular. Existen evidencias experimentales que indican que dichas proteínas cumplen funciones en múltiples aspectos del desarrollo folicular incluyendo el reclutamiento de los folículos primordiales, la proliferación y apoptosis de las células de la granulosa, esteroidogénesis, expresión de receptores para gonadotrofinas, maduración del ovocito, ovulación, luteinización y formación del cuerpo lúteo (Nilsson y col., 2003; Kumanov y col., 2005; Knight y Glister, 2006; Sisco y Pfeffer, 2007).

1.2.2. Ligandos

La superfamilia del TGF- β es un grupo de proteínas estructuralmente conservadas aunque funcionalmente diversas compuesta por al menos 35 miembros en los vertebrados. Estas proteínas están ampliamente distribuidas a través del cuerpo y funcionan como ligandos extracelulares relacionados con numerosos procesos fisiológicos tanto en la vida pre como posnatal (Massague y Wotton, 2000). Los miembros de la superfamilia del TGF- β son sintetizados como largas proteínas precursoras que están compuestas por un dominio amino-terminal de secuencia señal y un dominio pro-maduro (dominio carboxi-terminal). El dominio amino-terminal dirige el precursor a una vía de señalización, mientras el pro-dominio variable puede facilitar la dimerización. Una característica común compartida por los miembros de esta familia es que las formas bioactivas maduras son homo o heterodímeros que corresponden a la región carboxi-terminal clivada de dichas largas pre-proteínas. En la mayoría de los casos estos dímeros están unidos covalentemente mediante puentes disulfuro entre los residuos de cisteína conservados (Rossi y col., 2015).

Sobre la base de otras características estructurales, los miembros de esta superfamilia han sido clasificados a su vez en otras subfamilias a saber: subfamilia del TGF- β : comprende TGF- β 1, TGF- β 2, y TGF- β 3, subfamilia de BMP (del inglés: *Bone Morphogenetic Protein*: proteína morfogénica del hueso) con más de 20 miembros, subfamilia del GDF (del inglés: *Growth and Differentiation Factor*: Factor de crecimiento y diferenciación) con al menos 9 miembros, subfamilia de activina/inhibina que incluyen activinas A, AB, B e inhibinas A y B, subfamilia del GDNF (del inglés: *Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor*: factor neurotrófico derivado de las células gliales, incluye al GDNF, artemisa y neurturina; así como miembros adicionales como por ejemplo la AMH (del inglés: *anti-Mullerian Hormone*: hormona antimulleriana).

1.2.3. Receptores

La mayoría de los miembros de la superfamilia del TGF- β , con la excepción de la subfamilia del GDNF e inhibina, realizan sus acciones a través de la unión y formación de complejos hétero-tetraméricos con dos tipos de receptores de membrana designados como tipo I y tipo II. En los mamíferos existen al menos 7 receptores tipo I, y 5 receptores de tipo II asociados con la traducción de la señal de los ligandos de la superfamilia del TGF- β . Estos receptores son glicoproteínas de aproximadamente 55 kDa (tipo I) y 70 kDa (tipo II). Las regiones extracelulares de estos receptores contienen alrededor de 150 aminoácidos con 10 o más cisteínas que determinan el área de plegado. Los receptores tipo I tienen como característica especial una región intracelular de 30 aminoácidos inmediatamente anterior al dominio quinasa, esta región recibe el nombre de “GS”, por ser una secuencia rica en glicina y serina. Estos receptores son estructuralmente similares y poseen dominios de serina/treonina quinasa en su dominio intracelular (Otsuka, 2010). Diferentes ligandos pueden formar complejos de señal activos mediante la unión al dominio extracelular de uno o más tipos de receptores o combinaciones de ellos. La activación del receptor a través de la fosforilación a partir del dominio quinasa intracelular lleva a la fosforilación de moléculas de señal corriente abajo denominadas SMADs reguladas por receptor (R-SMADs). Estas proteínas co-receptoras son componentes intracelulares de la vía de señalización corriente abajo de la superfamilia del TGF- β . El primer miembro de esta familia es la proteína llamada *Mothers Against Decapentaplegic* (MAD) que fue descubierta en *Drosophila melanogaster*. Sumado a ésta se descubrieron en *Caenorhabditis elegans* tres proteínas homólogas denominadas SMA. En vertebrados existen proteínas homólogas a SMA y MAD y son llamadas SMADs por combinación de SMA y MAD (Derynck y col., 1996). Al menos 10 SMADs de vertebrados han sido identificadas hasta ahora (Rossi y col., 2015). Estas proteínas se asocian con otras SMADs y se trasladan al núcleo para modular la expresión génica a través de interacciones con varios factores de transcripción, coactivadores y correpresores.

1.2.4. Proteínas de unión (BP, del inglés: *binding proteins*) y co-receptores

Aunque los receptores tipo I y II son capaces de realizar la transducción de la señal intracelular para las BMPs, la unión a estos receptores y la actividad de ciertos ligandos es regulada por co-receptores (Miyazono y col., 2010). Algunos miembros de la familia de

moléculas guía repulsivas (RGM, del inglés: *repulsive guidance molecule*) como RGMa, b y c, son co-receptores para BMP-1 y BMP-4 y actúan mejorando su señal. RGMb y c son también conocidas como DRAGON y hemojuvelina, respectivamente. Éstas interactúan con los receptores tipo I y/o tipo II y se unen a BMP-2 y BMP-4 facilitando la unión ligando/receptor. Otro co-receptor reconocido es una proteína transmembranosa llamada endogelina que puede unirse a BMP-2 y BMP-7, mejorando sus niveles de respuesta (Miyazono y col., 2010). En relación a las BPs, ha sido demostrado que foliculostatina se une directamente a numerosos miembros de la superfamilia del TGF- β , incluyendo a las BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 y BMP-15 (Otsuka y col., 2001; Amthor y col., 2002; Glister y col., 2004). Además, noggina, una glicoproteína homodimérica se asocia con alta afinidad a BMP-2 y BMP-4, pero con menor afinidad a las BMP-7 y BMP-6, esta unión impide la interacción del ligando con su receptor tipo I. Otra BP de la familia de las BMPs es una proteína secretada rica en cisteína llamada cordina, que también se une directamente a BMP-2, BMP-4 y BMP-7 e impide la interacción de estas proteínas con su receptor, sin embargo, la afinidad de cordina por BMP-4 es diez veces menor que noggina. También, gremlina, una proteína perteneciente a una subfamilia de antagonistas de BMPs que también posee un dominio rico en cisteína, puede unirse e inhibir a BMP-2 y BMP-4 (Glister y col., 2011). Interesantemente, la expresión de noggina y gremlina es estimulada por las mismas BMPs a las que inhiben, lo que indica la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa en este nivel (Kameda y col., 1999; Pereira y col., 2000). Glister y col. (2011) evaluaron en cultivos de células de la granulosa y de la teca bovinas el comportamiento de las BPs (cordina, gremlina, noggina y foliculostatina) asociadas a las BMPs. Así, vieron que los transcriptos como la expresión proteica de todas las BPs fueron más altos en células de la granulosa que en células de la teca. El tipo de células y la categoría folicular modifica la abundancia de ARNm para cordina, foliculostatina y noggina. Las BPs extracelulares provenientes en mayor medida de las células de la granulosa, contribuyen a la regulación intrafolicular de las vías de señalización de las BMPs. Sumado a la existencia de estos reguladores, existen otras proteínas de membrana (BAMBI, del inglés: *BMP and activin membrane-bound inhibitor*) que pueden modular el señalamiento por los miembros de la superfamilia del TGF- β . Mientras algunas de estas proteínas de unión son consideradas como trampas que disminuyen la disponibilidad del ligando impidiendo la interacción con sus receptores de señal, en algunas instancias (particularmente cuando la afinidad es más baja) ellas podrían contribuir en la presentación

del ligando mediante el mantenimiento de altas concentraciones del mismo en zonas cercanas a la superficie celular (Sugino y col., 1994; Knight y Glistler, 2006).

1.3. Sistema de las BMPs

Estudios funcionales han aportado evidencia clara sobre las acciones intraováricas de las BMPs y otros miembros de la superfamilia TGF- β . Así, se demostró que las BMPs pueden suprimir la producción de andrógenos en las células de la teca (Hillier y col., 1991; Dooley y col., 2000; Glistler y col., 2005), promover la proliferación de las células de la granulosa, aumentar la expresión del receptor de FSH y mejorar la producción de E2 mientras inhiben la de P4 (Hasegawa y col., 1988; Xiao y col., 1992; Findlay y Drummond 1999; Glistler y col., 2004; Juengel y col., 2006). En humanos hay una interrelación entre el sistema de BMPs y FSH. Las BMPs inicialmente inhiben la expresión del receptor de FSH, mientras la FSH estimula las señales endógenas del sistema BMP. Este balance es de importancia para el desarrollo y mantenimiento de células de la granulosa *in vitro* (Miyoshi y col., 2006). Se ha establecido que la FSH puede influir en el desarrollo de los folículos de los estadios preantrales tempranos o medios. Sin embargo, el desarrollo posterior a las fases preantral tardío/antral pequeño se transforma en dependiente de FSH de manera crítica.

1.3.1. Ligandos

Las BMPs fueron originalmente aisladas de tejido óseo como proteínas que inducen la formación de hueso, y de cartílago en sitios ectópicos, por fuera del esqueleto, *in vivo* (Urist, 1965; Wozney, 1988). Las BMPs se distinguen de otros miembros de la superfamilia del TGF- β por tener siete residuos conservados de cisteína en la región madura. Seis de estos residuos están unidos dentro de la subunidad para formar una estructura rígida tridimensional llamada “nudo o lazo de cisteína”. El residuo número siete es necesario para que se dé la dimerización a través de los puentes disulfuro (Otsuka, 2010). Eso resulta en la formación de un dímero de enlace covalente, el cual permite la actividad biológica de estas proteínas (Wang y col., 1990). Las BMPs pueden ser clasificadas dentro de varios subgrupos, a saber: el grupo de BMP-2 y -4, el grupo de BMP-5, -6, -7 y -8 y finalmente el de las BMP-9, -10 y -15 (Ducy y Karsenty, 2000). La familia de las BMPs comprende 18 miembros y como fueron descubiertas por diferentes grupos de investigación y en tiempos muy cercanos se les

atribuyeron diferentes nombres. En la tabla 2 se listan las BMPs de mayor relevancia y sus nombres alternativos.

Ha sido bien establecido que las BMPs son reguladores de múltiples procesos biológicos incluyendo la proliferación, apoptosis, diferenciación y morfogénesis entre otros. Shimasaki y col. (1999, 2004) demostraron que las BMPs ejercían acciones críticas a nivel de la foliculogénesis. Estudios *in vitro* han establecido que BMP-2, -4 y -8 controlan la formación de las células germinales primordiales (Dudley y col., 2010), mientras BMP-6, -7 y -15 regulan la activación de los folículos primordiales y su viabilidad (Araújo y col., 2010a; Celestino y col., 2011), median el crecimiento de los folículos preantrales (Frota y col., 2011; Passos y col., 2013) y la maduración de los folículos antrales (Shimasaki y col., 2004).

Tabla 2: Miembros de la familia de las BMPs con sus nombres alternativos (Adaptado Rossi y col., 2015)

Ligandos	Nombre alternativo	Referencia
BMP-1	mTLD	Martínez-Glez y col. (2012)
BMP-2	BMP-2A	Dathe y col. (2009)
BMP-3	Osteogenina	Hardy y Kramer (2000)
BMP-3B	GDF-10	Tandon y col. (2012)
BMP-4	BMP-2B	Nikaido y col. (1997)
BMP-5	-	Pierre y col. (2005)
BMP-6	Vgr-1	Gitelman y col. (1994)
BMP-7	OP-1	Macias y col. (1997)
BMP-8a	OP-2	Zhao and Hogan (1996)
BMP-8b	-	Cao <i>et al.</i> (2013)
BMP-11	GDF-11	Hannan <i>et al.</i> (2009)
BMP-12	GDF-7, CDMP-3	Yeh y Lee (2010)
BMP-13	GDF-6, CDMP-2	Williams y col. (2008)
BMP-14	GDF-5, CDMP-1	Chhabra y col. (2005)
BMP-15	GDF-9B	Bodin y col. (2007)
BMP-16	-	Luckenbach y col. (2011)

1.3.2. Receptores y proteínas de unión

Igual que otros miembros de la superfamilia del TGF- β , las BMPs forman complejos heteroméricos con receptores tipo I y tipo II (figura 8). Estos dos tipos de receptores tienen afinidad por las BMPs y logran complejos de unión de alta afinidad (Liu, 1995; Otsuka,

2010). Los ligandos de la familia de las BMPs se unen aleatoriamente a uno de cuatro diferentes receptores tipo I, ActR-1A (ALK-2), BMPR-1A (ALK-3), ActR-1B (ALK-4) y BMPR-1B (ALK-6). Antes de reclutar uno de los tres receptores tipo II (BMPR-2, ActR-2A y ActR-2B) para formar un complejo señal activo. Respecto a los receptores tipo I, se ha sugerido que BMP-2 y BMP-4 preferentemente se unen al BMPR-1A y/o BMPR-1B, mientras BMP-6 lo hacen al ActR-1A y/o BMPR-1B (ten Dijke y col., 1994; Ebisawa y col., 1999; Aoki y col., 2001). Respecto a los receptores tipo II, BMP-6 preferentemente se une a los receptores ActR-2A, mientras BMP-2, BMP-4 y BMP-6 lo hacen al BMPR-2 (Liu y col., 1995; Nohno y col., 1995; Yamashita y col., 1995; Ebisawa y col., 1999; Moore y col., 2003) (tabla 3).

Tabla 3: Relación entre ligandos, receptores y SMADs dentro de la familia de las BMPs.

Ligandos	Receptor tipo II	Receptor tipo I	SMADs
BMP-2 BMP-4	BMPR-II	ALK-3 (BMPR-IA) ALK-6 (BMPR-IB)	SMAD 1/5/8
BMP-6 BMP-7	BMPR-II ActR-II ActR-IIB	ALK-2 (ActR-IA) ALK-6 (BMPR-IB)	SMAD 1/5/8
BMP-15	BMPR-II	ALK-6 (BMPR-IB)	SMAD 1/5/8

(Adaptado de Shimasaki y col., 2004 y Rossi y col., 2015).

El complejo formado con el receptor tipo II permite transfosforilar (activar) el dominio kinasa “GS” intracelular del receptor tipo I que fosforila a las llamadas proteínas SMADs-1/5/8, que son factores de transcripción intracelulares para las BMPs. Éstas se unen a una proteína asociada, SMAD-4, y así forman un complejo hetero-oligomérico con SMADs-1/5/8, este complejo luego es traslocado al interior del núcleo celular para unirse específicamente a zonas de ADN diana e inducir así la transcripción de genes específicos (Miyazono y col., 2005, 2010, Glister y col., 2010).

Como fue descrito anteriormente (apartado 1.2.4), a nivel extracelular, existen antagonistas de las BMPs (ejemplo noggina) que se unen al receptor específico, bloqueándolo. La expresión de noggina está potencialmente inducida por la actividad de las BMPs y así puede controlar las acciones de las BMPs a través de mecanismos de retroalimentación negativa (Song y col., 2010).

La inhibina, un componente de la superfamilia del TGF- β y antagonista de la activina, puede funcionar también como un antagonista competitivo de las BMPs a través de un

mecanismo dependiente de la co-expresión de una molécula de superficie llamada betaglicano, también conocido como TGFBR-3. De esta manera se establece una competencia por el receptor(es) tipo II utilizado por las BMPs para ejercer su efecto. Así, tanto inhibina como el betaglicano pueden jugar un rol importante en la regulación de la actividad de las BMPs (Wiater y Vale, 2003; Farnworth y col., 2006; Glister y col., 2010).

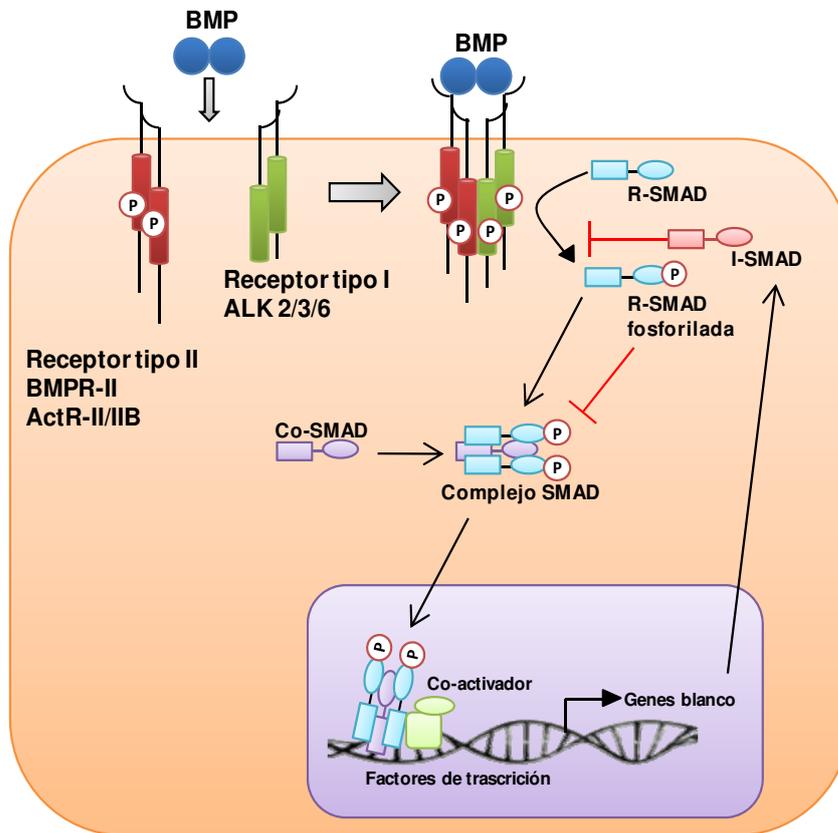


Figura 8: Mecanismo de señalización de BMPs a través de proteínas SMADs. Las BMPs se unen a dos tipos de receptores, induciendo fosforilación de los R-SMADs, los que forman complejos con las Co-SMADs, que viajan al núcleo, donde regulan la transcripción de genes blanco. Uno de éstos es el gen I-SMAD, el cual suprime la señalización interactuando con el receptor tipo I inhibiendo la formación del complejo R-SMAD-Co-SMAD. (Adaptado de Miyazono y col., 2005).

1.3.3. Expresión de BMPs y su rol en la foliculogénesis

En la tabla 4 se resumen algunos de los efectos de las BMPs en la ovocitogénesis y foliculogénesis en rumiantes. En la figura 9 se observa un esquema de la expresión de las BMPs en diferentes estadios del desarrollo folicular en mamíferos.

1.3.3.1. BMP-1

A través de técnicas de inmunohistoquímica sobre cortes de ovarios ovinos, ha sido demostrado que BMP-1 está presente en las células de la granulosa de todos los estadios de desarrollo folicular. Además, se ha estudiado que BMP-1 puede regular la formación de

matriz extracelular (MEC) durante la foliculogénesis (Canty-Laird y col., 2010), siendo esto de importancia porque durante el crecimiento o atresia de los folículos en ovinos, la MEC sufre cambios dramáticos en la composición del colágeno, componente fundamental del tejido conectivo que forma parte de la teca y estroma ováricos (Huet y col., 1997, 1998; Berkholtz y col., 2006).

1.3.3.2. BMP-2

La expresión de ARNm para BMP-2 fue reportada en células de la granulosa de folículos primarios, preantrales y antrales en ratón (Erickson y Shimasaki, 2003), y en folículos antrales de ovino (Juengel y col., 2006), así como también en células de la teca de folículos antrales bovinos (Fatehi y col., 2005). Estudios en esta misma especie sugieren que BMP-2 es la BMP más abundante en las células de la granulosa de folículos bovinos (Glistter y col., 2010) y la expresión relativa de ARNm para BMP-2 y sus receptores BMPR-1A y BMPR-II fue más elevada en FDs en estadios preovulatorios, que en aquellos en estadios menos avanzados de desarrollo (Salvaraju y col., 2013). Además, el tratamiento *in vitro* de células de la granulosa con BMP-2 incrementó las concentraciones de E2 pero redujo las de P4. Estos resultados sugieren que BMP-2 podría tener un rol importante en el desarrollo del FD en bovinos (Salvaraju y col., 2013). También, se describió que la interacción entre BMP-2 y BMP-4 tiene un efecto aditivo estimulando la generación de células germinales primordiales en ratón (Ying y Zhao, 2001). Sumado a esto, otros estudios *in vitro* en células de la granulosa de folículos antrales ovinos mostraron que la BMP-2 incrementaba la producción de E2 e inhibina después de una estimulación con FSH, promoviendo así la diferenciación de las células de la granulosa (Souza y col., 2002). Sin embargo, en células de la teca interna porcinas *in vitro*, la BMP-2 suprime la síntesis de P4, androstenediona (A4) y E2, mientras que en la granulosa produce una estimulación de la proliferación celular (Brankin y col., 2005).

1.3.3.3. BMP-4

Tanto el ARNm como la proteína de BMP-4 son expresadas en células de la teca en ovario de ratón (Erickson y Shimasaki, 2003). Muchos estudios han demostrado que la BMP-4 es el mayor regulador en la formación de células germinales primordiales en mamíferos

(Saitou y Yamaji, 2010). Asimismo, BMP-4 causa un aumento significativo en la expresión de genes en estas células y aparece como un requerimiento fundamental para la diferenciación de células pluripotenciales embrionarias humanas en células germinales primordiales (West y col, 2010). Ding y col. (2013) demostraron que BMP-4 inicia el crecimiento de folículos primordiales y previene la apoptosis del ovocito. Dentro de las BMPs derivadas de las células de la teca/estroma, se ha demostrado en roedores que las BMP-4 y BMP-7 regulan a las células tecales/intersticiales promoviendo la transición de los folículos primordiales a primarios y la supervivencia folicular (Nilsson y Skinner, 2003).

En bovinos el ARNm de la BMP-4 fue hallado en todos los compartimentos foliculares (granulosa, teca, ovocito, *cumulus oophorus*) y, a través de la técnica de inmunohistoquímica, Fatehi y col. (2005) demostraron que la expresión de BMP-4 estaba limitada a las células de la teca interna y el 25% de los ovocitos presentes en folículos antrales. Glister y col., (2010) y Kayani y col., (2009) encontraron expresión de esta BMP tanto en células de la granulosa como de la teca en folículos bovinos, manteniéndose niveles de mayor expresión en las células de la teca.

1.3.3.4. BMP-5

La BMP-5 ha sido encontrada en ovarios porcinos y de ratas (Shimizu y col., 2004; Pierre y col., 2005). Estudios por hibridación *in situ* demostraron que la expresión de ARNm de BMP-5 fue mayor en células de la granulosa y del cumulus de folículos antrales pequeños a grandes y en folículos atrésicos (Pierre y col., 2005). Se asume que la BMP-5 está involucrada en el desarrollo de los folículos secundarios pero no de los primarios (Shimizu y col., 2004). En ratón, esta BMP mejora la proliferación de las células de la granulosa de los folículos antrales (Pierre y col., 2005). Además, esta BMP causa una inhibición marcada, dosis dependiente, de la P4 inducida por FSH.

1.3.3.5. BMP-6

Esta BMP está presente en el ovocito de todas las categorías foliculares en diferentes especies (murina: Erickson y Shimasaki, 2003; bovina: Glister y col., 2004; ovina: Juengel y col., 2006; caprina: Frota y col., 2013), así como también en las células de la granulosa y de la teca de varias especies (murina: Erickson y Shimasaki, 2003; bovina: Glister y col., 2004;

ovina: Juengel y col., 2006). En estudios *ex vivo* en bovinos, la abundancia relativa de ARNm de BMP-6 no mostró variaciones a través de los distintos estadios de desarrollo folicular, expresando marcación positiva en ambas poblaciones foliculares mediante la técnica de inmunohistoquímica (Glistler y col., 2010). En caprinos, su nivel de expresión es mayor en folículos primarios y preantrales (Frota y col., 2013).

Este factor de crecimiento decrece drásticamente durante la selección del FD, y esta reducción puede estar relacionada con el mecanismo por el cual se lleva a cabo el proceso de selección de dicho folículo (Shimasaki y col., 2004). En ratones se evidenció un aumento en la expresión del ARNm y de la proteína de VEGF (del inglés: *vascular endothelial growth factor*. factor de crecimiento endotelial vascular) (Park y col., 2012). Por otra parte, BMP-6 podría tener un rol en el proceso de ovulación en humanos, al incrementar la acumulación de neutrófilos y suprimir los efectos de los inhibidores de las proteasas en el folículo preovulatorio (Akiyama y col., 2014).

Las activinas y la BMP-6 derivadas de las células de la granulosa cumplen un rol autocrino/paracrino mientras que los factores GDF-9, BMP-15 y BMP-6 derivados del ovocito poseen un rol paracrino en la promoción de la proliferación de las células de la granulosa y en la modulación de la función folicular dependiente de FSH (McNatty y col., 2005; Shimizu y col., 2004; Otsuka, 2010). La exposición diferencial a dichos factores podría ser uno de los motivos por los cuales ciertos folículos son sensibles a la FSH, convirtiéndose luego en FDs, permitiéndole esto continuar su desarrollo a folículo preovulatorio.

1.3.3.6. BMP-7

La BMP-7 es producida por las células de la teca de folículos preantrales y antrales (Shimasaki y col., 2004). En folículos de especies murinas la expresión de ARNm fue restringida sólo a la granulosa (Lee y col., 2004), sin embargo en folículos ovinos fue detectada en todas las células foliculares (Juengel y col., 2006). En folículos antrales de cabra, los niveles de ARNm de esta BMP son significativamente más altos en las células de la granulosa y de la teca interna de folículos antrales grandes (>3mm) que aquellos observados en folículos antrales pequeños (<3mm) (Frota y col., 2013). Además, estudios *in vitro* demostraron que la BMP-7 promueve el crecimiento y la activación de folículos primordiales, y estimula la expresión de FSHR en ovarios en modelos murinos (Lee y col., 2004). En este

sentido, Shi y col. (2010) reportaron que la BMP-7 induce una reducción en la expresión del gen del LHR.

BMP-7 también contribuye a mantener la ultraestructura y supervivencia de los folículos primordiales en cultivos de folículos caprinos (Araújo y col., 2010b). La aplicación de BMP-7 en la bolsa ovárica de ratas incrementa el número de folículos primarios, preantrales y antrales, fortaleciendo la idea de que este factor actúa como un promotor del crecimiento y activación de folículos primordiales (Lee y col., 2001). Adicionalmente, BMP-7 sola o con FSH incrementa significativamente el crecimiento y la formación del antro de folículos caprinos en cultivo (Frota y col., 2011). Además, ha sido reportado que produce un aumento en la expresión de la CYP19A1 favoreciendo la producción de E2 *in vivo* e *in vitro* e inhibe la producción de P4 (Lee y col., 2001; Miyoshi y col., 2007).

La BMP-7 incrementa significativamente la expresión de ARNm de genes inhibidores de apoptosis como IAP-3 y deprime la expresión de genes pro-apoptóticos como caspasa-3 y -9 (Kayamori y col., 2009).

1.3.3.7. BMP-8

Su expresión en el ovario no fue aún demostrada. Sin embargo, Ying y col. (2000) describieron que este factor tiene un rol de importancia en la formación de las células germinales primordiales. Ha sido demostrado en ratones con una mutación en el gen que codifica para esta proteína, una disminución de las células germinales primordiales (Ying y col., 2000).

1.3.3.8. BMP-9

Esta proteína, también llamada GDF-2, está mayormente expresada en el hígado y muestra actividad de tipo hematopoyética, hepatogénica y osteo-condrogénica. Actúa además como un regulador metabólico de la glucosa, los lípidos y el hierro, así como un factor de diferenciación neuronal (Lamplot y col., 2013; Herrera y col., 2014). BMP-9 en comparación con otros miembros de la familia de las BMPs presenta altas concentraciones (en el orden de los ng/ml) a nivel de suero y plasma humanos (Herrera y col., 2014). Está asociada a la proliferación, apoptosis y diferenciación de células cancerígenas en el ovario, mama y tejido tiroideo. (Herrera y col., 2009; Na y col., 2013). Hosoya y col. (2015) evidenciaron que esta

BMP-9 actúa como un inhibidor del proceso de luteinización durante la foliculogénesis, al actuar sobre células de la granulosa de ratas suprimiendo la producción de P4 inducida por FSH (no la de E2), con una disminución en el contenido de AMPc y una caída en los niveles de ARNm de las proteínas reguladoras de la esteroidogénesis aguda (StAR), de la enzima de clivaje de la cadena lateral del colesterol (citocromo P450_{scc} o CYP11A1), 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD3 β) y FSHR.

1.3.3.9. BMP-15

Muchos estudios han demostrado que BMP-15 está implicada en el proceso normal de fertilización en los mamíferos, jugando un papel de importancia en la regulación de las funciones de las células foliculares (Kedem y col., 2011; Passos y col., 2013) y del cumulus (Erickson y Shimasaki, 2001; Teixeira Filho y col., 2002; Gilchrist y col., 2008; Chen y col., 2009). Este factor es expresado en ovocitos de folículos primarios de roedores, ovinos, bovinos y humanos (Juengel y McNatty, 2005; Hosoe y col., 2011) y también en líquido folicular en humanos (Wu y col., 2007). Numerosos estudios llevados a cabo en diferentes especies han demostrado que la expresión de BMP-15 y GDF-9 está estrechamente corregulada (Crawford y McNatty, 2012). McIntosh y col. (2012) han demostrado que ambos factores tienen roles fisiológicos importantes en la regulación de la ovulación y el tamaño de la camada en ratones. Estos dos factores juegan roles cruciales en el desarrollo folicular, la ovulación, maduración ovocitaria y desarrollo embrionario (Juengel y McNatty, 2005; Knight y Glister, 2006; Hutt y Albertini, 2007; Gilchrist y col., 2008). Ovejas homocigotas que tienen mutaciones inactivantes en los genes para BMP-15 o GDF-9 son infértiles por una falla ovárica primaria. Sin embargo, los individuos heterocigotas para mutaciones inactivantes en BMP-15 o GDF-9, son fértiles y muestran un incremento en las tasas de ovulación. Este fenotipo particular se relaciona con las funciones cooperativas de estos dos factores a nivel de la regulación de la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa (Juengel y col., 2009).

En bovinos, Hosoe y col. (2011) observaron que a nivel de folículos antrales los transcritos de BMP-15 y GDF-9 son expresados por los ovocitos y células del cumulus de animales adultos y sólo en ovocitos de animales jóvenes. Sin embargo, fue demostrada la expresión proteica en ambos grupos etarios, tanto a nivel del ovocito como de las células del cumulus. Asimismo, Caixeta y col. (2013) mostraron la capacidad de BMP-15 para favorecer

la expansión de los complejos cumulus ovocito (COCs) bovinos madurados *in vitro* por un mecanismo que direcciona la glucosa hacia la producción de ácido hialurónico (componente más importante de la MEC del cumulus).

En cabras, la proteína fue detectada en los ovocitos de todos los tipos de folículos y en células de la granulosa de folículos primarios en adelante (Silva y col., 2006). En esta misma especie se halló que la expresión de ARNm para BMP-15 fue detectada en folículos primordiales, primarios y preantrales, así como también ovocitos y células de la granulosa de folículos antrales (Silva y col., 2005). Los ovocitos que están recubiertos con líquido folicular con altos niveles de BMP-15 tuvieron un porcentaje más alto de fertilización, división y mejor calidad en embriones en desarrollo (Rossi y col., 2015). Lima y col. (2012) observaron que BMP-15 es efectiva en promover la formación del antro y mantener el crecimiento folicular durante el cultivo de folículos preantrales de cabra.

Estudios realizados en células de la granulosa de ratas demostraron que la BMP-15 recombinante estimula la proliferación de estas células independientemente de FSH, pero deprime el efecto de FSH sobre la producción de P4, sin afectar la de producción de E2 (Otsuka y col., 2000).

En bovinos la inmunización de vaquillonas con péptidos de BMP-15 altera la tasa de ovulación, produciendo de una manera paradójica, tanto falla como aumento de la misma. Además, la inmunización disminuyó la cantidad de folículos antrales visibles en la superficie del ovario, reduciendo su número y diámetro (Juengel y col., 2009). BMP-15 sola o junto a FSH promueve el incremento del volumen (BMP-15 o FSH) y formación de antro (BMP-15 más FSH) de los folículos preantrales bovinos cultivados *in vitro*. A pesar de esto, tras 12 días de en cultivo suplementados con BMP-15 y FSH, los folículos tuvieron cambios ultraestructurales y un aumento en el grado de atresia (Passos y col., 2013). Mutaciones en BMP-15 están relacionadas con la ocurrencia de enfermedades asociadas con el síndrome de ovario poliquístico (PCOS, del inglés: *polycystic ovary syndrome*) e insuficiencia ovárica prematura (Takebayashi y col., 2000). Tanto la BMP-15 como el GDF-9 están involucrados en la foliculogénesis en humanos y su expresión anormal podría estar relacionada a infertilidad (Gilchrist y col., 2008).

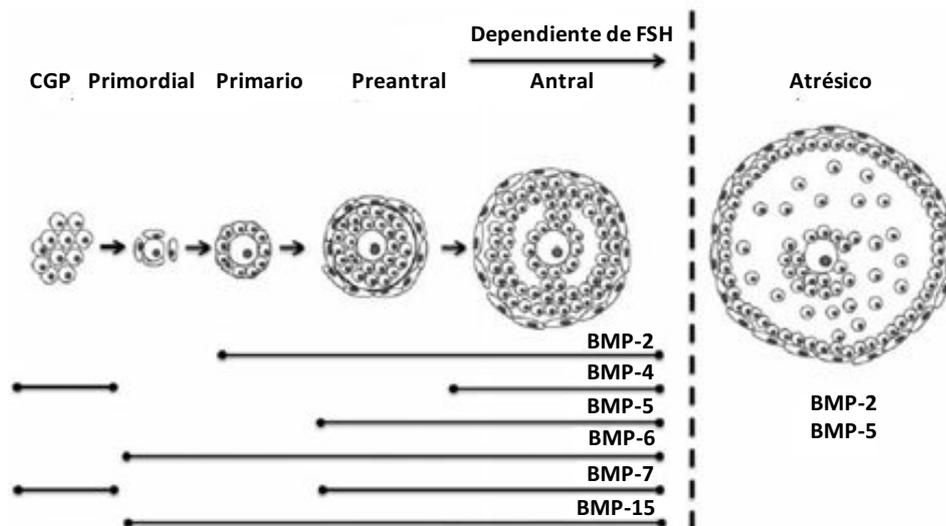


Figura 9: Expresión de las BMPs en diferentes estadios del desarrollo folicular en mamíferos. El sistema de BMPs actúa promoviendo el desarrollo folicular y el crecimiento celular, regulando las funciones de los distintos componentes de los folículos ováricos. CGP: células germinales primordiales. (Adaptado de Rossi y col., 2015).

1.4. Hormona Anti-Mülleriana (AMH)

1.4.1. Conceptos generales, ligandos y receptores.

La AMH, también llamada sustancia inhibidora Mülleriana (MIS), es una glicoproteína homodimérica con puentes disulfuros de 140 kDa en bovinos, perteneciente a la superfamilia del TGF- β . Es secretada por las células de la granulosa de folículos sanos en crecimiento (La Marca y Volpe, 2006) y es muy conocida por causar la regresión de los conductos de Müller en el feto macho. En humanos el gen que codifica para la AMH posee 275 pb y está dividido en 5 exones. La porción 3' del quinto exón codifica para la parte bioactiva de esta molécula y es extremadamente rica en guanina-citosina. Además, este es el único dominio que posee homología con los otros miembros de la superfamilia del TGF- β (Josso y col., 2001). AMH al igual que otros miembros de la superfamilia TGF- β se une a receptores tipo I y II, específicamente al receptor AMH tipo II que tiene la capacidad de interactuar con dos tipos de receptores tipo I, el ALK-5 y el BMPR-IB. Luego de la unión con el receptor BMPR-IB, éste fosforila a proteínas SMAD-1, la cual interacciona formando un complejo con SMAD-4 que continúan la vía de señalización corriente abajo. La expresión de AMH puede estar regulada por la actividad concomitante de la familia de las BMPs, en este sentido BMP-6 demostró aumentar la expresión de AMH en cultivos de células de la granulosa y de la teca interna humanas (Shi y col., 2009). *In vivo*, la administración de FSH

inhibe la expresión de AMH en las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales pequeños (Baarends y col., 1995).

Tabla 4: Efectos de las BMPs en la ovocitogénesis y foliculogénesis en rumiantes.

Proteína	Especie	Estructura	Función
BMP 1	Ovino	CT	Regula la formación de matriz extracelular durante la foliculogénesis
BMP 2	Ovino	CG	Incrementa la producción de estrógenos e inhibina-A promoviendo la diferenciación .
BMP 4	Bovino	CG	Reduce los niveles de apoptosis, estimula la expresión de ARNm de survivina, mejora la producción de estradiol, inhibina y folistatina A, inhibe la producción de P4.
	Ovino	CG	Incrementa la producción de estradiol e inhibe la síntesis de P4, baja la expresión de AMPc, StAR y P450scc.
BMP 6	Bovino	CG	Proliferación, viabilidad y producción de inhibina-A, activina-A y foliculostatina.
	Bovino	CG	Reduce la secreción de P4 inducida por forskolina y la de activina-A, CYP11A1, incrementando la expresión basal de CYP17A1.
		CT	Promueve la luteinización.
	Caprino	Fol primordiales	Afecta negativamente la supervivencia y ultraestructura
		Fol preantrales	Incrementa el diámetro folicular y la formación del antro
BMP 7	Caprino	Fol primordiales	Mejora la supervivencia y el crecimiento. Promueve la activación.
		Fol preantrales	Incrementa el crecimiento y la formación del antro
	Bovino	CG	Reduce las proteínas CAD, la expresión de caspasa-3 y -9, estimula la expresión de ARNm de survivina y XIAP.
BMP 15	Ovino	CG	Proliferación
	Bovino	Fol preantrales	Crecimiento <i>In vitro</i>
	Caprino	Fol primordiales	Activación <i>In vitro</i>
		Fol preantrales	Crecimiento <i>in vitro</i>

CYP17A1: Enzima citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa. (Adaptado de Rossi y col., 2015)

1.4.2. Expresión durante la foliculogénesis.

La AMH es secretada por las células de la granulosa de folículos sanos en crecimiento (La Marca y Volpe, 2006). Esta hormona inhibe el crecimiento dependiente de FSH de folículos preantrales grandes en ratones (Durlinger y col., 2001) ejerciendo un rol negativo sobre el desarrollo de los folículos preantrales (Knight y Glister, 2006). La AMH reduce la respuesta a FSH de los folículos antrales pequeños y preantrales y de este modo, ejerce un rol negativo en el reclutamiento cíclico de los folículos y en el proceso de selección del FD (Durlinger y col., 2002a,b; Visser y Themmen, 2005; Knight y Glister, 2006; Otsuka, 2010). Por otra parte, la AMH actúa negativamente sobre la iniciación del desarrollo folicular. Se expresa en células de la granulosa de los folículos primarios y en estadios antrales tempranos, sin detectarse en los folículos primordiales. En base a dichas evidencias, se infiere la existencia de una retroalimentación negativa sobre los folículos primordiales ejercida por la secreción de AMH en folículos de estadios tempranos del desarrollo (Knight y Glister, 2006; Glister y col., 2006) (figura 10). Si bien la fertilidad en ratones *knockout* para AMH se mantiene, muchos folículos primordiales dejan el pool de reserva y los ovarios agotan sus reservas foliculares a muy temprana edad comparándolos con los ratones *wild-type* (Durlinger y col., 1999). Estos hallazgos sugirieron que la AMH cumple un rol importante inhibiendo la activación a nivel de los folículos primordiales de reserva.

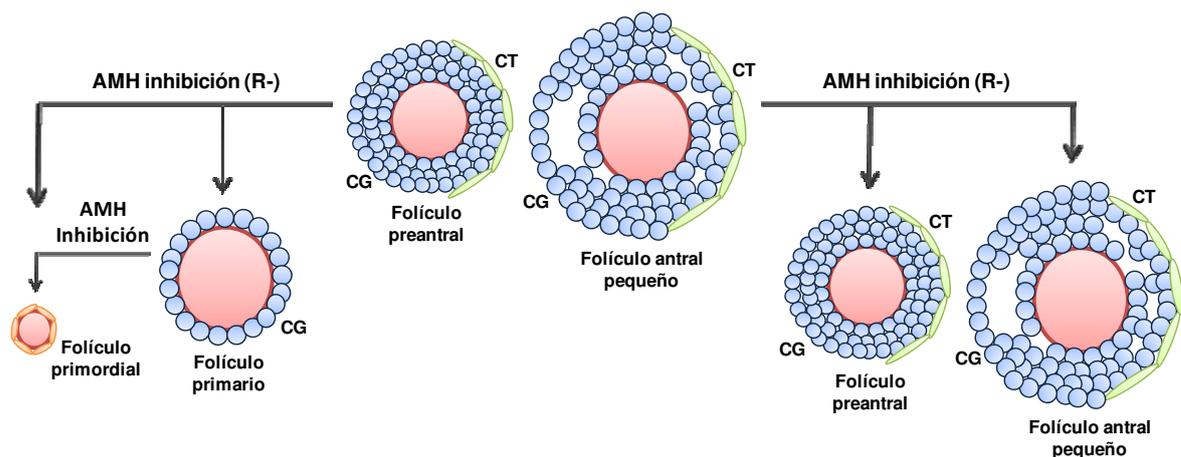


Figura 10: Esquema del efecto inhibitorio de AMH sobre las distintas poblaciones foliculares. Nótese el efecto de R- (retroalimentación negativa) sobre el crecimiento de folículos primarios, preantrales y antrales pequeños, participando de esta manera en la selección del FD, y sobre la población de folículos primordiales, impidiendo que éstos dejen el pool de reserva ovárico evitando su temprano agotamiento. CG: células de la granulosa. CT: células de la teca.

Fortune y col. (2011) sugieren que en bovinos, la AMH producida por folículos preantrales y antrales, inhibe la activación y enlentece el crecimiento de los folículos primarios. La secreción de AMH en la vaca es alta en células de la granulosa de folículos preantrales y antrales pequeños y decrece en las fases finales de crecimiento folicular y en los folículos atrésicos (Rico y col., 2009). Bajas concentraciones de AMH han sido encontradas en líquido folicular de folículos antrales y preovulatorios (Bezard y col., 1987, Rico y col., 2009). Sumado a esto, existen efectos recíprocos inversos entre AMH y E2, y se ha demostrado que la AMH inhibe la expresión *in vitro* de CYP19A1 y LHR en células de la granulosa de ratas y porcinos estimuladas con FSH (di Clemente y col., 1994), e inversamente los E2 puede inhibir la expresión de AMH en el ovario de rata (Baarends y col., 1995). En la figura 11 se esquematiza un modelo de regulación de la producción de AMH en la vaca.

1.4.3. AMH, recuento de folículos antrales y productividad.

La expresión del gen de AMH está restringida a las células de la granulosa de folículos en crecimiento (Vigier y col., 1984; Takahashi y col., 1986; Monniaux y col., 2008), y este patrón de expresión característico, la convierte en un marcador endócrino que permite conocer el tamaño del pool de folículos en crecimiento. En la vaca, la AMH es un marcador seguro de la población de folículos antrales pequeños dependientes de FSH (Rico y col., 2009).

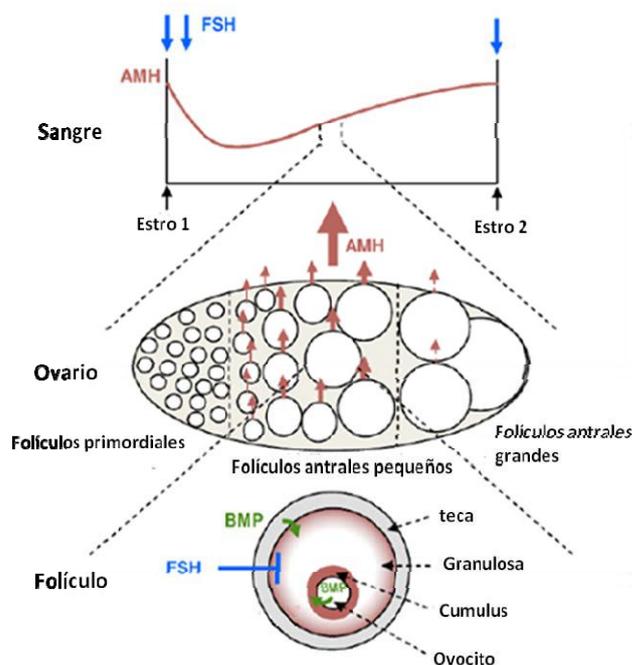


Figura 11: Modelo de la regulación de la producción de AMH en la vaca. Ovario: La mayor expresión de AMH (flechas rojas) se da a nivel de las células de la granulosa externas y en las células del cumulus de folículos antrales pequeños (1 a 5 mm). Folículo: factores intrafoliculares como BMPs pueden mejorar la expresión de AMH, mientras FSH actúa como un factor inhibitor. Sangre: AMH decrece en los días siguientes al estro como consecuencia a la acción negativa de la FSH periovulatoria sobre la población de folículos secretores de altas concentraciones de AMH. (Adaptado de Rico y col., 2011).

En la actualidad, la AMH es el marcador endócrino que mejor predice el número de ovocitos que serán recuperados en respuesta a un tratamiento de estimulación ovárica utilizado en tecnologías de reproducción asistida (Muttukrishna y col., 2004, 2005; Eldar-Geva y col., 2005; Penarrubia y col., 2005; McIlveen y col., 2007; Elgindy y col., 2008). En vacas, las concentraciones circulantes de AMH están positivamente asociadas con el recuento de folículos antrales, la función ovárica y la fertilidad. Las concentraciones de AMH y el recuento de folículos antrales son constantes y altamente repetibles día a día dentro de los individuos y muy variables entre poblaciones (Ireland y col., 2008; Rico y col., 2009, 2011). Ambos factores están altamente relacionados al tamaño de las reservas foliculares ováricas en las vacas. Las vaquillonas con un bajo recuento tienen niveles menores de P4 circulares durante su ciclo estral (Jimenez-Krassel y col., 2009). Además, el desempeño reproductivo es inferior en vacas lecheras con niveles bajos de folículos antrales (Mossa y col., 2012). Bajas concentraciones de AMH en vaquillonas están relacionadas con una vida productiva más corta, bajos niveles de producción en la primera lactancia, los más bajos índices de preñez, las tasas de descarte más altas por problemas productivos y reproductivos, en comparación con vaquillonas que presentaron altos niveles de AMH. (Jimenez-Krassel y col., 2015). Pfeiffer y col. (2014) no encontraron diferencias en las concentraciones de AMH en el momento del estro durante un ciclo estral normal y durante un ciclo inducido con un protocolo de tipo *Select Synch* más un dispositivo intravaginal de liberación prolongada de P4.

1.4.4. AMH y enfermedades de origen ovárico

En humanos las bajas concentraciones plasmáticas de AMH son indicativas de envejecimiento ovárico (de Vet y col., 2002; Mulders y col., 2004; van Rooij y col., 2005), e inversamente, las mujeres con PCOS tienen alta concentración de AMH (Fallat y col., 1997; Pigny y col., 2003; Laven y col., 2004; Pigny y col., 2006). En este sentido, la producción de AMH por parte de las células de la granulosa es 75 veces más alta en mujeres con PCOS que en las mujeres con ovarios normales, lo que sugiere que la AMH puede contribuir a la falla en la ovulación que se presenta en las mujeres con PCOS (Fallat y col., 1997; Pellatt y col., 2007). En mujeres con PCOS la LH, pero no la FSH, inhibe la producción de AMH (Pellatt y col., 2007). En trabajos realizados en bovinos, El-Sheikh Ali y col. (2013), evaluaron la concentración de AMH en vacas con quistes, y no pudieron detectar diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de AMH entre vacas con enfermedad quística ovárica

(COD, del inglés: *cystic ovarian disease*) y controles sanos. Al igual que otros estudios previos que midieron la AMH intrafolicular (Monniaux y col., 2008) y en plasma (Kitahara y col., 2012) de animales con COD, ellos determinaron que la AMH no podría ser usada como un biomarcador para el diagnóstico de COD en vacas. Con respecto a esto, otro trabajo no encontró diferencias en la concentración de AMH en el líquido folicular y en la expresión en células de la granulosa entre folículos antrales normales y quistes foliculares, aunque si encontraron una relación inversa entre las concentraciones de P4 y AMH, siendo estas últimas menores en los quistes luteinizados (Monniaux y col., 2008)

1.5. Persistencia Folicular

La prolongación de la vida útil de los folículos bovinos produce una reducción de la fertilidad luego de la inseminación y de la ovulación (Revah y Butler, 1996). Una alta incidencia de pérdida embrionaria temprana se relaciona con la persistencia de los FD. Dicha persistencia resulta de la incrementada frecuencia pulsátil de la LH cuando existen bajas concentraciones plasmáticas de P4 (Taft y col., 1996) ya sea naturalmente durante la fase lútea (Folman y col., 1973; Meisterling y Dailey, 1987) o como parte de sincronización de celos (Wishart, 1977; Ahmad y col., 1995). Al parecer, las bajas tasas de preñez se deben a la reanudación prematura de la meiosis en los ovocitos (Mihm y col., 1994; Revah y Butler, 1996), que lleva a la mortalidad embrionaria temprana. Wishart (1977) encontró que el 53% de los embriones fecundados de vacas tratadas con P4 durante 21 días tenían escisión retardada a los 3-4 días después de la inseminación.

Durante décadas, los investigadores han tratado de desarrollar con éxito programas para sincronizar el estro en el ganado bovino (Jöchle, 1993). Los tratamientos que incluyen la administración prolongada de P4 (por más de 7 días) resultan en una buena sincronización pero con baja fertilidad en el primer estro después del tratamiento (Hill y col., 1971; Henricks y col., 1973; Butcher y Pope, 1979; Macmillan y col., 1991; Jöchle, 1993; Savio y col., 1993; Stock y Fortune, 1993; Wehrman y col., 1993). Diversos estudios han demostrado que el tratamiento con P4 induce la prolongación del desarrollo del FD (Trimberger y Hansel, 1955; Sirois y Fortune, 1990; Savio y col., 1993). Al finalizar el tratamiento con P4, se produce el estro seguido por el aumento de LH y la ovulación del FD (Sirois y Fortune, 1990; Jöchle, 1993; Savio y col., 1993; Stock y Fortune, 1993; Revah y Butler, 1996). Dado que el CL surge del FD persistente produce cantidades normales de P4, la infertilidad no se puede

atribuir a una incapacidad lútea (Stock y Fortune, 1993). Sin embargo, si se puede atribuir a los efectos del desarrollo folicular prolongado en el ovocito o en el tracto reproductivo. El mantenimiento de los folículos en una prolongada dominancia puede causar una maduración prematura del ovocito, antes del pico de LH (Mihm y col., 1994).

Entre los múltiples factores que intervienen en la etiopatogenia de la COD, recientemente ha sido demostrado que las concentraciones intermedias de P4 son capaces de inducir un incremento en la frecuencia de los pulsos de LH, inhibiendo el pico preovulatorio de LH y así la ovulación, llevando a la prolongación del crecimiento y en consecuencia persistencia de los FD, incrementando los niveles de E2 periféricos y reduciendo la fertilidad (Bridges y Fortune, 2003).

Las ondas de crecimiento y regresión de los folículos ováricos bovinos se producen sucesivamente en un ambiente rico en P4 con el FD de la ola final diferenciándose en folículo preovulatorio, luego de la regresión del CL. Si las concentraciones típicas de P4 de la fase lútea son mantenidas experimentalmente, el ciclo estral puede extenderse en ondas regulares de crecimiento folicular y atresia continua (Sirois y Fortune, 1990; Stock y Fortune, 1993). Sin embargo, las concentraciones subluteales de P4 circulantes extienden el ciclo mediante la inducción de un FD que permanece más tiempo que el normal (persistente). Con insuficiente P4 para inducir una frecuencia pulsátil de LH típica de la fase lútea, el FD continúa creciendo, secretando concentraciones cada vez mayores de E2 (Sirois y Fortune, 1990; Shaham-Albalancy, 2000). En estas condiciones, la fertilidad se encuentra dramáticamente reducida (Stock y Fortune, 1993; Mihm y col., 1994) presentando inconvenientes en los regímenes de sincronización que prolongan el estro con una terapia de P4. Una extendida exposición a concentraciones intermedias de P4 induce una prematura luteinización de las células de la granulosa (Bigelow y Fortune, 1998). El incremento en la capacidad secretora de E2 de folículos de dominancia prolongada puede ser atribuido a un incremento en la masa de tejido esteroideogénico al recibir una frecuente estimulación de LH. En ausencia de los efectos inhibitorios de las concentraciones de P4 en una normal fase lútea, los FD persistentes desarrollan una mayor masa de teca interna que puede producir niveles mayores de andrógenos tras la frecuente estimulación de LH. Se detecta entonces, una mayor concentración de E2 en el plasma de los animales con este tipo de folículos, en comparación con los niveles encontrados en animales con FD normales. El incremento en la habilidad para producir esteroides sugiere que la prematura luteinización en los FD persistentes puede ser un

factor involucrado en la disminución de la fertilidad de ovocitos de este tipo de folículos (Bigelow y Fortune, 1998).

Como dijimos anteriormente estas concentraciones intermedias de P4 impiden el estímulo de los E2, endógenos o exógenos, para desencadenar un pico preovulatorio de LH, pero no suprimen la secreción pulsátil tónica de LH (Roberson y col., 1989; Cupp y col., 1992; Kojima y col., 1992, 2003; Hatler y col., 2008). Tanto las células de la granulosa como de la teca de los folículos de animales que presentan COD conservan altas concentraciones de receptores de LH (Calder y col., 2001), lo que implicaría que la persistencia y el crecimiento de los quistes pueden depender del estímulo de LH (Marelli y col., 2014). Se conoce que los tratamientos que suprimen la frecuencia pulsátil de LH acortan la vida media de los quistes foliculares (Calder y col., 1999; Hatler y col., 2006).

El estudio de los procesos que conllevan a la falla en el proceso de ovulación y la persistencia de esos FDs es una de las llaves para comprender la patogénesis de la COD. Dada la impredecible ocurrencia de los quistes, es realmente dificultoso y con frecuencia impracticable estudiar su aparición espontánea a campo. A partir de esta problemática, se han desarrollado numerosos modelos experimentales para inducir la COD de manera espontánea y así poder estudiarla desde las fases previas a su desarrollo. Estos trabajos se llevaron a cabo mediante la administración de 1) estrógenos exógenos (Wiltbank, 1966; Nadaraja y Hansel, 1976; Carrie're y col., 1995), 2) una combinación de progesterona y E2 (Erb y col., 1973; Winters y col., 1986; Cook y col., 1990, 1991; Hamilton y col., 1995), 3) Antisuero en contra de LH bovina (Nadaraja y Hansel, 1976), 4) testosterona (Fathala y col., 1978) y 5) adrenocorticotrofina (ACTH) exógena (Liptrap y Mc Nally, 1976; Refsal y col., 1987; Kawate y col., 1996; Ortega y col., 2008; Amweg y col., 2013). A pesar de estos intentos, la utilización de P4 en promover la formación de quistes foliculares en el ovario sólo ha sido investigada en modelos a corto plazo que no llegan al tiempo de persistencia necesario para poder definir a la estructura folicular persistente como un quiste propiamente dicho (Hatler y col., 2008). Por lo tanto, la medida en que las concentraciones intermedias de P4 pueden contribuir a la formación de los quistes foliculares en modelos a largo plazo en vacas lecheras no ha sido totalmente investigada, por lo que el desarrollo de este tipo de modelos permitiría analizar los perfiles endócrinos, las dinámicas de crecimiento y las características histológicas de los folículos persistentes/quistes en estadios tempranos de su formación.

1.6. Enfermedad Quística Ovárica

Dentro de los trastornos reproductivos que afectan a los bovinos, la COD constituye una de las causas más frecuentes de infertilidad y subfertilidad en vacas lecheras de alta producción, presentándose con menor frecuencia, en animales destinados a la producción de carne. Esta enfermedad es factible de presentarse en cualquier etapa de la lactancia (Bartolomé y col., 2005). La incidencia de COD en los rodeos lecheros varía desde un 5 a un 30% (Vanholder y col., 2006; Cattaneo y col., 2014, Ortega y col., 2015). El impacto económico de la COD está en directa relación con el alargamiento de los intervalos parto-concepción y parto-parto (Silvia y col., 2002; Peter, 2004), estimándose que cada evento de la enfermedad agrega entre 22 y 64 días al intervalo parto-concepción. A esto se le suma una mayor tasa de descarte de animales enfermos y un aumento directo en los costos en tratamientos veterinarios (Probo y col., 2011). El costo aproximado de esto se calcula en U\$S 137 por vaca en concepto de disminución de la producción de leche y gastos veterinarios (Silvia y col., 2002; Nelson y col., 2010).

1.6.1. Definición

Existen numerosas revisiones en la manera de definir la COD, en este sentido, Silvia y col. (2002) los define como estructuras foliculares, con un diámetro mínimo de 17 mm, que persisten en el ovario más de 6 días en ausencia de CL y que interfieren con la ciclicidad ovárica normal. Por su parte, Wiltbank y col. (2002) los definen como estructuras foliculares con un diámetro mayor o igual a 20 mm, con una persistencia de al menos 7 días en ausencia de CL. En el 2006, Vanholder y col., los definieron como folículos de un diámetro de al menos 20 mm, presentes en uno o ambos ovarios en ausencia de cualquier tejido luteal activo y con interferencia de la ciclicidad ovárica normal. Sumándose a estas definiciones, Bartolomé y col. (2005) establecieron una definición que permite realizar un correcto diagnóstico a campo de la enfermedad sin la necesidad de hacer dos controles para definir el estado de persistencia folicular. En este sentido, definieron a la COD como la presencia de uno o múltiples folículos ováricos, en uno o ambos ovarios, de un diámetro de 18 mm o más, en ausencia de CL y con falta de tonicidad uterina a la palpación. La incorporación del concepto de tonicidad uterina es clave para diferenciar un folículo preovulatorio de un quiste, y se basa en las características del útero durante el proestro, en el cual aumentan los

receptores de oxitocina y, por ende, aumenta también la tonicidad en respuesta a las altas concentraciones de estrógenos. En el caso de quistes foliculares, la falla en la ovulación y la persistencia por varios días determinan la pérdida de los receptores de oxitocina y, por consiguiente, la falta de tonicidad. A esta manera de definir a la COD podemos agregarle que los quistes ováricos no son estructuras estáticas, sino que pueden persistir, luteinizarse o atresarse, además, de manera similar a lo que ocurre en vacas con ciclos estrales normales, las vacas con COD tienen ondas de crecimiento folicular que pueden terminar en una ovulación espontánea o en la formación de otro quiste. (Cook y col., 1990; Hamilton y col., 1995; Garverick, 1997; Bartolomé y col., 2005). La presencia de más de una estructura quística no es rara, en un estudio realizado por Silvia y col. (2002), el 47% de las vacas con quistes ováricos tuvieron 2 o más quistes en el momento de la detección, por lo que ellos consideraron que la condición poliquística es más frecuente en las vacas con quistes incluso que la aparición de ovulaciones múltiples en vacas normales. Todas estas posibilidades que se ponen en juego durante el desarrollo y persistencia de la COD deja a las claras el gran y complejo dinamismo de esta enfermedad.

1.6.2. Factores predisponentes

1.6.2.1. Factores generales

Herencia: La tasa de heredabilidad es baja (0,07 a 0,12 %) y no existen evidencias claras de cuáles son los genes involucrados. Es posible que la selección de razas con predisposición genética a desarrollar COD, dado que cumplieran con el objeto de aumentar la producción láctea, pueda aumentar la incidencia de esta enfermedad (Hooijer y col., 2001).

Producción láctea: los altos niveles de producción se correlacionan positivamente con la aparición de quistes. El incremento de la producción individual en las últimas décadas, ha determinado un aumento de los desequilibrios metabólicos en vacas posparto, los cuales desempeñan un importante papel en la formación de quistes (Zulu y col., 2002; Vanholder y col., 2006). Esto es apoyado por la elevada incidencia de COD en vacas lecheras durante el posparto temprano, período en el cual los animales se encuentran en balance energético negativo (BEN), y por la asociación de COD con un alto nivel de producción de leche (Laporte y col., 1994; Beam y Butler, 1997; Hooijer y col., 2001, 2003; López-Gatius y col., 2002). Varios estudios han demostrado que el BEN afecta el desarrollo folicular y la

ovulación (Beam y Butler, 1997, 1999; Butler, 2003; Diskin y col., 2003; Lucy, 2003; Roche, 2006; Leroy y col., 2008; Walsh y col., 2011.) y también puede formar parte de la etiopatogenia en la formación de quistes (Vanholder y col., 2006).

Edad: la tasa de COD aumenta con la edad, siendo muy raro su hallazgo en vaquillonas, y tiene una distribución variable según la estación del año (Garverick, 1997).

Momento reproductivo: la mayor incidencia de la enfermedad en el puerperio denota el efecto de los disturbios endocrinos, característicos de esa etapa de la vida de la hembra bovina, en el desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, el regreso espontáneo de folículos anovulatorios es un hallazgo frecuentemente encontrado en el posparto temprano (Probo y col., 2011). Considerando el alto porcentaje de regresión espontánea (Kesler y Garverick, 1982; Day, 1991), la detección de folículos anovulatorios en las primeras semanas después del parto debería no ser considerado patológico. Desde el punto de vista práctico, una disfunción ovárica se puede sospechar cuando los folículos anovulatorios se detectan no antes de las 7 semanas después del parto, cuando las funciones reproductivas ya deberían haber sido restauradas (Sheldon y Dobson, 2004; Crowe, 2008; Probo y col., 2011). En este sentido, Bartolomé y col. (2005) establecieron que la condición de COD se puede dar en cualquier momento de la lactancia y estaría asociada a una condición de balance energético positivo en la cual existe un pronunciado desarrollo folicular pero la retroalimentación positiva del E2 sobre la liberación hipotalámica de GnRH estaría alterada. Apoyando estos hallazgos, un trabajo realizado por Cattaneo y col. (2014) analizando la aparición de COD en rodeos de la cuenca lechera santafecina, en argentina, encontraron que la incidencia de COD fue menor durante los primeros 100 días postparto que en las etapas posteriores de la lactancia

Condición corporal (CC): es un factor predisponente importante, animales con CC superior a 4 (escala de 0 a 5) suelen presentar quistes con una frecuencia 2.5 veces superior, respecto a aquellas vacas cuya CC es menor o igual a 3 (Salveti y col., 2007a).

1.6.2.2. Factores específicos

Alimentación: la obligatoria aparición de BEN en el posparto temprano de las vacas de alta producción lechera, que está asociada a una importante movilización de las reservas corporales (Bauman y Currie, 1980; Hooijer y col., 2005), parece tener un vínculo positivo con la aparición de COD durante el postparto (Vanholder y col., 2006). En esta etapa las concentraciones de insulina, IGF-1 (del inglés: *insuline-like growth factor-1*), glucosa (Beam

y Buttler, 1999) y leptina (Liefers y col., 2003; Barb y Kraeling, 2004), están reducidas mientras metabolitos como ácidos grasos no esterificados (AGNEs) (Rukkwamsuk y col., 2000) y β -hidroxibutirato están incrementadas (Leroy y col., 2004) por la gran lipomobilización. Tanto insulina como IGF-1 participan en el control del crecimiento y desarrollo folicular (Spicer y Echterkamp, 1995), ambos estimulan la expresión de LHR en las células de la granulosa (Davoren y col., 1986) y es sabido que la insulina es un potente estimulador de la esteroidogénesis (Price y Silva, 1999; Armstrong y col., 2002), por lo que, sus bajas concentraciones en el postparto temprano podría contribuir al proceso de anovulación y la concomitante formación de quistes (Zulu y col., 2002; Cattaneo y col., 2014; Hein y col., 2015)

Las dietas altas en proteínas estimulan la producción de leche en la lactancia temprana (Butler, 1997) pero se ha demostrado que el consumo de proteína por encima de las necesidades para la producción, genera un efecto negativo sobre la eficiencia reproductiva (Canfield y Butler., 1990), que se supone puede estar asociado al incremento del gasto energético para desintoxicar al hígado del exceso de amoníaco (Staples y col., 1998) y por otras acciones directas sobre los órganos reproductivos (Ortega y col., 1995, 1997).

Precisamente, la privación aguda de energía está asociada a la supresión de la liberación pulsátil de LH así como a la anovulación por ausencia del pico preovulatorio de la misma (Diskin y col., 2003).

Enfermedades: durante el posparto, las vacas lecheras son susceptibles a padecer una gran variedad de procesos patológicos, incluyendo retención de placenta, endometritis, metritis, hipocalcemia y anestro posparto. Todas estas condiciones han sido correlacionadas positivamente con la COD (Kesler y col., 1980; Garverick, 1997). En este sentido, Bosu y Peter, (1987) demuestran que las infecciones uterinas posparto causadas por bacterias Gram negativas, capaces de sintetizar y liberar endotoxinas, estimulan la liberación de cortisol adrenal suprimiendo de este modo el pico preovulatorio de LH, con la consecuente formación de quistes. Las interleuquinas liberadas en respuesta a las endotoxinas, son capaces de inducir la liberación de hormona liberadora de corticotrofina (CRH) del hipotálamo y consecuentemente de ACTH de la hipófisis, lo cual estimula a la glándula adrenal a incrementar la producción de corticoesteroides, el cual a su vez inhibe la formación de LHR en las células de la granulosa. Todas estas acciones resultan en la supresión del pico preovulatorio de LH (Nakao y Grünert, 1990). Sumado a esto, se ha hallado que vacas con

diagnóstico previo de mastitis clínica mostraron 2,72 veces más chances de desarrollar COD que aquellas vacas que no presentaron dicha infección (Cattaneo y col., 2014)

Estrés: Cualquier factor considerado provocador de estrés estimula al eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, el cual a su vez modula al eje hipotálamo-hipofisario-gonadal modificando la secreción de gonadotrofinas. El rol del estrés en la patogénesis de la COD es mediado por los niveles de cortisol endógeno, que ejercen su acción inhibitoria sobre la liberación de LH. La capacidad de los corticoides en la inducción de la enfermedad, ha sido demostrada experimentalmente por administración de ACTH en vacas (Peter y Liptrap, 1985; Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000; Ortega y col., 2008; Amweg y col., 2013). El pico preovulatorio de LH es especialmente sensible al efecto inhibitorio de la ACTH y los glucocorticoides. La inhibición de la secreción de LH hipofisaria, consecuencia de la acción fisiológica de los glucocorticoides, podría ser causada por la modificación en la retroalimentación de los esteroides gonadales, dado que los corticoides reducen el efecto estimulante de los estrógenos sobre la secreción de la LH. Se cree que los péptidos opioides endógenos (producidos en el SNC) también bloquean la onda preovulatoria de LH inducida por los estrógenos y la liberación hipotalámica de GnRH (Malven, 1986).

1.6.3. Etiopatogenia

La patogenia de la COD involucra un trastorno plurifuncional de la ovulación, siendo la hipótesis más aceptada aquella que postula que su desarrollo se asocia a un desequilibrio neuroendocrino a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal con la concomitante falla en la ovulación, luego de que uno o varios folículos de una onda de crecimiento folicular se desarrollan y superan el tamaño ovulatorio (Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000; Peter, 2004; Vanholder y col., 2006). Si bien se sabe que existen una gran cantidad de factores que influyen en la presentación de la enfermedad, descritos con anterioridad en este apartado, la etiopatogenia de la COD en vacas lecheras es un complejo proceso que involucra disfunciones en numerosos procesos fisiológicos del ovario, que incluyen a la foliculogénesis, esteroidogénesis y la ovulación. En este sentido, es aceptado actualmente que la persistencia de los folículos quísticos está relacionada a importantes cambios a nivel de componentes moleculares intraováricos (Silvia y col., 2002, Ortega y col., 2015). Asimismo, aunque muchos estudios han caracterizado la dinámica del crecimiento folicular, la comprensión de

los cambios celulares y moleculares que ocurren dentro del ovario previo al proceso de anovulación aún es escasa.

1.6.3.1. Disfunción hipotálamo-hipofisaria

En esta hipótesis, la causa principal de la formación de quistes estaría relacionada con una liberación aberrante de LH desde la hipófisis, ya sea porque el pico preovulatorio de LH está ausente, la magnitud es insuficiente u ocurre en un momento inadecuado durante la maduración del FD. (Hamilton y col., 1995; Yoshioka y col., 1996; Vanholder y col., 2006). Esta falla en la liberación de LH parece ser causada por una alteración en el mecanismo de retroalimentación positiva de los estrógenos secretados por el folículo preovulatorio, lo cual resultaría en una falla en la liberación de GnRH y por ende de su acción a nivel hipofisario (Vanholder y col., 2006). Las vacas con COD y con niveles elevados de estrógenos endógenos fallan en generar un pico de LH en respuesta a una dosis de E2 exógeno, indicando que se ha perdido la capacidad de responder a la retroalimentación positiva de los E2 sobre el eje hipotálamo-hipofisario (Zaied y col., 1981; Refsal y col., 1988; De Silva y Reeves, 1988). En este sentido, si la onda preovulatoria de GnRH/LH ocurre inoportunamente durante el crecimiento folicular, puede ocasionar la pérdida de sensibilidad del hipotálamo al efecto de retroalimentación positiva del E2, llevando de esta manera a la anovulación y consecuente formación de quistes (Gümen y Wiltbank, 2002; Gümen y col., 2002). En un estudio realizado por Hamilton y col. (1995) se detectó una concentración promedio mayor tanto de LH como de E2 circulantes en las vacas con quistes, si se las comparaba con vacas con ciclos normales o con recuperación espontánea, no registrándose un pico preovulatorio de LH en las hembras con COD. La secreción aumentada de LH en las hembras bovinas con quistes podría estimular un incremento en el E2 y este incremento podría causar un aumento en la secreción de LH, creando así un efecto cascada que afectaría la respuesta ovárica a la secreción de LH. En resumen, una falta de sensibilidad a la retroalimentación positiva del estradiol a nivel del hipotálamo, desencadenaría la falta del pico preovulatorio de LH debido al menor contenido de GnRH en el área preóptica-supraquiasmática, y los elevados niveles de la misma en el tallo hipofisario-eminencia media desde donde se libera LH de manera tónica. Como consecuencia, los niveles basales de LH durante la fase de crecimiento folicular serían más elevados (mayor frecuencia como resultado de un mayor contenido de GnRH en la eminencia media) y al momento de la ovulación, no habría niveles suficientes de GnRH en el centro cíclico (área

preóptica-supraquiasmática) para inducir el pico preovulatorio de LH desde la hipófisis, conduciendo de esta manera a la formación de quistes. Por otra parte, esos niveles basales persistentemente elevados de LH podrían actuar sobre los receptores de las células de la granulosa, estimulando el desarrollo folicular más allá del tamaño ovulatorio (Vanholder y col., 2006; Salvetti y col., 2007a).

Con respecto al rol de los niveles de P4 en la formación de los quistes, Hatler y col. (2003) encontraron que el 66% de las vacas con quistes foliculares tenían concentraciones plasmáticas intermedias de P4 (0,1-0,93 ng/ml) al momento de la detección del quiste. En otro estudio Vanholder y col. (2005), evidenciaron que al momento de la formación, solamente un 25% de los quistes fueron asociados con niveles intermedios de P4 (0,3-2 ng/ml), siendo estas concentraciones capaces de bloquear el pico preovulatorio de LH y la ovulación. Un estudio más reciente realizado por Probo y col. (2011) encontró que las concentraciones en todos los animales con COD evaluados se mantenía en niveles intermedios de P4 (0,3 a 1,2 ng/ml). Precisamente, el efecto de estas concentraciones intermedias de P4 (que se encuentran por encima de los niveles basales pero no son suficientes como para inducir la regresión de FD y el inicio de una nueva onda) sería inhibir la ovulación, bloqueando el pico de LH y aumentando su frecuencia pulsátil de esta gonadotropina. Sin embargo, esta hipersecreción basal de LH no se asociaría a las causas de formación de los quistes sino a su crecimiento y persistencia a lo largo del tiempo. En este sentido, algunos autores definen a la persistencia como una etapa en el desarrollo de los quistes (Cook y col., 1990; Hamilton y col., 1995; Ortega y col., 2015).

1.6.3.2. Disfunción ovárica-folicular

Aunque diversos estudios han caracterizado la dinámica del crecimiento folicular, aún es escasa la información de las modificaciones celulares y moleculares ocurridas en el folículo ovárico previo al proceso de anovulación (Wiltbank y col., 2002; Salvetti y col., 2007a). Algunos autores han descrito alteraciones en la producción de factores de crecimiento por parte de células de la granulosa (Ortega y col., 2008; Rey y col., 2010; Rodríguez y col., 2015), en sus proteínas de unión (Rodríguez y col., 2011) así como también, síntesis aberrante de proteínas en la MEC de los quistes (Salvetti y col., 2004). Una disfunción primaria a nivel del folículo puede provocar una disrupción del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y causar la formación del quiste (Vanholder y col., 2006). De este modo, variaciones en la expresión y en

el número de receptores de hormonas hipotálamo-hipofisarias así como de hormonas esteroides parecen estar implicados en la anovulación del FD. En este sentido, se ha sugerido que alteraciones en la expresión de receptores de gonadotrofinas podrían ser un factor relevante en el desarrollo de los quistes (Kawate y col., 1990; Calder y col., 2001; Wiltbank y col., 2002). 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 redujo en comparación con los folículos normales. Recientemente, Marelli y col. (2014) estudiaron la expresión del ARNm de los receptores de gonadotrofinas, LHCGR (receptor de hormona luteinizante/coriogonadotrofina) y FSHR por real time PCR. Ellos encontraron que la expresión de los transcritos para LHCGR y FSHR en las células de la granulosa de quistes era significativamente más baja que aquella encontrada en todos los estadios de desarrollo folicular en los controles. En contraste, los niveles de expresión en células de la teca de quistes fueron menores que los encontrados en folículos antrales grandes. De la misma forma, ha sido previamente demostrado que un sutil desbalance en la expresión de los receptores de estrógeno (ESR) en los componentes del folículo ovárico podría también estar involucrado en la patogénesis de la formación de quistes en vacas (Garverick 1997, Salvetti y col., 2007b, 2012, Alfaro y col., 2012), oveja (Ortega y col., 2009), humanos (Shushan y col., 1996, Jakimiuk y col., 2002) y roedores (Salvetti y col., 2009). Además, estudios realizados en vacas con COD inducida con ACTH mostraron cambios en la expresión del receptor de estrógenos-2 (ESR-2) en los folículos quísticos, y no así en los folículos controles, lo que prácticamente coincide con los hallazgos realizados en animales con COD espontánea. En este último grupo también fue hallado un incremento en la expresión de ESR-1 (Salvetti y col., 2007b, 2012; Alfaro y col., 2012; Ortega y col., 2015). Estos pequeños cambios en los niveles de expresión de ESR-1 y ESR-2 podrían alterar el desarrollo folicular y la ovulación (Mosselman y col., 1996; Pettersson y col., 1997), al modificar la proliferación y apoptosis celular, la expresión de receptores hormonales, la esteroidogénesis y así todos los aspectos moleculares de la COD (Velazquez y col., 2011; 2013; Ortega y col., 2015).

Tratando de dilucidar el mecanismo de formación de los quistes algunos estudios se han enfocado en la acción del estrés a nivel ovárico y ha sido propuesto que la acción de los glucocorticoides sobre la función ovárica podría ser antagónica a la función reproductiva (Acosta y col., 2005) y contribuir a la formación de quistes (Baravalle y col., 2007), ejerciendo un efecto directo sobre las células de la granulosa, reduciendo la producción de esteroides gonadales, prostaglandinas y la expresión de receptores de LH (Kawate y col.,

1990; Kol y col., 1998). 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 expresión de LHR a nivel de la pared folicular, contribuyendo al desarrollo de COD (Moberg, 1991). De la misma forma y considerando que la ovulación es un evento inflamatorio caracterizado por un incremento en la síntesis de interleuquinas y prostaglandinas (Espey, 1980; Ando y col., 1998), un incremento en la producción de glucocorticoides antiinflamatorios durante la ovulación, en respuesta a situaciones de estrés, podría limitar este proceso inflamatorio en el ovario (Hillier y col., 1998; Michael y col., 2003; Acosta y col., 2005). Aunque, el ovario no sería capaz de sintetizar de novo glucocorticoides, un estímulo con ACTH es capaz de estimular la secreción de cortisol de cultivos celulares de pared folicular (Wiltbank y col., 2002; Amweg y col., 2011; 2013). Además, el acceso de cortisol activo en los tejidos diana es regulado por la expresión relativa de dos enzimas 11 β -hidroxiesteroide-dehidrogenasa 1 y 2 (11 β HSD-1 y -2), que respectivamente catalizan la activación e inactivación del cortisol en el ovario bovino. Amweg y col. (2013) documentaron la expresión de estas dos enzimas en las paredes de folículos quísticos, donde tanto quistes espontáneos a campo como inducidos con ACTH mostraron inmunomarcación positiva para las dos enzimas, siendo la 11 β HSD1 la que mostró un nivel de marcación más alto en células de la granulosa en relación a los folículos terciarios controles. Asimismo, Amweg y col. (2011) demostraron por RT-PCR la expresión positiva de receptores de melanocortina (MCRs) en la pared de folículos ováricos, a los cuales se une la ACTH para ejercer su efecto. Estos trabajos evidencian que los folículos ováricos podrían estar expuestos a altas concentraciones activas de glucocorticoides, ejerciendo así un rol local en la etiopatogenia de la COD.

Otros componentes importantes en el control de la actividad ovárico son los miembros de la superfamilia del TGF- β , que actúan como moléculas regulatorias intraováricas involucradas en la proliferación y diferenciación celular, esteroidogénesis, maduración ovocitaria y función del cuerpo lúteo. En este sentido, Stangaferro y col. (2014) evaluaron la expresión de activina, inhibina y foliculostatina en animales con COD inducida con ACTH, con COD espontanea y en controles. Ellos hallaron que existe un incremento en la expresión de la subunidad alfa de activina A/inhibina A, la subunidad alfa de inhibina y foliculostatina en las células de la granulosa de los animales con COD espontanea, y que existe una disminución en las concentraciones de inhibina B ($\alpha\beta$ B) en el líquido folicular del mismo grupo. Otro estudio del mismo grupo de trabajo (Matiller y col., 2014), evaluó la participación

de tres isoformas del TGF- β (isoformas TGF- β 1, 2 y 3) en los mismos grupos de animales y hallaron que TGF- β 1 y TGF- β 2 se expresó de manera incrementada en los animales con COD espontánea en relación a los folículos antrales y atrésicos del grupo control. Sumado a esto, la expresión de las tres isoformas se presentó alterada durante la foliculogénesis en los animales con COD espontánea e inducida con ACTH. Estos hallazgos establecen alteraciones importantes en los sistemas activina-inhibina-foliculostatina y del TGF- β que pueden conducir a trastornos en las funciones controladas por ellos a nivel folicular, favoreciendo la persistencia folicular y la formación de quistes.

1.7. Consideraciones Finales

La expresión y mecanismo de acción de numerosos factores intraováricos, han sido parcialmente analizados en ovarios de numerosas especies bajo circunstancias fisiológicas, no así en situaciones patológicas por lo que, en este sentido los datos disponibles en la bibliografía son aún escasos. Una de las dificultades en el estudio de la etiología de esta enfermedad es diferenciar las causas del desbalance endocrino que están asociadas a ella. En este sentido, las muestras obtenidas en frigorífico, con las que frecuentemente se trabaja debido a la accesibilidad en la obtención de las mismas, suelen encontrarse “contaminadas” por los numerosos e infructuosos tratamientos a los que fueron sometidos los animales. A esto, se le suma el hecho de que éstos no cuentan con una historia reproductiva y de manejo a la que se pueda acceder, siendo estos datos fundamentales para un correcto análisis e interpretación de la etiopatogenia de una enfermedad. Diversos modelos han ayudado a entender los cambios endocrinos asociados a los trastornos ováricos, sin embargo, la mayoría se han utilizado para el estudio de los quistes ya formados, sin poder establecer como un folículo en desarrollo puede fallar en su ovulación, persistir en el ovario y formar finalmente un quiste. Por lo tanto, resulta de gran utilidad el empleo de modelos de inducción de folículos persistentes y quistes, para la evaluación de los procesos previos a la formación de los quistes ováricos en condiciones más controladas, pudiendo correlacionar las distintas variables entre la enfermedad de presentación espontánea con lo ocurrido en el modelo experimental.

Hemos visto la importancia del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, manifestada a través de las funciones de las hormonas gonadotróficas, esteroideas, y el rol preponderante de los factores locales y sus vías de señalización en el funcionamiento normal del ovario.

Quedando descriptas algunas de las rutas y cambios metabólicos endócrinos, parácrinos y autócrinos que interaccionan para determinar la complejidad y dinamismo que presentan los folículos persistentes que van a dar lugar a la aparición de la COD.

La comprensión de los mecanismos de control implicados en el crecimiento folicular en ovarios bovinos es altamente relevante y contribuirá a explicar los procesos que ocurren durante situaciones patológicas que afectan la ciclicidad ovárica normal del ganado. Además, esto permitirá aumentar el caudal de conocimientos hasta ahora comprendidos en la formación inicial de folículos persistentes como base de la etiopatogenia de la COD.

2. Objetivos

2.1. Hipótesis General

En base a lo anteriormente expuesto planteamos como hipótesis general que una alteración en la expresión de componentes de la superfamilia de TGF- β , importantes actores en los mecanismos autócrinos, parácrinos y endócrinos del ovario, podría afectar el normal desarrollo folicular, formando parte de la patogenia de trastornos reproductivos de origen ovárico en bovinos, proponiéndonos por lo tanto, el siguiente objetivo general:

2.2. Objetivo general:

Estudiar la participación de BMPs (del inglés: *Bone Morphogenetic Protein*: proteína morfogenética del hueso) y AMH (del inglés: *anti-Müllerian hormone*: hormona antimulleriana) en las alteraciones ováricas relacionadas a la enfermedad quística ovárica bovina.

2.3. Objetivos específicos:

- 1) Caracterizar un modelo de persistencia folicular para el estudio de los primeros estadios de COD (*Cystic Ovarian Disease*: enfermedad quística ovárica) ,
- 2) Localizar e identificar componentes de la subfamilia de las BMPs y sus receptores en la pared folicular de folículos persistentes y quistes foliculares;
- 3) Estudiar la expresión de AMH en la pared folicular de folículos persistentes y quistes foliculares;
- 4) Cuantificar los niveles de AMH en líquido folicular, como posibles indicadores tempranos de disfunción ovárica;
- 5) Analizar los niveles séricos e intrafoliculares de gonadotrofinas y esteroides correlacionándolos con el resto de las variables estudiadas;
- 6) Aplicar técnicas poco invasivas (aspiración folicular, ecografías, niveles hormonales séricos), con el objetivo de caracterizar la persistencia folicular relacionada con la COD correlacionando los resultados con las variables ambientales y de manejo, de manera de sugerir medidas correctivas;
- 7) Determinar similitudes y diferencias entre los hallazgos efectuados en los modelos experimentales, con aquellos obtenidos en animales en los cuales se presenta la enfermedad de manera espontánea y diagnosticados a campo.

3. Materiales y Métodos

3.1. Procedimientos generales efectuados con animales

Todos los procedimientos que se llevaron a cabo 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 44/2008.

3.1.1. Técnicas utilizadas para la obtención de muestras *in vivo*

3.1.1.1. Aspiración de líquido folicular guiada por ecografía

Para la realización de la aspiración del líquido folicular se adaptó la técnica descrita por Seneda y col. (2003) que ha sido ampliamente utilizada para la obtención de muestras para estudios moleculares. Con este fin, se utilizó un sistema de ultrasonido digital Chison 8300Vet 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 mmHg. El dispositivo de aspiración fue introducido vía vaginal hasta contactar con el fondo de la misma, y el ovario previamente 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 finalmente proceder al aspirado del líquido folicular. Inmediatamente de recolectada la muestra, se procedió a su conservación a temperatura de refrigeración (4-6°C) y traslado al laboratorio para su procesamiento (figura 12).

3.1.1.2. Ovariectomía bilateral

Para la obtención de los ovarios se utilizaron dos técnicas diferentes de acuerdo al momento y tipo de animales. En vacas se realizó la ovariectomía transvaginal ya que la

maniobrabilidad en el espacio vaginal es mucho mayor que en vaquillonas. En estas últimas, se utilizó la técnica de ovariectomía con abordaje por el flanco izquierdo.



Figura 12: Técnica de aspirado folicular guiado por ecografía.

3.1.1.2.1. Técnica por colpotomía (transvaginal)

Los animales del modelo de persistencia folicular así como aquellos con diagnóstico positivo y confirmado de COD fueron sometidos a la ovariectomía bilateral por colpotomía. Esto se realizó a través de abordaje transvaginal con el animal en pie (figura 13), para lo cual en primer lugar se realizó una sedación 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 (5%). Mediante un tensor de vagina se posicionó a ésta craneoventralmente alejando su pared dorsal del recto, posteriormente con un bisturí de hoja oculta se incidió unos 2 cm el techo de la vagina y el peritoneo. Se continuó con la divulsión de la incisión hasta lograr una abertura que permitió introducir una mano dentro de la cavidad pélvica, se localizaron y retrajeron los ovarios dentro de la vagina y se colocó una pinza hemostática Kocher modificada *ad hoc* (sin dientes) en el pedículo ovárico. A continuación se realizó la ligadura del mismo y los vasos

contenidos en él (arteria y vena ovárica) por transfixión con hilo no absorbible simple (lino N°14), atravesando el pedículo ovárico con una aguja semicircular traumática enhebrada, dejando solo el hilo simple a través del tejido. Posteriormente se desenhebró la aguja y se realizó el primer seminudo que tomó la mitad del pedículo, luego se rodeó la totalidad del tejido a ligar con una nueva lazada y se realizó el último nudo, logrando así una buena manipulación, tensión y fijación de los nudos. Luego se procedió a la sección y extracción de ambos ovarios. Para evitar rupturas de las estructuras foliculares, previo a la ovariectomía se realizó la extracción del líquido folicular mediante el sistema de aspiración anteriormente descrito. Finalmente los animales fueron tratados con antibióticos, coagulantes, antiinflamatorios y antiparasitarios externos.

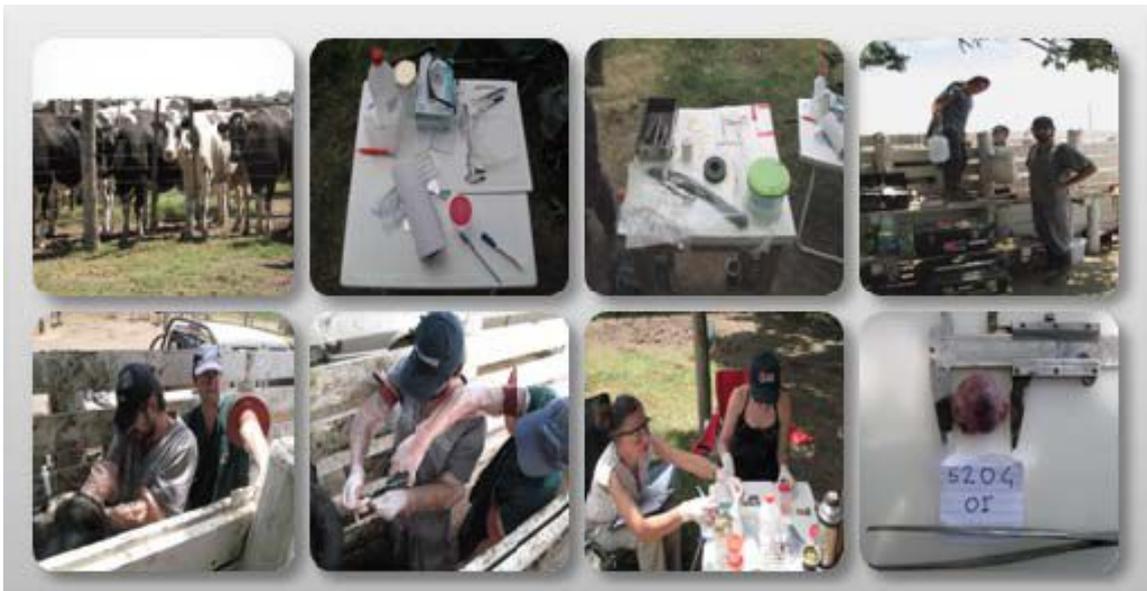


Figura 13: Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje transvaginal.

3.1.1.2.2. Técnica de laparotomía por flanco izquierdo

Para la extracción de los ovarios mediante ovariectomía bilateral con el animal en pie, en primer lugar se realizó la sedación mediante la aplicación por vía subcutánea de 5 ml de una formulación combinada de clorpromazina (5 mg/ml) y difenhidramina (2 mg/ml) (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 (2%) (Lidocaína 2%, Vetue®). Se procedió a realizar una incisión desde dorso-caudal hacia ventro-craneal de

la piel del flanco y de los planos musculares que se encuentran por debajo de la misma, incisión que fue de una longitud suficiente para permitir un buen acceso a cavidad abdominal. Una vez dentro de ésta se continuó con la técnica descrita en el apartado anterior hasta la obtención de los ovarios. Luego se prosiguió con la sutura de los planos musculares con hilo de nylon N°50 y puntos simples en “X”, y de la piel con nylon N°40 realizando una sutura continua de Reverdin (Garnero y Perusia, 2002) (figura 14). Para finalizar, los animales fueron tratados con antibióticos, coagulantes, antiinflamatorios y antiparasitarios externos.



Figura 14: Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje por flanco izquierdo.

3.1.1.3. Técnicas para la obtención de muestras de sangre

De acuerdo a la finalidad de las muestras de sangre se procedió a: la punción de vasos coccígeos cuando el destino era la determinación diaria de hormonas esteroides y gonadotrofinas. Y a la extracción mediante la colocación de un catéter endovenoso en la vena yugular cuando el destino de la sangre era la evaluación de la frecuencia de pulsátil y la aparición del pico de LH.

3.1.1.3.1. A través de punción de vasos coccígeos

Para esta maniobra se utilizaron agujas calibre 25 mm x 1,2 mm acopladas a jeringas de 10 ml. Se procedió a punzar aleatoriamente la arteria coccígea media y/o las venas coccígeas medias en la región ventral de los cuerpos de las primeras vertebrae coccígeas.

3.1.1.3.2. A través de un catéter endovenoso yugular

Para esta maniobra se realizó una cirugía menor sobre el surco yugular. Se procedió a la tricotomía, limpieza y antisepsia del área que corresponde con dicho surco. Luego, con un bisturí se realizó una incisión de un centímetro de longitud sobre piel y subcutáneo, justo por encima de la vena yugular, previamente ingurgitada. Posteriormente, se introdujo en la incisión una aguja corta de grueso calibre y se procedió a punzar la vena yugular, una vez que se logró llegar a la luz del vaso, se introdujo por la aguja una sonda K33 estéril (2 mm de diámetro) a la que previamente se le realizó un corte en bisel de su extremo fenestrado. Luego se retiró la aguja de la luz del vaso. Para finalizar se realizó la fijación del la sonda a través de tres puntos de sutura que abarcaron la piel y la sonda (Garnero y Perusia, 2002) (figura 15). Para evitar el coagulado de la sangre se procedió a llenar el catéter con una solución de heparina sódica (5000 UI/ml) en solución fisiológica (dilución 1:1000), esta maniobra se repitió luego de cada extracción de sangre.



Figura 15: Colocación del catéter endovenoso yugular.

3.1.2. COD espontánea

3.1.2.1. Diagnóstico de COD espontánea

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 de la Universidad Nacional del Litoral. Estos médicos veterinarios nos informaron al primer indicio de alteraciones foliculares compatibles con COD, las cuales fueron verificadas por nosotros 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) (figura 16).

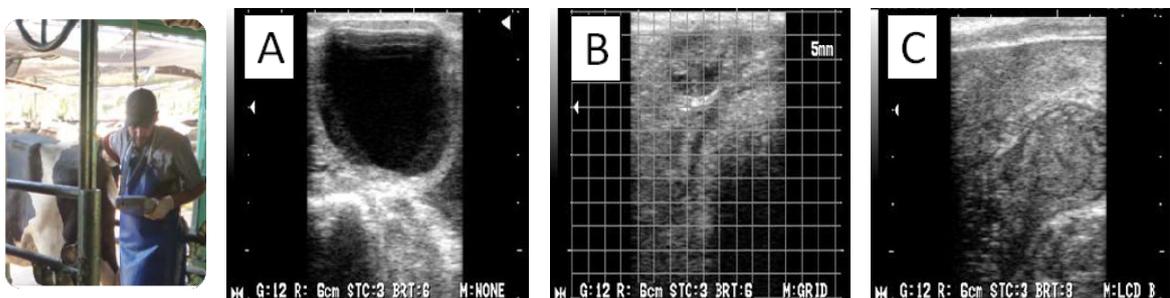


Figura 16: Diagnóstico ecográfico de COD. A: ovario con un quiste folicular B: ovario contralateral con escaso desarrollo folicular. En ambos ovarios no se detecta la presencia de cuerpo lúteo. C: cuerno uterino con ausencia de tono.

3.1.2.2. Obtención de muestras

A partir del diagnóstico de COD y dependiendo de la categoría de los animal, se tomaron dos tipos de muestras: ovarios enteros (de vacas en lactancia con indicación de rechazo por motivos no reproductivos) o líquido folicular rico en células de la granulosa (en vacas en lactancia sin indicación de rechazo). 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, detallada con anterioridad en este apartado.

Sumado a esto, y para un posterior análisis en trabajos que se desarrollaron en paralelo dentro de nuestro grupo, en todos los casos se tomaron muestras de sangre por punción de vasos coccígeos y se confeccionó una anamnesis completa del animal, recabando datos sobre la alimentación, niveles de producción, manejo, índices productividad y reproductivos. Además, durante estas mismas visitas se tomaron muestras de animales controles, considerándose tales a vacas que en comparación con el caso de COD, tenían el mismo

número de lactancias, la misma edad, se encontraban en el mismo momento de la lactancia (días en lactancia, DEL), pertenecían al mismo lote y no presentaban ningún tipo de enfermedades.

3.1.3. COD inducida mediante ACTH

Este modelo de inducción de quistes fue realizado en paralelo con otras tesis. Las determinaciones hormonales y la caracterización morfológica de los ovarios provenientes del modelo experimental, fueron presentadas en una tesis anterior (Salveti, y col., 2010) y publicados en revistas de alto impacto (Amweg y col., 2013)

3.1.3.1. Animales

Se utilizaron 10 vaquillonas de la raza Holando Argentino puros por cruza, de entre 18 y 24 meses de edad, con un peso promedio de 400 kg, examinadas antes del comienzo de la experiencia por tacto rectal y ultrasonografía para comprobar la normalidad en su tracto reproductor y la normalidad y regularidad de sus ciclos estrales. Los animales fueron alojados en corrales descubiertos y su 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: el día -9 se administraron 100 µg intramusculares de un análogo sintético de GnRH (buserelina acetato, Receptal®, Intervet), el día -2 se administraron 150 µg de un análogo sintético de PGF2α (D+Cloprostenol, Ciclar, Zoovet®) y el día 0 se realizó la última administración de 100 µg de GnRH. La ovulación fue confirmada mediante ultrasonografía (Sirois y Fortune, 1988) luego de la última inyección de GnRH y fue designada como día 1 del ciclo estral (figura 17). Se optó por utilizar a la ovulación como evento clave para ubicar el día exacto del ciclo estral en que se encontraban los animales debido a que este protocolo de sincronización fue diseñado para sincronizar eficientemente la ovulación pero no la aparición de celos (Pursley y col., 1995), definiendo este evento como día 1 del ciclo, de acuerdo con lo publicado por numerosos autores (Hafez y Hafez, 2002; Forde y col., 2011; Sartori y Barros, 2011). Durante este período, los animales no recibieron ningún otro tratamiento.

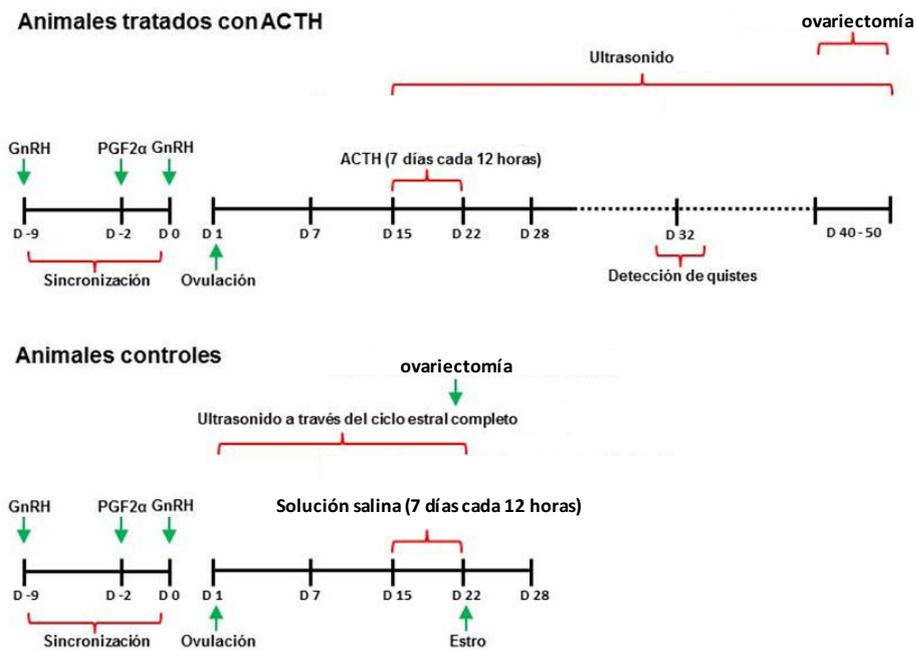


Figura 17: Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes foliculares mediante ACTH. D: día.

3.1.3.2. Grupos experimentales

Los animales fueron distribuidos en dos grupos al azar:

Grupo I (n=6): luego de la sincronización de celos, estas vaquillonas fueron tratadas con 100 UI de ACTH (1mg/ml de Tetracosactido [corticotropina], Synacthen depot, Novartis), cada 12 horas por un período de 7 días seguidos, a partir del día 15 del ciclo estral. El comienzo del tratamiento con ACTH (día 15 del ciclo estral normal) se realizó en el momento del ciclo en el que la onda preovulatoria de LH 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 (Control, n=4): luego de la sincronización, este grupo fue tratado con solución fisiológica en la misma frecuencia de aplicaciones y bajo las mismas condiciones ambientales que en el grupo I.

3.1.3.3. Monitoreo de los cambios ováricos

Con el fin de monitorear los cambios en el ovario durante el ciclo estral se realizaron a las vaquillonas de ambos grupos exámenes diarios mediante palpación rectal y ultrasonografía hasta la obtención de las muestras. Para esto, se utilizó un equipo de ultrasonografía HS101V

con transductor lineal transrectal de 5 MHz (Honda, Tokio, Japón). Se tomaron como parámetros normales de proestro y estro un diámetro medio de los folículos ovulatorios de 15-18 mm, regresión o ausencia de cuerpo lúteo y presencia de tono uterino, además de una duración media del ciclo estral de 19-21 días. Como estructuras quísticas fueron considerados aquellos folículos con un diámetro mayor de 20 mm y que persistieron durante 10 días o más, sin ovular y sin formación de cuerpo/s lúteo/s y en ausencia de tono uterino (Silvia y col., 2002; Bartolomé y col., 2005). Se determinó como primer día de formación del quiste al día en que el folículo superó los 20 mm de diámetro.

3.1.3.4. Obtención de muestras

La obtención de las muestras se realizó mediante ovariectomía bilateral a través de abordaje por flanco izquierdo (técnica anteriormente descrita). Previamente a la ovariectomía se obtuvieron diariamente muestras de sangre, desde el inicio del tratamiento con ACTH hasta el día de la ovariectomía, las cuales fueron utilizadas para caracterizar este modelo de inducción, estos trabajos y resultados formaron parte de otras investigaciones llevadas a cabo por nuestro grupo donde se caracterizaron numerosos aspectos de este modelo (Amweg y col., 2013).

3.1.4. Modelo de persistencia folicular

3.1.4.1. Animales

Este es un modelo original que fue desarrollado en esta tesis y para ello se utilizaron 20 vacas de la raza Holando Argentino, examinadas antes del comienzo de la experiencia para comprobar la normalidad en su tracto reproductor y regularidad de sus ciclos estrales, las que fueron alojadas en corrales adecuados para los trabajos a realizar y alimentadas con alimento balanceado comercial, heno de alfalfa y agua *ad libitum*.

3.1.4.2. Elección del protocolo de sincronización de celos.

Para la selección del protocolo de sincronización a utilizar se evaluaron las características de dos protocolos muy utilizados en la industria láctea: el G6G (de presincronización) y el ovsynch (de sincronización).

3.1.4.2.1. Protocolo ovsynch.

Si bien ya se ha descrito anteriormente, resumidamente el protocolo ovsynch (Pursley y col., 1995) consta de la aplicación el día 0 de una dosis de GnRH, siete días posteriores a ella se administra una dosis de PGF2 α y dos días después una última dosis de GnRH. En este protocolo, la primera aplicación de GnRH, es administrada en un estadio aleatorio del ciclo estral. La intención del primer aumento de LH inducido por GnRH es el de inducir la ovulación de un folículo(s) funcional maduro (Pursley y col., 1995). Las vacas con dos ondas foliculares tienen aproximadamente el 70% de probabilidades de que un FD funcional con capacidad de ovular esté presente en los ovarios en un estadio aleatorio del ciclo estral. La ovulación del FD induce el subsecuente inicio de una nueva onda de crecimiento folicular aproximadamente un día y medio después, seguida por el crecimiento y desarrollo de un nuevo FD y un CL accesorio. El nuevo FD tiene aproximadamente 97% de probabilidad de seguir funcional hasta el día 7, para posteriormente responder correctamente al pico de LH inducido por la última dosis de GnRH y así ovular. Pero las vacas también tienen aproximadamente un 30% de probabilidad de estar en estadios tempranos de desarrollo folicular (1 o 2 ondas) al inicio del tratamiento, momento en que sus células de la granulosa aún no han adquirido los receptores de LH suficientes para responder a un pico de LH (Garverick y col., 1985). En este caso, la primera GnRH no induce la ovulación y el potencial FD continúa creciendo, siendo desviado de los subordinados y desarrollándose como un FD. Si este folículo permanece funcional (80% de probabilidades) hasta el momento de la aplicación de la PGF2 α , podría continuar su desarrollo hasta un folículo preovulatorio y tener el 97% de probabilidades de que la ovulación se dé después de la GnRH final. Sin embargo, este folículo podría permanecer hasta casi 12 días desde el inicio de la onda. Por lo tanto, las tasas de concepción después de la ovulación de este folículo podrían ser atenuadas debido a la edad del folículo y del ovocito. Aproximadamente el 20% de estos folículos se vuelven atrésicos antes de la administración de PGF2 α , dando lugar al surgimiento de una nueva onda de crecimiento folicular generalmente justo antes de la PGF2 α , el nuevo FD no logra desviarse de los subordinados antes de la segunda GnRH.

3.1.4.2.2. Protocolo G6G.

Por lo dicho anteriormente, es importante el control del desarrollo y la ovulación del FD en respuesta a la primera GnRH del ovsynch para no sólo inducir un CL accesorio que aumente los niveles de P4 y los mantenga por 7 días hasta la aplicación de PGF2 α , sino también para controlar la edad del FD y con ello controlar la ovulación resultante del pico de LH inducido por la última dosis de GnRH, evitando de esta manera la asincronía de la ovulación anteriormente descrita. Para inducir la ovulación y la formación de un CL accesorio después de la primera GnRH del ovsynch las vacas deben ser pre-sincronizadas (antes del ovsynch) para asegurarse de que estén en el estadio del ciclo estral (día 6 o 7) en el que exista una alta probabilidad de ovulación del FD a la primera GnRH y la subsecuente luteólisis con PGF2 α el día 7 (no antes). Bello y col. (2006) demostraron que un buen método de pre-sincronización, es el protocolo denominado G6G, el cual consiste en la administración de una dosis de PGF2 α al inicio del protocolo, una dosis de GnRH dos días después y una segunda dosis de GnRH (primera GnRH del ovsynch) seis días después de la primera GnRH (figura 18). Si las vacas responden a este tratamiento y se encuentran en el día 6 del ciclo al momento de la primera GnRH del ovsynch, el 97% inducirán un CL accesorio, tendrán altas concentraciones de P4 y una mejor sincronización de la ovulación (Pursley y Martins, 2011).

De esta manera, este protocolo fue el que mejor se adaptó al planteo de un modelo de persistencia folicular *in vivo*, ya que nos permitió caracterizar con mínima dispersión entre animales el momento exacto de ovulación, brindando la posibilidad de trabajar con una gran sincronía de las ondas foliculares entre individuos y también posibilitar la determinación del comienzo de la persistencia folicular inducida con concentraciones intermedias de P4.

3.1.4.3. Grupos experimentales

El desarrollo del protocolo experimental se realizó en dos réplicas de manera tal de poder obtener muestras para la totalidad de los estudios que se realizaron.

Los animales destinados al desarrollo del protocolo experimental fueron aleatoriamente asignados en uno de 4 grupos. Los ciclos estrales de todos los animales fueron sincronizados utilizando el protocolo G6G-ovsynch, descrito anteriormente, con algunas modificaciones (Pursley y col., 1995; Bello y col., 2006), que consistió en la administración de 150 μ g de un análogo sintético de PGF2 α (Ciclar, Zoovet®) seguida de una segunda dosis

de PGF2 α a las 12 horas para asegurar una completa luteólisis (Hatler y col., 2008). Pasados dos días se administraron 20 μ g de un análogo sintético de GnRH (Buserelina, Zoovet®) y seis días después, correspondiéndose con el comienzo del ovsynch, se administró una segunda dosis de esta hormona. Siete días después, se inyectaron dos dosis de PGF2 α separadas por 12h, dando fin al protocolo de sincronización (figura 18). Después de esto, las vacas fueron divididas en cuatro grupos: Control (C; n=5), 5 días de persistencia folicular (P5; n=5), 10 días de persistencia folicular (P10; n=5), 15 días de persistencia folicular (P15; n=5).

Durante la primera réplica del ensayo los animales del grupo C fueron utilizados para determinar el momento esperado de ovulación que se definió como día 0 (D0) a través de la realización de ecografías seriadas y toma de muestras de sangre para mediciones hormonales. Sobre los animales de los grupos tratados se realizaron ecografías diarias y toma de muestras de sangre para distintas mediciones hormonales. En la segunda réplica del ensayo se realizaron aspirados foliculares, ovariectomías bilaterales y tomas de muestras de sangre en: los animales controles 48 hs después de la última PGF2 α (fase folicular) y a los 5, 10 y 15 días de persistencia en los animales de los grupos tratados.

A continuación se describen en detalle todas las actividades realizadas en las dos replicas del ensayo.

3.1.4.4. Protocolo de inducción de folículos persistentes

Los animales del grupo control no recibieron tratamientos adicionales. Los grupos P5, P10 y P15 fueron tratados con dispositivos de liberación prolongada de P4 para obtener niveles séricos subluteales de esta hormona según lo descrito por Bigelow y Fortune, (1998), hasta los 5, 10 y 15 días después del momento esperado de ovulación en controles (D0), respectivamente. Para ello se utilizaron dispositivos intravaginales de 750 mg de P4 (Pro-Ciclar P4, Zoovet®) colocados un día después de la última PGF2 α . Los dispositivos fueron mantenidos por 8 días momento en el cual fueron reemplazados por nuevos. Para evitar cambios bruscos en las concentraciones de P4 los nuevos dispositivos fueron introducidos un día antes de removido el dispositivo usado (figura 18).

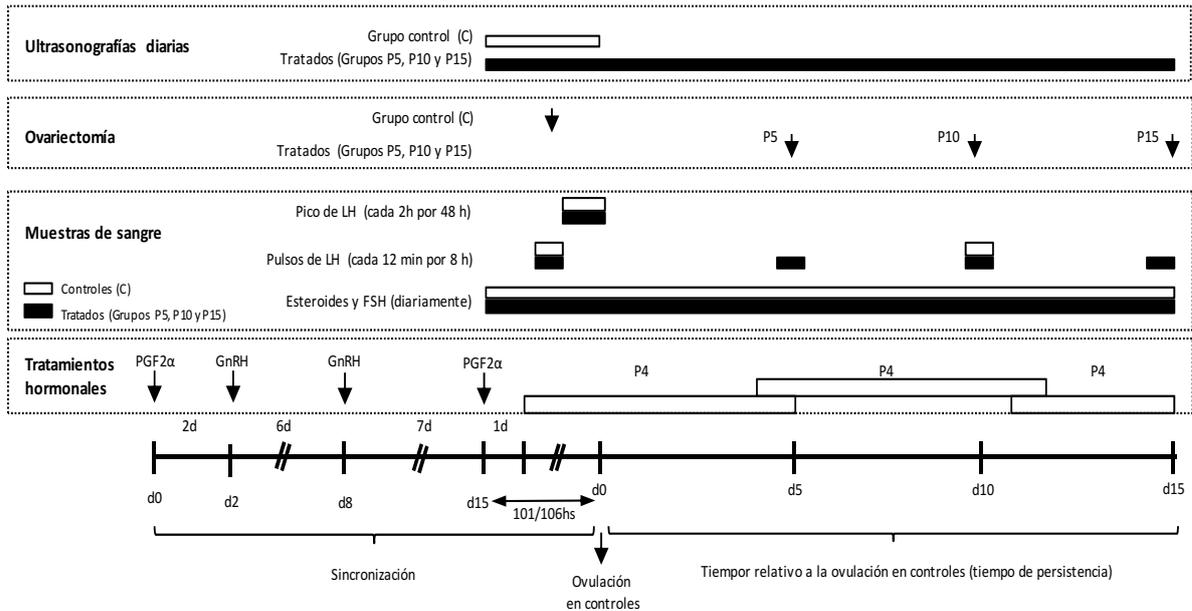


Figura 18: Diseño experimental para la inducción de persistencia folicular. Luego de la sincronización de celos, las vacas del grupo tratado recibieron un dispositivo intravaginal de liberación lenta de progesterona para inducir la persistencia folicular. La dinámica de desarrollo folicular fue monitoreada diariamente por ultrasonografía y los niveles en sangre de hormonas esteroideas y gonadotróficas fueron evaluados a los tiempos indicados en la figura. Las ovariectomías fueron realizadas en fase folicular en los controles y a los 5, 10 y 15 días de persistencia folicular en los animales tratados.

3.1.4.5. Monitoreo de los cambios ováricos

Los exámenes ecográficos de los ovarios fueron realizados sobre todos los animales, empleando un ecógrafo portátil equipado con un transductor lineal transrectal de 5 MHz HS101V (Honda, Tokio, Japón). La efectividad del protocolo de sincronización fue monitoreada por ultrasonografía los días 0, 2, 8 y 15. Además, se realizaron ecografías diarias desde el día de la última administración de PGF2 α hasta la ovulación en los animales controles o hasta los 5, 10 y 15 días de persistencia folicular en los animales tratados (figura 19). Mediante el monitoreo se caracterizaron el tamaño, el crecimiento y la regresión de todos los folículos mayores a 5 mm, incluyendo a los folículos persistentes, así como también los CLs (según corresponda).

3.1.4.6. Toma de muestras

3.1.4.6.1 Obtención de muestras de sangre

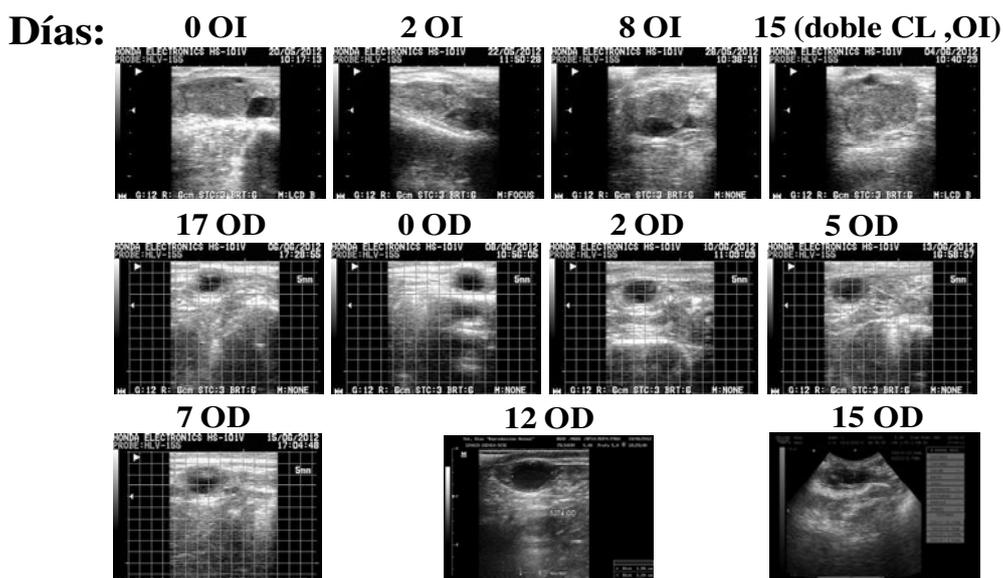


Figura 19: Secuencia de imágenes ecográficas que muestran el desarrollo folicular en un animal del grupo tratado (P15) hasta los 15 días de persistencia, que evolucionó hasta el estadio de quiste folicular. OI: Ovario Izquierdo, OD: Ovario Derecho, CL: Cuerpo lúteo.

Las vacas del grupo C fueron utilizadas para determinar el tiempo promedio de ovulación a través del seguimiento ultrasonográfico y la medición de niveles hormonales séricos. Asimismo, los animales de los grupos tratados fueron utilizados para determinar la falla en la ovulación y el establecimiento de la persistencia folicular.

Para las determinaciones de P4, E2, y FSH, las muestras de sangre fueron tomadas diariamente por punción de vasos coccígeos desde el día de la última aplicación de PGF2 α hasta el final del protocolo (día 15 de persistencia) en los animales controles y tratados (figura 18).

Para la evaluación del pico preovulatorio de LH, las muestras de sangre fueron colectadas cada 2 h por 48 h, desde las 56 h hasta las 104 h después de la primera inyección de PGF2 α en los grupos C y tratados. Para la determinación de la frecuencia pulsátil de LH las muestras de sangre fueron tomadas cada 12 min por 8 h, comenzando 48 h después de la primera inyección de PGF2 α en la fase folicular del ciclo estral (grupos C y tratados), a los días 5, 10 y 15 de persistencia (grupos P5, P10 y P15, respectivamente) y en el día 10 después de la ovulación, durante la mitad de la fase lútea (grupo C). Además, en el momento de la ovariectomía, se tomaron muestras de sangre de los grupos C, P5, P10 y P15 para determinar los niveles de E2, P4, 17-hidroxiprogesterona (17OHP4) y testosterona (figura 18).

3.1.4.6.2. Recolección y preparación de muestras de tejido ovárico

Previamente a la ovariectomía los folículos preovulatorios en el grupo control y los folículos persistentes en los grupos tratados fueron aspirados para la obtención de líquido folicular. Esta maniobra nos permitió no correr el riesgo de romper los folículos de interés con el manipuleo del ovario propio del procedimiento quirúrgico. Después de la aspiración folicular, el líquido obtenido fue refrigerado e inmediatamente transportado al laboratorio para su procesamiento.

La técnica de ovariectomía bilateral transvaginal (descrita anteriormente) fue realizada en el día esperado de ovulación en controles y al final del período de tratamiento para cada grupo tratado, los días 5, 10 y 15 de persistencia, relativos al momento esperado de ovulación (D0) (figura 18). Los ovarios obtenidos fueron destinados a la realización de exámenes histológicos y de determinación de las proteínas de interés. Tanto los ovarios, como las estructuras foliculares de interés fueron medidos y fotografiados. Luego se obtuvieron muestras de pared folicular de folículos preovulatorios controles y de folículos persistentes (P5, P10 y P15) para posteriores análisis de biología molecular.

3.2. Procesamiento de las muestras

Los distintos tipos de muestra provenientes de casos de COD espontánea a campo, de los modelos experimentales (COD inducida con ACTH y persistencia folicular) y de los animales controles fueron procesados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET). En la figura 20 se expone un esquema de las muestras que arribaron al laboratorio.

En el laboratorio, las muestras se procesaron con la finalidad de acondicionarlas para su posterior utilización en las distintas técnicas de biología molecular aplicadas en este trabajo.

a) Muestras de líquido folicular, obtenidas por aspiración folicular guiada por ecografía de COD espontánea a campo, de folículos persistentes y de folículos preovulatorios controles, o mediante aspirado con jeringa (1ml) y aguja (25G) en folículos intactos de

ovarios enteros obtenidos por ovariectomía (quísticos o controles). Una vez recolectado el líquido folicular fue centrifugado (ver punto siguiente) para separar las células foliculares contenidas en él. Luego, el líquido folicular fue conservado a -20°C y destinado a mediciones hormonales.

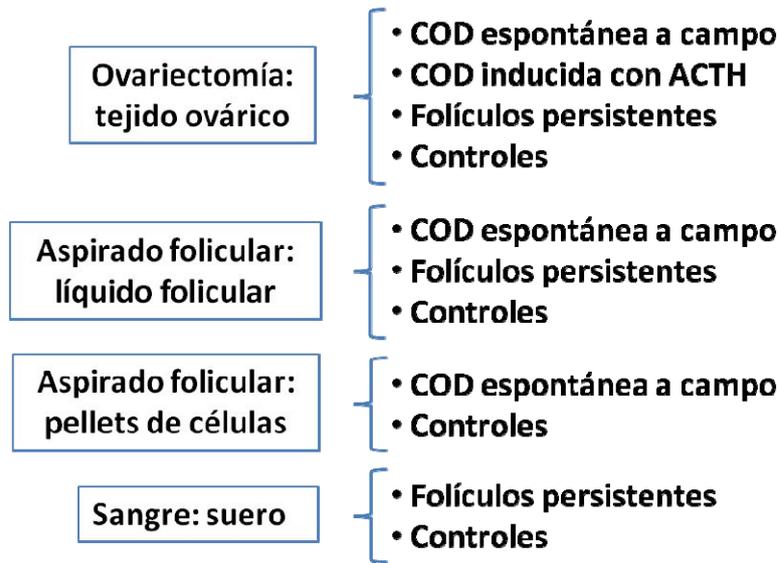


Figura 20: Esquema de la procedencia de las muestras destinadas a distintos estudios.

b) Muestras de pared folicular, tanto de quistes foliculares (espontáneos o inducidos con ACTH), de folículos persistentes, como de folículos preovulatorios (animales control) (Parrott y Skinner, 1998). Todas estas muestras fueron conservadas a -80 °C hasta su procesamiento (extracción de proteínas para la técnica de western blot).

c) Luego de la extracción de las muestras de pared folicular y de líquido folicular, los ovarios enteros obtenidos por ovariectomía fueron fijados en formaldehído bufferado (4%) durante 8-12 hs a temperatura ambiente y se procesaron siguiendo protocolos de rutina para su inclusión en parafina.

d) Las muestras de sangre fueron conservadas a temperatura ambiente (22-25 °C) por 30 min, luego colocadas a 4-8 °C por 1 h y finalmente centrifugadas a 1500g por 20 min. El suero así obtenido fue separado y conservado a -20 °C hasta el análisis de las hormonas contenidas en él.

3.2.1. Procesamiento del líquido folicular rico en células del a granulosa

El líquido folicular de animales con COD espontánea y controles luego de ser aspirado

y transportado en condiciones de refrigeración al laboratorio, fue centrifugado por 10 min a 2700g (centrifuga refrigerada IEC Multi RF, Thermo, USA) lográndose así separar el líquido folicular de las células contenidas en él, seguidamente el líquido folicular fue separado del pellet de células foliculares, siendo finalmente este último conservado a -80 °C. El destino de estas muestras fue el análisis de ARNm de interés.

3.2.2. Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas

Todas las muestras de tejidos obtenidas por ovariectomía fueron procesadas mediante técnicas histológicas de rutina. Luego de la fijación las muestras fueron lavadas en buffer fosfato salino (PBS) y procesadas siguiendo protocolos histológicos de rutina para efectuar la inclusión en parafina (Salvetti y col., 2010).

Se efectuaron cortes seriados de 4µm de espesor con un micrótopo rotativo, las que se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropil-triethoxisilane (Sigma, USA), y luego se secaron en estufa a 37°C durante 24 horas. Para hacer una caracterización inicial y evidenciar la morfología de las distintas estructuras ováricas se utilizó la coloración de hematoxilina-eosina.

3.2.3. Procesamiento de las muestras para western blot

Se tomaron fracciones de aproximadamente 60 mg de pared folicular de folículos antrales pequeños y grandes sanos, las que fueron colocadas en buffer RIPA (del inglés: *radioimmunoprecipitation assay buffer*) con inhibidores de proteasas, luego fueron homogeneizadas con un homogeneizador de mano Ultra Turrax®. El sobrenadante se obtuvo luego de centrifugar las muestras a 14.000g en centrifuga refrigerada durante 20 minutos. Una vez obtenidos los extractos de proteínas se determinó la concentración proteica de cada muestra mediante el método fluorimétrico (Quant-iT Protein Assay Kit, Qubit, Invitrogen, Nueva York, Estados Unidos). Previamente a las lecturas, se utilizó un patrón de referencia para realizar la curva de calibrado.

3.2.4. Procesamiento de las muestras para RT-PCR.

3.2.4.1. Purificación de ARN

El total de ARN fue aislado de pellets de células foliculares provenientes de las muestras de líquido folicular de los folículos preovulatorios controles y de quistes foliculares del grupo COD espontanea a campo, después del tratamiento con el reactivo TRIzol LS (Invitrogen, Life Technology, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Marelli y col., 2014).

3.2.4.2. Transcripción reversa

Para evitar la contaminación con ADN genómico, las muestras de ARN fueron tratadas con ADNasa (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las cadenas de ADN copia (ADNc) fueron sintetizadas usando una mezcla de reacción conteniendo MMLV (del inglés: *Moloney Murine Leukemia Virus*) buffer 5X, dithiothreitol (DTT, 100mM), inhibidor de ribonucleasas (40U/μl, RNaseOUT), retrotranscriptasa (MMLV, 200U), dioxiribonucleotidos trifosfatos (dNTP) y cebadores con secuencia al azar. Se utilizó para ello una cantidad constante de ARN y fueron utilizadas las siguientes condiciones para la transcripción reversa: 10 minutos a 25°C para el anillado, 50 minutos de síntesis de ADNc y 15 minutos a 70°C para la inactivación de la ADNasa. Todas las reacciones se llevaron a cabo para un volumen final de 20 μl utilizando un termociclador estándar (TC-3000, Techne Inc., NJ, USA).

3.3. Cuantificación de hormonas en suero y líquido folicular

Se determinaron los niveles séricos diarios de gonadotrofinas y de hormonas esteroideas en los grupos controles y de persistencia folicular. Las determinaciones hormonales para el modelo de inducción de COD mediante ACTH y COD espontanea fueron realizadas previamente y han sido publicadas por nuestro grupo de trabajo (Amweg y col., 2013).

Los niveles séricos de FSH y LH fueron determinados por radioinmunoensayo (RIA, del inglés: *radioimmunoassay*) usando kits provistos por NIDDK (USA), previamente descriptos y validados (Lacau-Mengido y col., 2000; Ortega y col., 2004) y realizados en el IBYME-CONICET (Buenos Aires). El coeficiente de variación intra e interensayo para FSH y LH fue menor al 8% y 12% respectivamente. El límite de detección fue de 0,16 y 1,18 ng/mL de suero para LH y FSH, respectivamente. La concentración de E2, P4 y testosterona en suero y líquido folicular fue medida por electroquimioluminiscencia inmunoensayo

(ECLIA del inglés: *electrochemiluminescence immunoassay*) utilizando kits (Roche Diagnostics GmbH, Germany) en un sistema COBAS e411 (Roche Diagnostics), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 5 pg/mL para E2, 0,03 ng/mL para P4 y 0,02 ng/mL para testosterona. Las concentraciones de 17OHP4 en suero y líquido folicular fueron medidas por RIA de competición sin extracción disponible comercialmente (Immunotech, Marseille, France) con una sensibilidad de 0,05 ng/mL. Para validar las pruebas de ECLIA y RIA para esteroides, pools de líquido folicular y suero de vacas ovariectomizadas fueron tratados con carbón para generar muestras libres de esteroides (McNeilly y col., 1991). Diluciones seriadas de E2, testosterona, P4 y 17OHP4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) fueron preparadas usando líquido folicular o suero libre de esteroides como diluyente. La recuperación de dichos estándares de esteroides que se agregaron a las muestras individuales antes del ensayo estuvo entre el 82% y el 96% para las muestras con alta concentración y entre 79% y 93% para las muestras con baja concentración. El coeficiente de variación intra- e interensayo fue <7 y <6% respectivamente.

3.4. Detección y cuantificación de miembros de la familia de las BMPs y AMH

3.4.1. Inmunohistoquímica simple

Mediante esta técnica se logró la identificación *in situ* y cuantificación de las siguientes proteínas: BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-1B y AMH en tejido ovárico de animales controles, con COD espontánea y de aquellos provenientes de los modelos experimentales, utilizando anticuerpos específicos disponibles comercialmente, detallados en la tabla 5.

Las inmunodetecciones se realizaron sobre cortes de 4 µm de espesor, siguiendo el protocolo descrito previamente por Salvetti y col. (2010), según se detalla a continuación:

- I-** Desparafinización en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 minutos cada uno.
- II-** Hidratación en una serie de alcoholes de graduación decreciente, a partir de etanol absoluto (dos pasajes de 3 minutos), etanol 96° (dos pasajes de 3 minutos) y finalmente etanol 70° (un pasaje de 3 minutos).
- III-** Hidratación en PBS pH 7,2 durante 5 minutos.

Tabla 5: Detalle de los anticuerpos primarios utilizados y las condiciones de uso en la técnica de inmunohistoquímica.

Anticuerpos primarios	Clon	Proveedor comercial	Dilución	Recuperación Antigénica
Ligandos				
BMP-2	Monoclonal	Abcam (ab6285)	1:75	Si
BMP-4	Policlonal	Abcam (ab39973)	1:350	No
BMP-6	Monoclonal	Abcam (ab15640)	1:150	Si
AMH	Monoclonal	Serotec (MCA2246T)	1:100	Si
Receptor				
BMPR-1B	Policlonal	Santa Cruz (sc-25455)	1:500	Si

IV- Tratamiento de recuperación antigénica. Se realizó en un horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 800W). Como solución de recuperación se usó buffer citrato 0,01M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en un coplin sumergido en un recipiente con agua, y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación: 3 minutos a 100% de potencia, 6 minutos al 40%, recarga del coplin con agua destilada, 6 minutos al 40 % y 20 minutos dentro del microondas apagado. Este tratamiento se utilizó para ciertos anticuerpos según se detalla en la tabla 5.

V- Bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa, sumergiendo las muestras durante 10 minutos en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto, agregando nuevamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno a los 10 minutos.

VI- Se realizaron dos lavados en PBS durante 5 minutos.

VII- Bloqueo de los sitios de unión no-específicos incubando 20 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda con una solución de suero normal de cabra al 5%, este procedimiento no se realizó para el receptor BMPR-1B.

VIII- Incubación con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C (en heladera): se usaron anticuerpos de interés en las diluciones adecuadas según la proteína a detectar (tabla 5). Para los controles de especificidad se sustituyó el anticuerpo primario por suero normal de cabra.

IX- Después de la incubación con el anticuerpo primario la cámara se retiró de la heladera y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

X- Se realizaron dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.

XI- Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado monoclonal o policlonal (según corresponda y en la dilución apropiada), o con el secundario Universal del kit Cytoscan HRP Detection System, durante 30 minutos a temperatura ambiente (tabla 6).

Tabla 6: Detalle de los anticuerpos secundarios utilizados, y las condiciones de uso en la técnica de inmunohistoquímica.

Anticuerpos secundarios	Proveedor comercial	Dilución	Grupos experimentales
IgG anti-rabbit biotinilado	LETH AM-B1	1:100	• COD inducida, espontánea, y control: BMP-4
IgG anti-mouse biotinilado	LETH AR-B1	1:100	• COD inducida, espontánea, y control: BMP-2, BMP-6
Secundario Universal	Cytoscan HRP-Detection System, Cell Mark	-	• COD inducida, espontánea y control: BMPR-1B • Persistencia folicular y controles: BMP-2, BMP-4, BMP-6 • Persistencia folicular, COD espontánea y controles: AMH

XII- Se realizaron dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.

XIII- Incubación con complejo streptavidina (Cytoscan HRP Detection System Cell Mark) o extravidina (SIGMA-dilución 1:200)-peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente.

XIV- Se realizaron dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.

XV- Revelado de la reacción con 3-3'-diaminobencidina (Kit DAB Plus, Invitrogen). Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y estandarizarlo.

XVI- Se realizaron dos lavados con agua destilada, 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.

En aquellos ensayos donde se empleó como anticuerpo primario a anti-BMP-4 se realizó una modificación a la técnica de rutina, omitiendo la recuperación antigénica.

Para la evaluación de BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMPR-1B en los grupos COD espontánea, COD inducida con ACTH y controles, se digitalizaron imágenes de cada una de las capas de la pared folicular de folículos primordiales, de transición, primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales pequeños y grandes, atrésicos y los folículos quísticos, estos últimos solamente en los grupos con COD espontánea e inducida con ACTH. En la determinación de la expresión de BMP-2, BMP-4 y BMP-6 en los grupos de persistencia folicular y controles, se digitalizaron imágenes de cada una de las capas de la pared folicular

de folículos primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales, atrésicos y los folículos persistentes, estos últimos solamente en los tres grupos de persistencia folicular (P5, P10 y P15). Finalmente, para determinar los niveles de expresión de AMH en los grupos de COD espontánea, persistencia folicular y controles, se digitalizaron imágenes de cada una de las capas de la pared folicular de folículos primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales, atrésicos y los folículos persistentes (en los grupos P5, P10 y P15) y folículos quísticos (en el grupo de COD espontánea).

3.4.2. Western blot

Esta técnica fue utilizada para la determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados. Se realizó la electroforesis en geles discontinuos de poli(acrilamida-bisacrilamida, 29:1) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). El tamaño del poro para el gel de resolución se correspondió con una concentración de acrilamida del 12% (BMP-6 y BMPR-1B) y del 15% (BMP-2 y BMP-4). Se utilizaron homogeneizados de pared folicular de folículos antrales medianos y grandes (Parrott y Skinner, 1998).

Se prepararon las muestras diluyendo 1:2 con buffer de muestra en condiciones reductoras para SDS-PAGE, y posteriormente se incubaron en baño termostático a 95°C por 5 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 mediante el método fluorimétrico (Quant-iT Protein Assay Kit, Qubit, Invitrogen, Nueva York, Estados Unidos), se sembraron 40 µg de proteínas y se realizó la electroforesis a 25 mA para el gel de apilamiento, y se continuó a 50 mA hasta la visualización del frente de corrida en el borde inferior del gel de resolución. Los marcadores de peso molecular (PM) que se utilizaron se detallan en la figura 21. Para la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de las proteínas separadas en el gel, se empleó la solución de transferencia tamponada Towbin modificada, compuesta por Tris-Glicina y 20 % de metanol. Dicha transferencia se realizó en frío, a 100V durante 2 horas y 30 minutos, 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 al lavado de la membrana y posterior guardado de la misma a 4-6°C hasta proceder a la inmunodetección de las proteínas detalladas en la tabla 7.

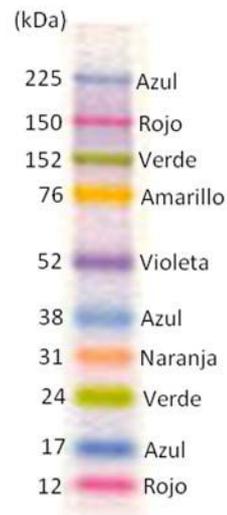


Figura 21: Marcadores de PM para SDS-PAGE, amplio espectro (Rainbow™, RPN800E, GE Healthcare)

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

- I-** Bloqueo los sitios de unión inespecíficos con TBS-T leche 5%, 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.
- II-** Lavado a temperatura ambiente en agitación (agitador orbital BOECO OS-10, Germany) con TBS-T.
 - Dos lavados rápidos
 - Un lavado de 15 minutos
 - Dos lavados de 5 minutos

Tabla 7: Detalle de los anticuerpos primarios utilizados en la técnica de western blot.

Anticuerpos primarios	Clon	Proveedor comercial	Dilución
Ligandos			
BMP-2	Monoclonal	Abcam (ab6285)	1:200
BMP-4	Policlonal	Abcam (ab39973)	1:800
BMP-6	Monoclonal	Abcam (ab15640)	1:150
Receptor			
BMPR -1B	Policlonal	Santa Cruz (sc-25455)	1:500

III- Incubación con el anticuerpo primario (tabla 7) durante toda la noche en heladera. Para la dilución del anticuerpo primario se utilizó buffer de bloqueo.

IV- Lavado a temperatura ambiente con TBS-T:

- Dos lavados rápidos
- Un lavado de 15 minutos
- Dos lavados de 5 minutos

V- Incubación con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Para la dilución se utiliza buffer de bloqueo. Los datos y las condiciones de uso de estos anticuerpos están descriptos en la tabla 8.

Tabla 8: Detalle de los anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de western blot.

Anticuerpos secundarios	Proveedor comercial	Dilución
IgG anti-mouse biotinilado	LETH AR-B1	1:1000
Goat anti-mouse IgG HRP	Santa Cruz (SC-2005)	1:600
Goat anti-rabbit IgG HRP	Santa Cruz (SC-2004)	1:7500

VI- Lavado a temperatura ambiente con TBS-T:

- Dos lavados rápidos
- Un lavado de 15 minutos
- Cuatro lavados de 5 minutos

VII- Preparar el reactivo quimioluminiscente (GE Healthcare), colocar la membrana en un recipiente con el reactivo e incubar 5 minutos.

VIII- Escurrir la membrana y colocarla entre dos hojas de papel celofán.

IX- Revelar la membrana en cuarto oscuro con los reactivos de revelado y fijado (Kodak); y placas radiográficas (GE Helthcare)

X- Lavado con agua destilada.

XI- Secado de la placa a temperatura ambiente.

Para la evaluación de BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMPR-1B fueron detectadas como bandas de 32-33 kDa, 47-50 kDa, 57 kDa y 50 KDa, respectivamente en muestras de pared de folículos antrales controles.

3.4.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Los niveles de AMH en suero y líquido folicular fueron cuantificados mediante un kit de ELISA comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante (AMH Gen II; Beckman Coulter, California, Estados Unidos). Previa a la realización del ensayo, todas las muestras de líquido folicular provenientes de folículos persistentes de los tres grupos (P5, P10 y P15), de folículos preovulatorios controles y de quistes espontáneos, se diluyeron 1:10 en suero fetal bovino. Las muestras de líquido folicular, de suero (sin diluir) así como los patrones fueron colocados en los pocillos de la placa, a continuación se colocó buffer de ensayo específico del kit y se incubó todo a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego del lavado, se colocó el anticuerpo conjugado con biotina y se incubó durante 1 hora. Finalmente, luego de los lavados correspondientes, se colocó estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa y se realizó una incubación durante 30 minutos. La reacción fue evidenciada mediante el revelado con una solución de TMB como cromógeno, el cual fue incubado durante 15 minutos. La reacción fue detenida por la incorporación de H₂SO₄ y se realizó la lectura a 450 nm con un lector de ELISA (Multiskan Lab Systems, Inc.). El límite de detección del kit es de 2 pg/ml; y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 8 y 4% respectivamente.

3.4.4. Análisis digital de imágenes

Se realizó el análisis digital de imágenes de cortes histológicos usando el programa informático Image Pro-Plus 3.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA). Las imágenes que se analizaron, fueron previamente obtenidas usando una cámara digital Nikon DS-Fi2 (Tokyo, Japan), acoplada a un microscopio óptico Nikon Eclipse Ni utilizando un objetivo de 40X de aumento. La resolución de las imágenes fue establecida en 1200 x 1600 píxeles.

El área inmunohistoquímicamente marcada se calculó a través de la segmentación de colores seleccionando los objetos con reacción marrón moderado/intenso (dada por la reactividad del cromógeno utilizado) como rango positivo. Dicha coloración fue elegida con una sensibilidad de 4 (máximo 5). Posteriormente fue aplicada una máscara para la separación permanente de los colores y se realizó un histograma para determinar el porcentaje del área marcada sobre el área total evaluada, tal como fue descrito en trabajos previos (Salveti y col., 2010).

En el protocolo de persistencia folicular el espesor de las capas de la granulosa y de la teca interna de los folículos preovulatorios y persistentes (groups P5, P10 y P15) fueron determinadas usando herramientas específicas del programa informático que acompaña a la cámara Nikon.

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.

3.4.5. Análisis de la expresión de ARNm de BMP-2, BMP-4 y BMP-6

3.4.5.1. Diseño de cebadores específicos, clasificación de las muestras y validación de las condiciones de la PCR en tiempo real

Basados en secuencias ya publicadas y utilizadas para la amplificación de fragmentos de ARN correspondientes BMP-2, BMP-4 y BMP-6, se diseñaron cebadores específicos (tabla 9). Para el diseño y posterior verificación de su especificidad, se utilizó la aplicación PrimerSelect del programa LASERGENE (DNASar, WI, USA). Todos los oligonucleótidos utilizados fueron provistos por Invitrogen. A su vez, la especificidad de los mismos se cotejó por comparación directa de su secuencia contra el genoma completo de *Bos taurus* mediante el uso del programa BLAST (del inglés: Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Por otro lado, se diseñaron cebadores para amplificar las secuencias codificantes de las enzimas CYP19A1 (específica de células de la granulosa) y CYP17A1 (específica de células de la teca) (Lagaly, 2008), siguiendo el procedimiento anteriormente detallado. Las reacciones de amplificación con estos cebadores permitieron determinar la presencia de ARNm específico de células de la granulosa y/o de células de la teca en las muestras de células foliculares obtenidas por aspiración folicular. A través de esta identificación las muestras pudieron ser clasificadas según la población celular existente dentro de ellas y sólo fueron destinadas a su análisis aquellas muestras de COD espontánea y controles que fueron positivas para CYP17A1 y CYP19A1 (células de la teca y células de la granulosa). También se emplearon cebadores específicos para amplificar el gen de expresión constitutiva correspondiente (β -actina) con el objeto de normalizar los niveles de expresión en relación al mismo. En este sentido, para validar las condiciones de las PCRs, se construyeron curvas estándares para BMP-2, BMP-4, BMP-6 y β -actina con diluciones seriadas de ADNc de pared

folicular completa. Estas curvas brindaron información útil para establecer el rango dinámico de trabajo y garantizar un rendimiento similar en la eficiencia de amplificación. Las reacciones de PCR presentaron eficiencias de 100,9% para BMP-2, 99,2% para BMP-4, 94,6% para BMP-6 y 93,44% para β -actina. En todos los casos, las reacciones de amplificación presentaron una alta linealidad con un $R^2 > 0,99$. La ausencia de artefactos producidos por productos no específicos y dímeros de cebadores fue chequeado por el análisis de la curva de melting.

3.4.5.2. PCR en tiempo real

Un protocolo optimizado de PCR en tiempo real fue usado para analizar la expresión de ARNm de BMP-2, BMP-4 y BMP-6, usando SYBR Green I (Invitrogen) (Pfaffl, 2001). La cantidad relativa de los ARNm de las distintas BMPs fue normalizada a una cantidad constante de ARNm del gen de referencia β -actina (Robinson y col., 2007), sin encontrarse diferencias significativas en la expresión génica entre los diferentes grupos evaluados ($p > 0,05$). La PCR fue realizada usando concentraciones definidas de cebadores *forward/reverse* detallados en la tabla 9.

Table 9: Pares de cebadores (secuencia de cebadores forward/reverse, 5'→3') usados para PCR en tiempo real.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	N° de GenBank	Longitud producto	Temperatura de anillado	Referencia
BMP-2 Forward Reverse	TGTCCAAACTCTGGTCAACTC CTCGACAACCATGTCCTGATAG	NM_001099141	142 bp	61.0 C°	Este estudio
BMP-4 Forward Reverse	GGCCGACCACCTCAACTCAA ACATCCCTCCACTACCATCTCCTG	NM_001045877	181 bp	58.0 C°	Este estudio
BMP-6 Forward Reverse	CGCCAGCGACACCAAAAGAGT CCCAGCAGAAACAGGTCGAGTC	XM_005192966	191 bp	58.0 C°	Este estudio
CYP17A1 Forward Reverse	GGAGGCGACCATCAGAGAAGTGC CAGCCGGGACATGAAGAGGAAGAG	NM_174304	319 bp	60.8 C°	Lagaly col., 2008
CYP19A1 Forward Reverse	TAAAACAAAGCGCCAATCTCTACG GGAACCTGCAGTGGGAAATGA	BTCYP19	341 bp	55.4 C°	Lagaly col., 2008
β-actin Forward Reverse	CGGAACCGCTCATTGCC ACCCACACTGTGCCATCTA	BT030480	290 bp	60 C°	Riollet col., 2001

BMP: proteína morfogénica de hueso. CYP17A1: citocromo P450 17hidroxilasa/17,20-liasa. CYP19A1: citocromo P450 aromataasa. For: Forward. Rev: Reverse. bp: pares de bases.

Cada reacción de PCR fue realizada por duplicado en un volumen total de 20 μ l, conteniendo 4 μ l de ADNc (500 ng/ml), 4 μ l de buffer de reacción Phire 5X, 0,5 μ l de cada 10 μ M de cebadores *forward/reverse*, 0,2 mM dNTPs, 1 μ l SYBR Green I (Invitrogen), 0,05 μ l Phire Taq polimerasa (Thermo Fisher Scientific Company, Finland) y 14 μ l de agua tratada con DEPC estéril.

Los niveles relativos de transcritos se midieron en un sistema StepOne Real Time PCR (Applied Biosystems, Life Technology, CA, USA) y se analizaron mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Las condiciones térmicas de los ciclos incluyeron: 40 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 5 segundos (s), anillado a 61 °C (BMP-2), 58 °C (BMP-4 y BMP-6) y 60 °C (β -actina) por 20 s y extensión a 72 °C por 25 s. Fue realizado un solo paso inicial de desnaturalización a 98 °C por 3 minutos y un paso de extensión final a 72 °C por 10 minutos.

La eficiencia de las PCRs y las cantidades relativas fueron evaluadas a través de una curva estándar de 6 puntos. Estas curvas fueron construidas con una serie de diluciones de un pool de ADNc. La eficiencia fue calculada usando el programa informático StepOne v2.2 (Applied Biosystems).

Los niveles de expresión de los genes se analizaron según los valores de sus *Cts* (ciclo umbral, del inglés: *cycle threshold*) los que fueron calculados por el software StepOne v2.2 (Applied Biosystems). Dicho valor corresponde al ciclo en el que la señal de fluorescencia puede ser detectada como valor de corte o umbral. La pureza de los productos fue establecida por curvas de disociación, y muestras aleatorias fueron destinadas a la construcción de un gel de agarosa para verificar el tamaño de los productos.

3.4.5.3. Secuenciación de nucleótidos

La especificidad de los productos de las PCRs fue confirmada por secuenciación de ADN usando el servicio de MacroGen Sequencing Service (MacroGen, Korea). Los oligonucleótidos cebadores y los productos amplificados fueron luego testeados a través de la herramienta BLAST, para confirmar la especificidad de los genes y para determinar la ubicación de los nucleótidos, asegurándonos así que ellos no fueron diseñados desde alguna región homóloga que codifique para otros genes. En este sentido, los productos de la PCR presentaron una homología del 97-99% con la secuencia de referencias para *Bos taurus*.

3.5. Evaluación estadística

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 11.0.1 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Antes de iniciar el análisis estadístico se comprobó la normalidad de la población de datos evaluados y homogeneidad de la varianza mediante las herramientas disponibles en el programa SPSS 11.0.1.

La frecuencia y amplitud de los pulsos de LH fueron caracterizadas de una manera similar a la usada por D'Occhio y col. (1982). La concentración basal fue calculada utilizando valores que no hayan estado asociados a porciones ascendentes o descendentes de los pulsos. Una muestra fue definida como un pico (inicio de un pulso) si: 1) el valor fue al menos un 40% mayor que el de la muestra precedente y 2) este haya sido seguido por al menos dos valores sucesivos decrecientes o que representen valores basales. La amplitud de los pulsos fue determinada restando al valor más alto asociado con un pulso el valor basal precedente (concentración del pulso) (Brown y col., 1986).

La frecuencia y amplitud de los pulsos de LH y los datos morfométricos fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA), seguido de un post-test de Duncan para comparaciones múltiples. El nivel de significancia utilizado para ANOVA fue $p < 0,05$.

Las concentraciones séricas de E2, P4 y FSH en los animales controles y tratados durante todo el período experimental fueron analizadas mediante un ANOVA de dos vías para determinar los efectos del tiempo y el tratamiento, así como también la interacción entre el tratamiento por el tiempo. Los niveles hormonales en suero y líquido folicular en los distintos grupos de animales (persistentes y controles) al momento de la toma de muestras, fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan. El nivel de significancia utilizado para ANOVA fue $p < 0,05$. El coeficiente de Pearson fue usado para analizar en el modelo de persistencia la posible correlación entre las concentraciones en suero y líquido folicular de los diferentes esteroides al momento de la ovariectomía. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media (EEM).

Para evaluar la expresión proteica mediante inmunohistoquímica, se realizó un análisis de la varianza de los datos aplicando pruebas paramétricas para varios grupos (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan. Se analizaron por separado las estructuras foliculares análogas (folículos primordiales, de transición, primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales pequeños y grandes, atrésicos, persistentes y quísticos) de cada

grupo en estudio. También se compararon los quistes (inducidos o espontáneos) o folículos persistentes (P5, P10 y P15) con los folículos antrales y atrésicos del grupo control (como estructuras similares de referencia). Además, se evaluó el comportamiento de la expresión proteica a lo largo de la foliculogénesis dentro de cada grupo en estudio. La comparación entre dos grupos de muestras se realizó mediante la prueba *t-Student*. El nivel de significancia utilizado para ANOVA fue $p < 0,05$. Los valores se expresaron como el promedio \pm el desvío estándar (DE).

Finalmente, la evaluación de AMH en líquido folicular se realizó mediante ANOVA para los grupos de persistencia folicular, animales con COD y animales controles. Como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan. El nivel de significancia utilizado para ANOVA fue $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Resultados de procedimientos efectuados con animales

4.1.1. Diagnóstico y obtención de muestras provenientes de casos de COD espontánea.

Se obtuvieron ovarios con quistes espontáneos de 11 vacas Holando Argentino en lactancia. Mediante ultrasonografía y tacto rectal pudo determinarse que todas las vacas diagnosticadas con COD espontánea presentaban folículos únicos o múltiples, con una pared folicular de un espesor menor a 3 mm, ausencia de cuerpo lúteo y falta de tono uterino. Microscópicamente pudo observarse que se trataba de quistes foliculares. También fueron observados folículos en varios estadios de desarrollo incluyendo folículos primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales pequeños, antrales y atrésicos y, en todos los casos, ausencia de tejido luteal activo. Las capas de células de la granulosa y de la teca de los quistes presentaron células aparentemente sanas, sin procesos degenerativos. No fue posible determinar la persistencia de los folículos quísticos en estas vacas de manera exacta, pero se estima en más de 10 días debido a la falta de tono uterino a la palpación rectal (Bartolomé y col., 2005). A nivel microscópico, este hecho quedó reflejado en la capa de células de la granulosa, donde algunos quistes presentaron ausencia parcial o total de dicha capa debido al envejecimiento folicular como consecuencia de una persistencia muy prolongada. Cabe aclarar que las evaluaciones histológicas e inmunohistoquímicas se realizaron solamente en los folículos quísticos que presentaban células de la granulosa.

Se recabó información completa sobre cada animal: 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. Dichos datos fueron destinados a estudios paralelos a la presente tesis.

4.1.2. Modelo de inducción de quistes mediante ACTH

Las determinaciones hormonales y la caracterización morfológica de los ovarios provenientes del modelo experimental, fueron presentadas en una tesis anterior (Salveti, y col., 2010) y publicados en revistas de alto impacto (Amweg y col., 2013). La inducción exitosa de COD mediante la administración de ACTH fue confirmada por el seguimiento de

la morfología ovárica y la determinación de hormonas. Todos los animales tratados con ACTH respondieron a dicho tratamiento con la formación de un quiste folicular con una capa completa de células de la granulosa.

4.1.3. Modelo de persistencia folicular inducida mediante P4

4.1.3.1. Ultrasonografía y dinámica de los folículos persistentes.

Durante el protocolo descrito fue posible evidenciar el desarrollo de folículos de hasta 15 días de persistencia en el 95% de los animales tratados. Con el análisis de las imágenes ecográficas se pudo verificar el correcto funcionamiento del protocolo hormonal, corroborar la dinámica folicular y la ovulación (controles) y monitorear la persistencia folicular (tratados) durante todo el protocolo.

En todos los animales, al momento de la última inyección de PGF2 α , se detectó un único folículo dominante. El diámetro promedio de los folículos preovulatorios en los animales controles durante el último examen ultrasonográfico antes de la ovulación fue de 17,6 \pm 0,3 mm. Este folículo ovuló aproximadamente cuatro días después de la última inyección PGF2 α . En los animales experimentales el tratamiento con progesterona de larga duración permitió la persistencia de los folículos preovulatorios de 12,6 \pm 3,0 mm de diámetro al inicio del proestro y de 15,6 \pm 1,8 mm de diámetro, 24 h antes del día 0 (momento esperado de ovulación en controles). Estos folículos establecieron su persistencia con un tamaño de 16,3 \pm 3,0 mm en el día 0, llegando a 18,3 \pm 2,1 mm a los 5 días y a 18,0 \pm 3,6 mm el día 10 de persistencia. La inducción exitosa de folículos persistentes fue confirmada, por la ausencia de la ovulación del folículo dominante y el incremento en su diámetro a través de los 15 días del tratamiento con P4. Un incremento significativo en el diámetro de los folículos persistentes fue detectado en el día 11 y también en los siguientes días del tratamiento con P4. En el día 15 de persistencia (15 días después de la ovulación en controles), el diámetro de los folículos persistentes alcanzó un promedio de 23,0 \pm 0,6 mm (figura 22). A la ultrasonografía, los folículos persistentes aparecen como estructuras esféricas, uniformes, no ecogénicas, con una pared delgada de \leq 3 mm de espesor, acompañados de ausencia total de tonicidad uterina (figura 22).

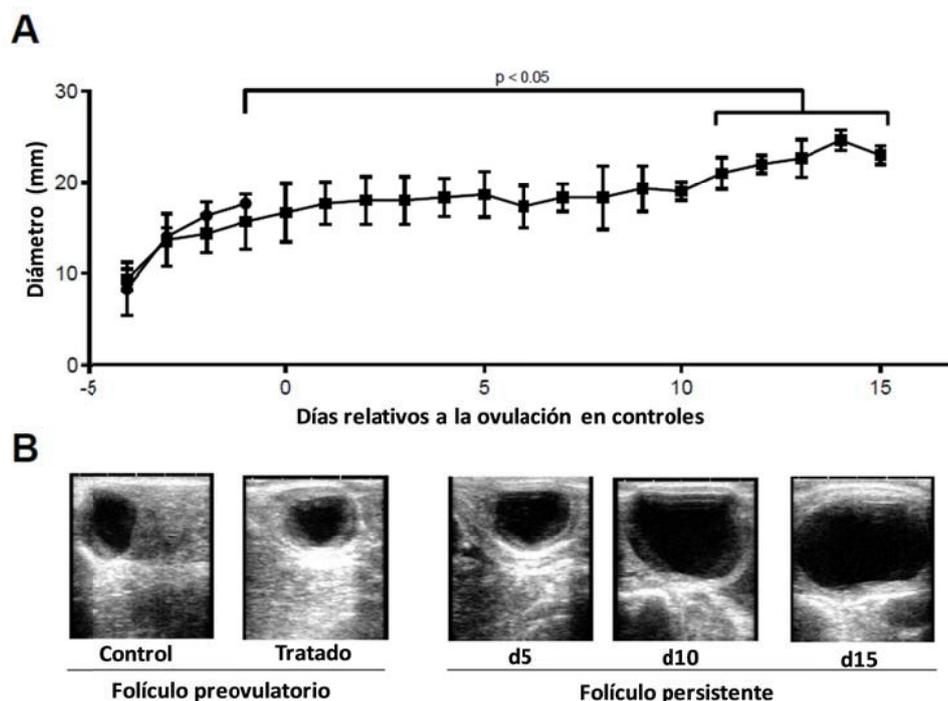


Figura 22: (A) Máximo diámetro del foliculo dominante y del foliculo persistente en vacas controladas (●) y tratadas (■), respectivamente. Se muestran las medias (\pm EEM) del diámetro folicular interno y las diferencias con el foliculo preovulatorio de controladas. (B) Fotos seleccionadas de ultrasonidos de foliculos preovulatorios en vacas controladas y tratadas, y de foliculos con 5, 10 y 15 días de persistencia folicular de las vacas tratadas.

4.1.3.2. Efectos de dosis bajas y constantes de P4 sobre la morfología folicular

Al análisis microscópico de los cortes histológicos de ovarios de los animales controlados presentaron foliculos normales en todos los estadios de desarrollo y atresia. El CL estuvo ausente en todos los casos (figura 23). Los ovarios de las vacas tratadas presentaron estructuras en todos los estadios de crecimiento y desarrollo, incluyendo foliculos primordiales, de transición, primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales pequeños y grandes (en adelante denominados simplemente como foliculos antrales), foliculos con diferentes grados de atresia y un único y gran foliculo persistente. En los animales tratados, igual que en los controlados, el CL estuvo ausente en todos los casos. Todos los foliculos persistentes presentaban una capa de células de la granulosa con diferentes grados de conservación, una teca interna muy vascularizada y una teca externa muy rica en colágeno. Microscópicamente, a medida que la persistencia folicular fue progresando, las capas de células de la granulosa mostraron una gran proporción de células con apoptosis y una pérdida de las células cercanas al antro, las cuales se presentaron frecuentemente separadas de la capa de células de la granulosa, muchas veces flotando dentro de la cavidad antral. Sin embargo,

una alta proporción de células de la granulosa de la zona basal mantuvieron su integridad y salud.

Los pliegues frecuentemente presentes en la pared de este tipo de folículos, conservaban ambos tipos de células. Además, en algunas áreas de estos folículos, la membrana basal fue poco evidente. Sumado a esto, no se observaron signos de luteinización en las capas de células de la granulosa y teca en ninguno de los folículos persistentes de todos los grupos tratados.

Es importante remarcar que el espesor promedio de la capas de células disminuyó con el tiempo de tratamiento ($p < 0,01$), presentándose al día 15 de persistencia menor espesor tanto en la capa de células de la granulosa como de la teca en relación a los folículos preovulatorios controles ($p < 0,05$) (figura 23).

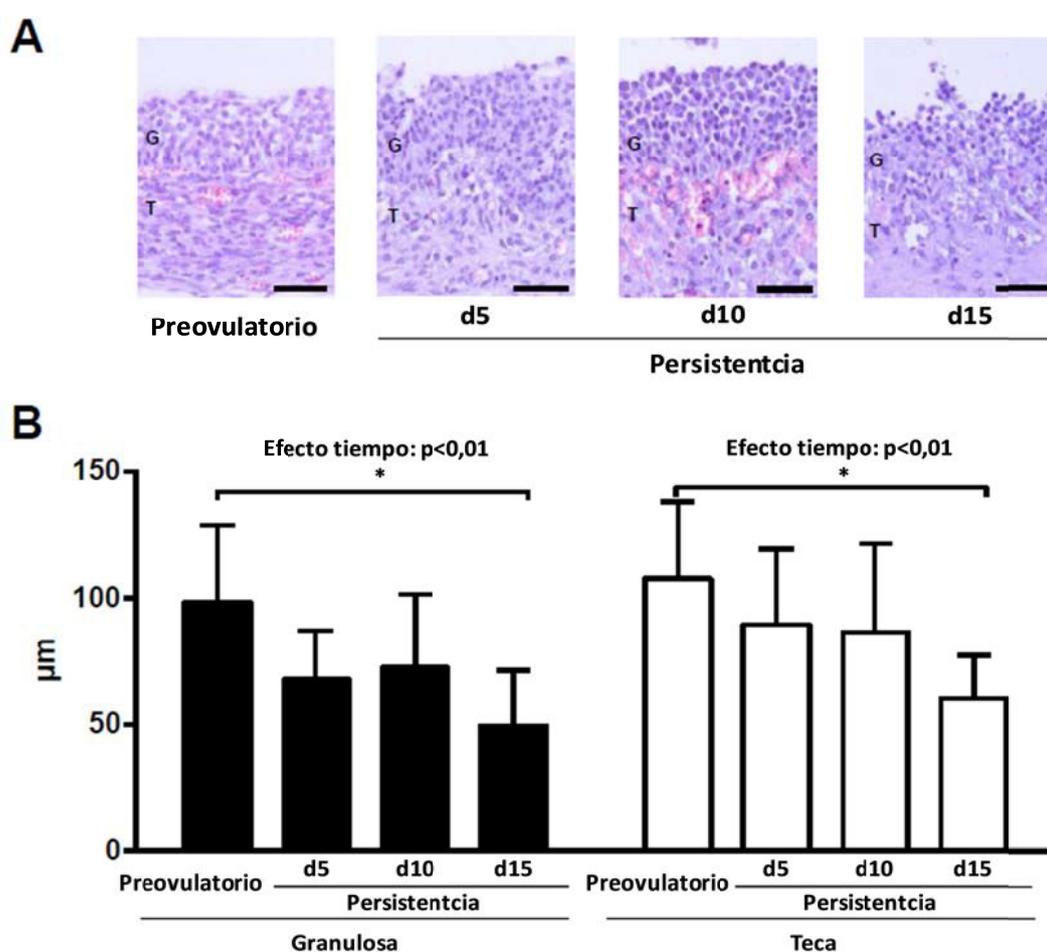


Figura 23: Imágenes microscópicas representativas (A) y análisis histomorfométrico (B) del espesor de la pared folicular de folículos preovulatorios controles y de folículos con 5, 10 y 15 días de persistencia. Se observó un efecto significativo del tiempo ($p < 0,01$) sobre el espesor de ambas capas de células, y una disminución en el espesor de las capas de células de la granulosa y teca interna hacia el día 15 de persistencia en relación a los folículos preovulatorios controles ($p < 0,05$). Los valores representan la media \pm EEM. G: granulosa; T: teca. Barras = 50 μ m.

4.1.3.3. Efectos de dosis bajas y constantes de P4 sobre las concentraciones séricas de E2, P4 y FSH

Se observaron cambios temporales en las concentraciones de E2, P4 y FSH desde el día de la última inyección de PGF2 α hasta la ovulación (grupo control) y hasta el día 15 de persistencia folicular (grupos tratados) (efecto del tiempo, $p < 0,01$). También se observó un efecto del tratamiento sobre las concentraciones de E2 y P4 ($p < 0,001$). Además, se evidenció una interacción significativa entre el tratamiento y el tiempo para ambas hormonas esteroideas ($p < 0,001$) (figura 24). Las concentraciones de E2 fueron mayores en los animales tratados en relación a los controles desde el día 2 hasta el final del período experimental. Después de la ovulación, las concentraciones de E2 decrecieron en los animales controles, mientras que en los animales tratados continuaron incrementándose significativamente hasta el día 10 de persistencia, para luego disminuir y mantenerse en valores constantes, aunque siempre significativamente mayores que aquellos encontrados en los controles (figura 24).

En los animales tratados, los valores de P4 permanecieron aproximadamente en 2 ng/ml desde el día 0 hasta el final del experimento, mostrando pequeños aumentos coincidentes con el intercambio de los dispositivos intravaginales de P4 usados por unos nuevos. En los animales controles, desde el día 5 las concentraciones de P4 se incrementaron significativamente debido a la formación de un CL luego de la ovulación (figura 24).

La concentración de FSH, no mostró diferencias entre los grupos tratados y controles ($p > 0,05$). En el grupo control las concentraciones de FSH mostraron incrementos correspondientes con la aparición de cada nueva onda de crecimiento folicular (día 6 y día 13) (figura 24).

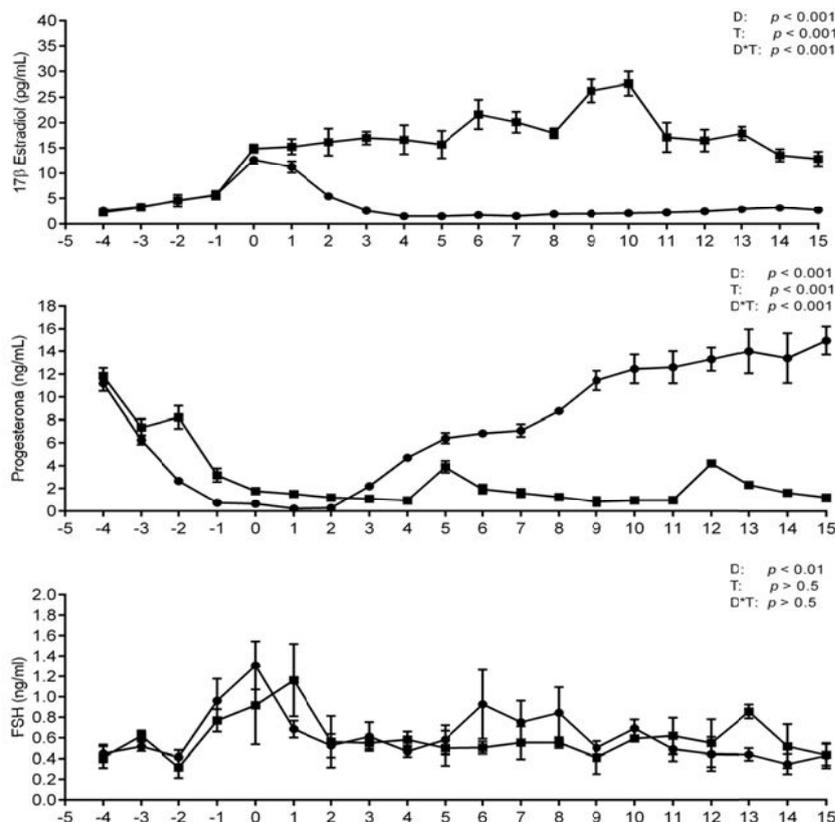


Figura 24: Concentraciones séricas de E2, P4 y FSH en vacas controles (●) y tratadas (■). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. Los datos fueron analizados de acuerdo al tiempo de ovulación en controles (día 0). D: efecto de los días de protocolo experimental; T: efecto del tratamiento; D*T: interacción entre días de protocolo experimental y tratamiento.

4.1.3.4 Efectos de dosis bajas y constantes de P4 sobre la pulsatilidad y el pico preovulatorio de LH.

El tratamiento con P4 inhibió completamente el pico preovulatorio de LH en los animales de los grupos tratados. En cambio, el pico sí fue observado en los animales controles entre las 70 a 80 h después de la inyección de PGF2 α (figura 25). En la figura 26 se muestran perfiles representativos de las frecuencias de pulsos de LH a diferentes tiempos en animales controles y tratados con P4.

En la tabla 10, se representan la concentración basal, la frecuencia pulsátil, la amplitud y la concentración de los pulsos de LH a diferentes tiempos, en animales controles y tratados.

La concentración basal de LH fue más baja ($p < 0,05$) en la fase folicular de los controles (0,195 \pm 0,004 ng/ml) que en la misma fase en los animales tratados (0,242 \pm 0,008 ng/ml). En estos últimos, las concentraciones basales se mantuvieron bajas a los 5, 10 y 15 días de persistencia (0,139 \pm 0,007 ng/ml; 0,167 \pm 0,006 ng/ml y 0,157 \pm 0,008 ng/ml,

respectivamente), siendo similares a las encontradas en la fase lútea media de los controles (0,137 +/- 0,009 ng/ml).

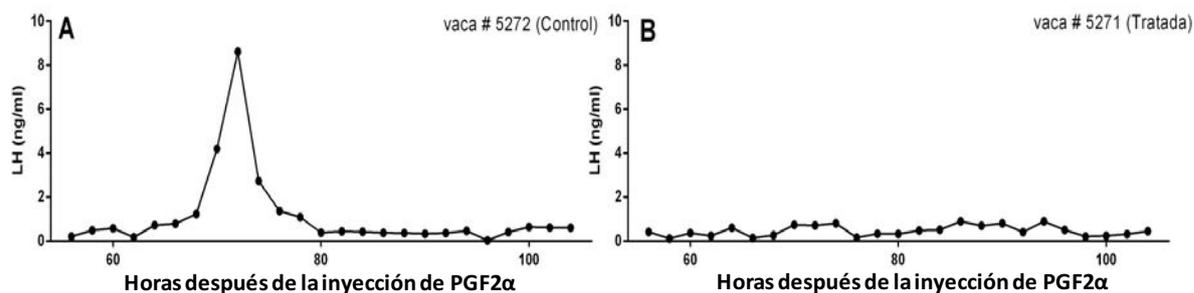


Figura 25: Perfiles representativos de LH, se observa la aparición del pico de LH en vacas controles (A) y la ausencia del mismo en las vacas tratadas con P4 (B). Las muestras de sangre fueron tomadas cada 2 h por un total de 48 h, desde las 56 h hasta las 104 h posteriores a la inyección de PGF2 α .

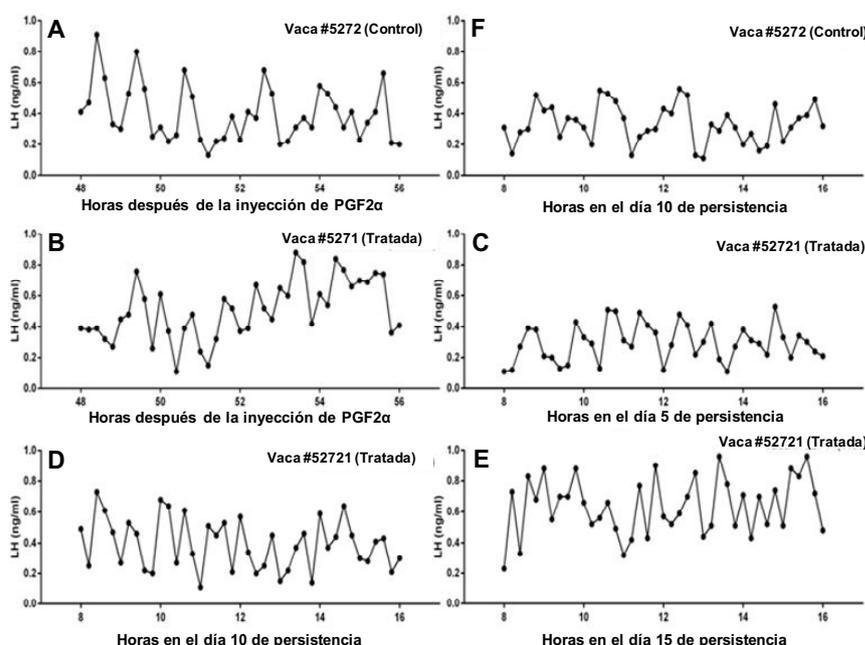


Figura 26: Se muestran perfiles representativos de la frecuencia pulsátil de LH. Las muestras de sangre fueron tomadas cada 12 min por 8 h, comenzando 48 h después de la PGF2 α para la fase folicular (A, B), al día 5, 10 y 15 de persistencia folicular (C, D, E, respectivamente) y en el día 10 después de la ovulación, durante la mitad de la fase lútea (F).

Durante la fase folicular, la frecuencia pulsátil de LH fue relativamente alta, y fue similar tanto en vacas controles (7 +/- 0,52 pulsos/8 h) como en tratadas (6,4 +/- 0,24 pulsos/8 h). En los controles, la frecuencia pulsátil se redujo durante la fase lútea media ($p < 0,05$) (3,2 +/- 0,21 pulsos/8 h), mientras que en las vacas tratadas, la frecuencia pulsátil se mantuvo alta a los 5 y 10 días de persistencia (8 +/- 0,44 pulsos/8 h y 6,2 +/- 0,2 pulsos/8 h, respectivamente). Sin embargo esta alta frecuencia de pulsos se redujo significativamente ($p < 0,05$) a los 15 días de persistencia (2,2 +/- 0,02 pulsos/8 h).

La concentración de los pulsos de LH fue mayor en la fase folicular de animales controles (0,763 +/- 0,019 ng/ml) y tratados (0,705 +/- 0,029 ng/ml), con una reducción

significativa ($p < 0,05$) tanto en el periodo de persistencia folicular en tratados, como durante la fase lútea media en controles.

El promedio de la amplitud de los pulsos de LH fue más alto ($p < 0,05$) en la fase folicular de las vacas controles ($0,562 \pm 0,029$ ng/ml) y tratadas ($0,478 \pm 0,033$ ng/ml), que en la mitad de la fase lútea de las controles ($0,352 \pm 0,006$ ng/ml) y que a los 5 ($0,332 \pm 0,023$ ng/ml), 10 ($0,388 \pm 0,025$ ng/ml) y 15 ($0,399 \pm 0,007$ ng/ml) días de persistencia en los animales tratados.

Table 10: Promedios de la concentración basal, frecuencia pulsátil, concentración y amplitud de los pulsos de LH durante la fase folicular y lútea media en controles y a los 5, 10 y 15 días de persistencia en los animales tratados con P4.

	Concentración basal (ng/ml)	Frecuencia de los pulsos (pulsos/8 h)	Concentración de los pulsos (ng/ml)	Amplitud de los pulsos (ng/ml)
Animales Control				
Fase folicular	$0,195 \pm 0,004^b$	$7,00 \pm 0,52^{b,c}$	$0,763 \pm 0,019^c$	$0,562 \pm 0,019^c$
Fase lútea media	$0,137 \pm 0,009^a$	$3,20 \pm 0,21^a$	$0,468 \pm 0,015^a$	$0,352 \pm 0,006^a$
Animales tratados				
Fase folicular	$0,242 \pm 0,008^c$	$6,40 \pm 0,24^b$	$0,705 \pm 0,029^b$	$0,478 \pm 0,033^b$
5 días de persistencia	$0,139 \pm 0,007^a$	$8,00 \pm 0,44^c$	$0,477 \pm 0,026^a$	$0,332 \pm 0,023^a$
10 días de persistencia	$0,167 \pm 0,006^{a,b}$	$6,20 \pm 0,20^b$	$0,573 \pm 0,022^a$	$0,388 \pm 0,025^a$
15 días de persistencia	$0,157 \pm 0,008^a$	$2,20 \pm 0,02^a$	$0,522 \pm 0,025^a$	$0,399 \pm 0,007^a$

Los valores representan la media \pm EEM y las diferencias significativas se expresan con diferentes letras ($p < 0,05$).

4.1.3.5. Niveles de hormonas esteroides en suero y líquido folicular al momento de la toma de muestras.

En la figura 27 se muestran los niveles de E2, P4, 17OHP4 y testosterona en suero y líquido folicular de animales tratados con P4 y controles al momento de la ovariectomía.

Los niveles de E2 séricos se incrementaron gradualmente desde el proestro hasta el día 10 de persistencia, para luego reducirse a valores similares a aquellos encontrados en el proestro ($p < 0,05$). Las vacas con 5 días de persistencia folicular tuvieron una concentración significativamente mayor de P4 en suero ($p < 0,05$) en comparación a los grupos P15 y controles en proestro. A su vez, la 17OHP4 presentó una reducción significativa a los 5 días de persistencia en relación con el proestro y también con los 10 días de persistencia ($p < 0,05$),

mostrando a los 15 días de persistencia un aumento significativo en sus concentraciones ($p < 0,05$). Los niveles de testosterona mostraron un incremento significativo ($p < 0,05$) desde el proestro y los 5 días de persistencia hasta el día 15 de persistencia.

Las concentraciones de E2 fueron relativamente mayores en muestras tomadas en el líquido folicular, durante la fase folicular y después de 5 y 10 días de persistencia, en comparación a aquellas muestras tomadas a los 15 días de persistencia ($p < 0,05$). Las concentraciones de P4 fueron más altas en el líquido folicular de folículos preovulatorios ($p < 0,05$) que en el de folículos persistentes. Los niveles 17OHP4 se incrementaron progresivamente durante todo el periodo experimental desde la etapa de folículo preovulatorio hasta los 15 días de persistencia ($p < 0,05$). La concentración de testosterona fue relativamente menor en los folículos preovulatorios y se mantuvo baja hasta los 10 días de persistencia, siendo significativamente mayor a los 15 días de persistencia ($p < 0,05$).

Se observó una correlación significativa entre las concentraciones en suero y líquido folicular de testosterona ($r = 0,782$, $p < 0,0001$) y no significativa para E2 ($r = 0,292$, $p = 0,211$) y P4 ($r = 0,253$, $p = 0,280$). Para 17OHP4, se observó una correlación con tendencia relevante ($r = 0,399$, $p = 0,081$) entre las concentraciones de esta hormona en suero y líquido folicular.

4.2. Localización y expresión de BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-1B.

4.2.1. BMP-2

4.2.1.1. Expresión génica en los grupos COD espontánea y control.

El ARNm de BMP-2 fue detectado débilmente en todas las muestras de células foliculares evaluadas. En este sentido, un 60% de las muestras expresaron este gen fuera del rango dinámico de trabajo, por lo que no se pudo realizar la cuantificación correspondiente.

4.2.1.2. Expresión proteica y localización en los grupos COD espontánea, COD inducida con ACTH y control.

Para obtener información con respecto a la localización de BMP-2 en las diferentes estructuras foliculares, su expresión fue evaluada mediante inmunohistoquímica y un

posterior análisis semicuantitativo de imágenes. BMP-2 fue localizada en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todos los tipos de folículos y grupos analizados.

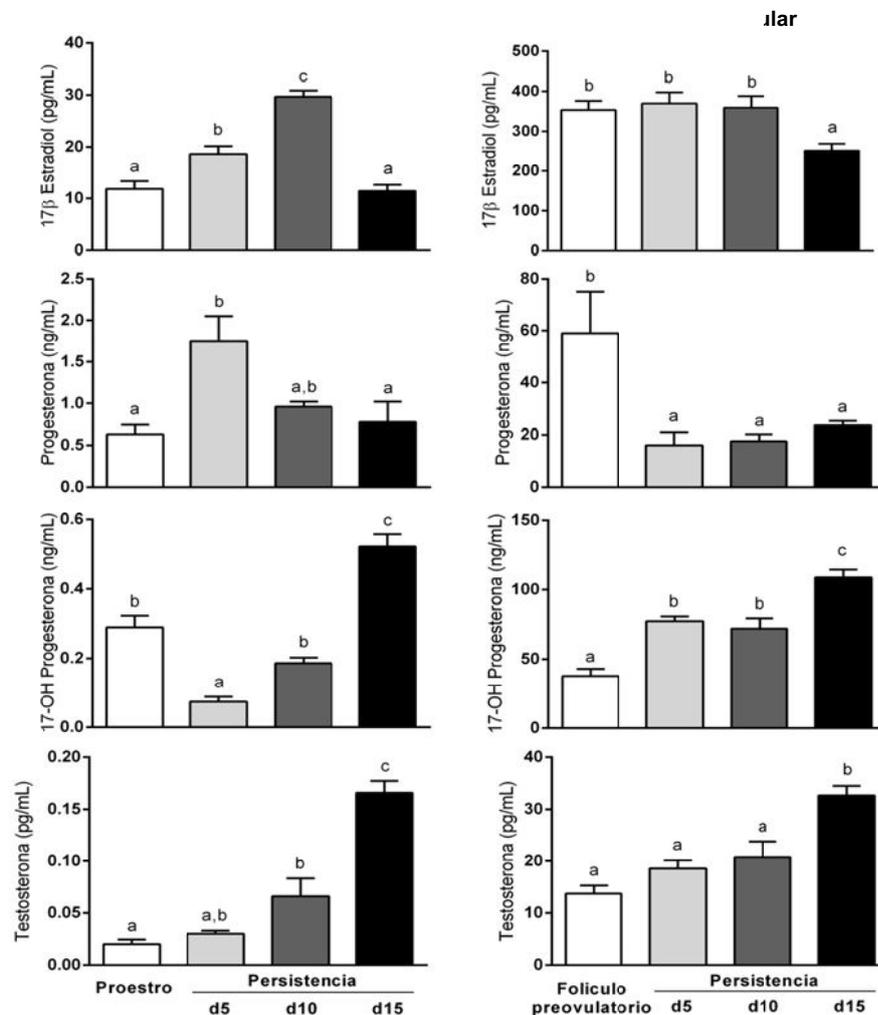


Figura 27: Concentraciones de E2, P4, 17OHP4, y testosterona en suero y líquido folicular al momento de la ovariectomía. Las barras representan las medias \pm EEM para cada hormona en suero o líquido folicular. Las barras con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En los animales controles, se observó una expresión similar tanto en las células de la granulosa como en las de teca interna de todas las categorías foliculares, con una mayor expresión en la granulosa de folículos antrales y atrésicos con respecto a los folículos preantrales grandes. En la capa de células de la teca interna los folículos antrales pequeños presentaron una menor expresión que los folículos atrésicos (figura 28 y 33).

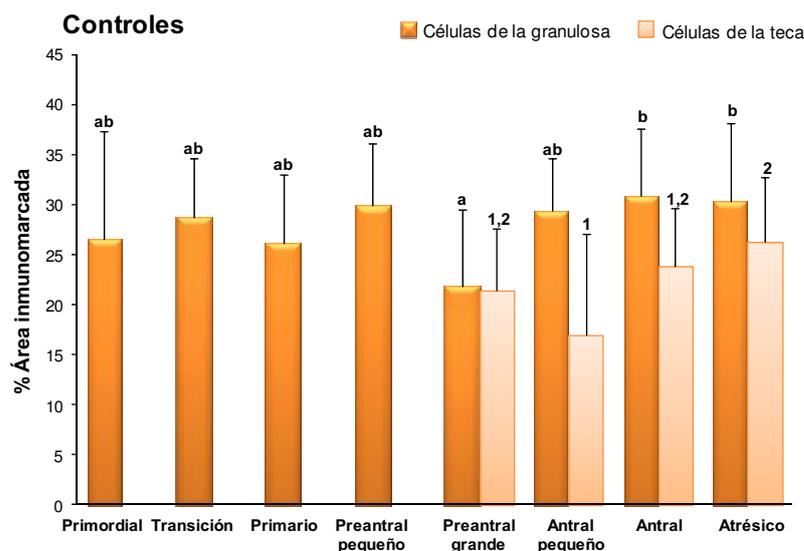


Figura 28: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo de COD inducida con ACTH, la expresión de BMP-2 fue más alta en células de la granulosa de folículos preantrales grandes, antrales y quistes que en folículos primordiales, de transición, primarios, preantrales pequeños y antrales pequeños. Además, se evidenció una mayor expresión en folículos atrésicos en relación a los antrales pequeños. En las células de la teca interna los folículos quísticos presentaron mayor expresión que los folículos atrésicos y antrales pequeños. Asimismo, en folículos atrésicos se halló una mayor expresión de BMP-2 en las células de la granulosa en relación a las células de la teca (figura 29 y 33).

En el grupo COD espontánea, la expresión de BMP-2 en células de la granulosa fue mayor en los folículos quísticos que en los folículos primordiales, primarios, preantrales pequeños y antrales pequeños. Además, se evidenció una mayor marcación a nivel de los folículos antrales en relación a los primordiales. En las células de la teca no se encontraron diferencias entre los distintos tipos foliculares en estudio. Sin embargo, sí se evidenció mayor marcación a nivel de las células de la granulosa con respecto a las de la teca interna en folículos preantrales grandes, antrales pequeños, antrales, atrésicos y quísticos (figura 30 y 33).

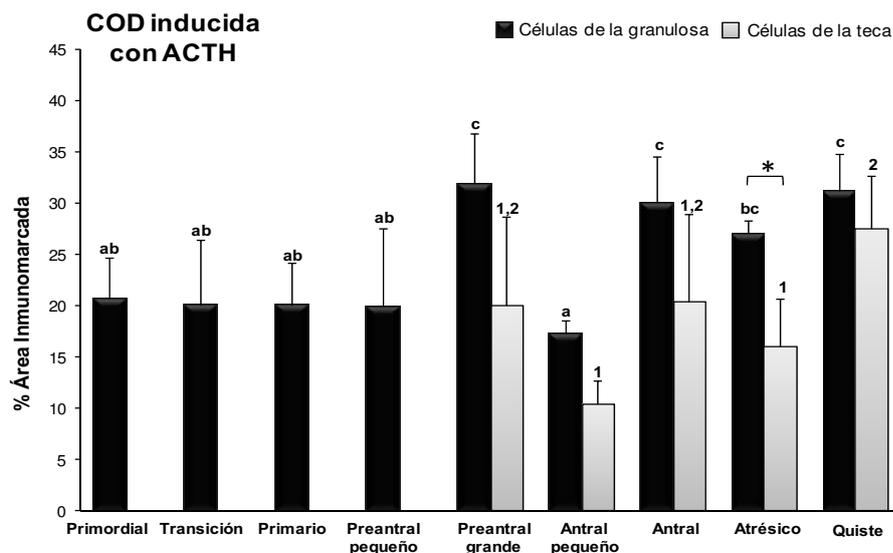


Figura 29: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en el grupo COD inducida con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular ($p < 0,05$). Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

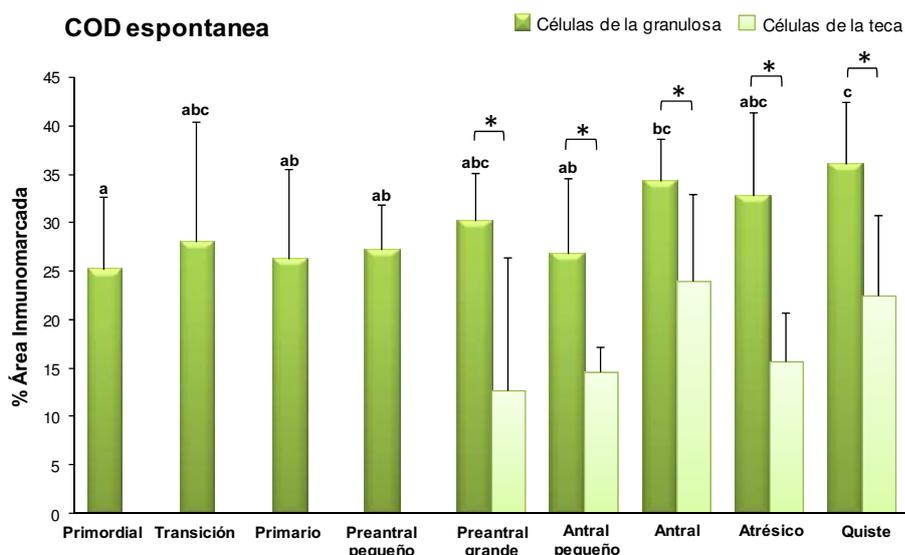


Figura 30: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular ($p < 0,05$). Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando cada categoría folicular específica fue comparada entre grupos (control, COD inducida con ACTH y COD espontánea), no se observaron diferencias en células de la granulosa de folículos primordiales, de transición, primarios, preantrales grandes, antrales, atrésicos y quistes. En los folículos preantrales pequeños y antrales pequeños la expresión fue mayor en controles y COD espontánea en relación al grupo de COD inducida con ACTH (figura 31 y 33).

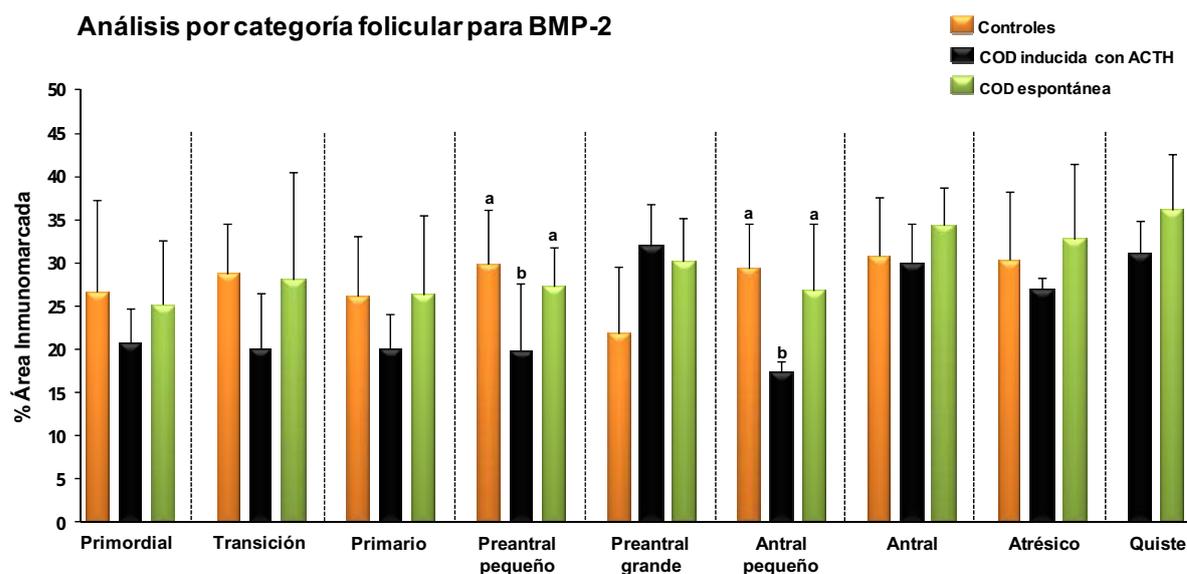


Figura 31: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

En las células de la teca interna los folículos atrésicos del grupo control mostraron mayor expresión de BMP-2 que los dos grupos con COD ($p < 0,05$) (figura 32). Además, no se encontraron diferencias significativas tanto a nivel de células de la granulosa como de la teca al comparar los quistes foliculares de los grupos COD espontánea e inducida con ACTH con los folículos antrales que fueron tomados como estructuras de referencia. (figura 32 y 33).

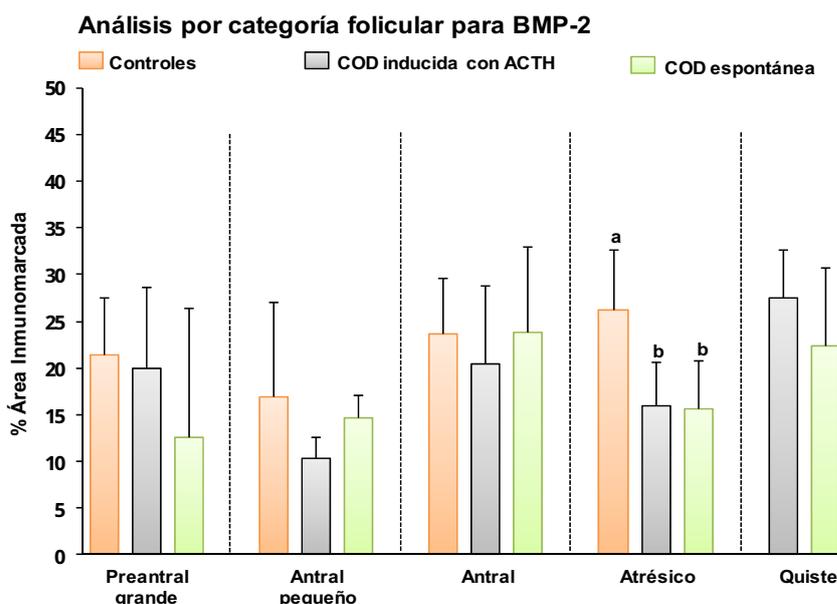


Figura 32: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

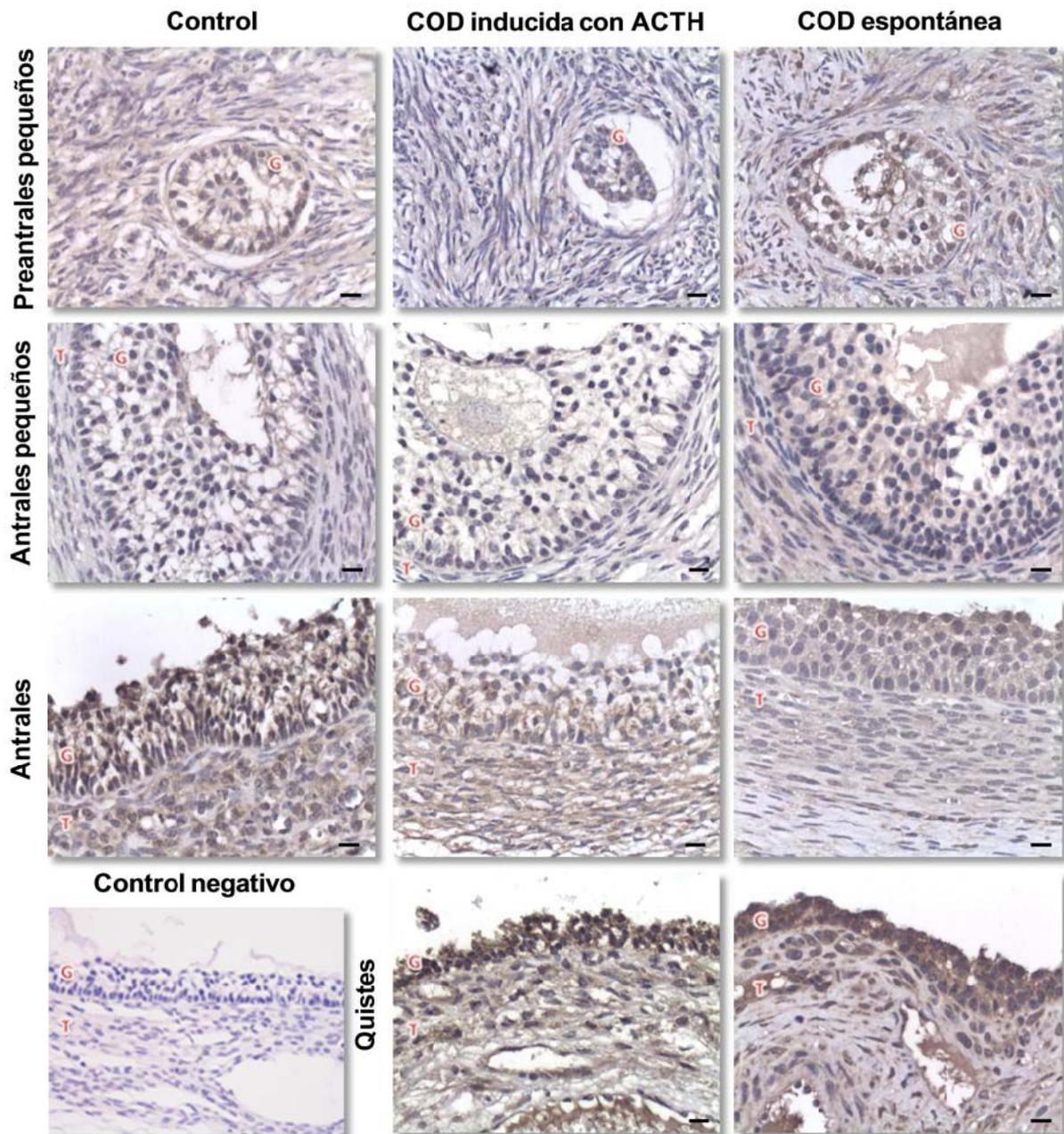


Figura 33: Imágenes representativas de la inmunomarcación de BMP-2 en distintas categorías foliculares de los grupos control, COD espontánea e inducida con ACTH. Se muestra además un control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m.

4.2.2. BMP-4

4.2.2.1. Expresión génica en los grupos COD espontánea y control.

El ARNm de BMP-4 fue detectado en todas las muestras de células foliculares analizadas. La expresión del ARNm para BMP-4 fue mayor en las muestras controles en relación a los quistes foliculares ($p < 0,05$) (figura 34).

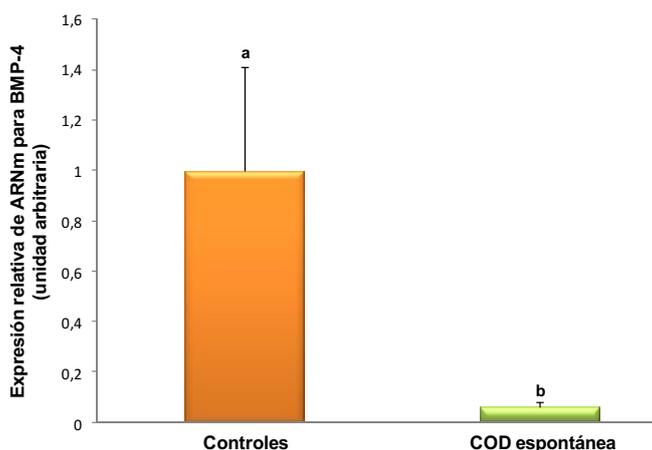


Figura 34: Expresión de ARNm de BMP-4 determinado por PCR en tiempo real en células foliculares de casos de COD espontánea (barra verde) en relación a ovarios controles (barra anaranjada). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2.2.2. Expresión proteica y localización en los grupos COD espontánea, COD inducida con ACTH y control.

La BMP-4 fue localizada por IHQ en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todos los folículos y grupos analizados. En el grupo control se encontró una baja expresión en las células de la granulosa y moderada en la teca interna de todas las categorías foliculares. En células de la granulosa la expresión fue más alta en los folículos primordiales y de transición en relación a los folículos preantrales pequeños y grandes, antrales pequeños, antrales y atrésicos, sin observarse diferencias con los folículos primarios. En las células de la teca no se detectaron diferencias entre las diferentes categorías foliculares evaluadas. Sin embargo, se halló mayor expresión en las células de la teca de folículos antrales pequeños, antrales y atrésicos en relación a la expresión en las células de la granulosa de las mismas poblaciones foliculares (figura 35 y 40).

En el grupo de COD inducida con ACTH, la expresión más alta de BMP-4 fue observada en células de la teca de folículos preantrales grandes. En esta misma población celular los folículos atrésicos y quísticos mostraron menor expresión que los folículos preantrales grandes. Además, a nivel de células de la granulosa, los folículos en estadios iniciales de desarrollo (primordiales y de transición) presentaron la mayor expresión en relación a los folículos antrales pequeños, antrales, atrésicos y quísticos. Asimismo, los folículos antrales mostraron menor expresión que los primarios y preantrales grandes y los folículos de transición y primarios mostraron mayor expresión que los folículos preantrales pequeños y atrésicos, respectivamente. Sumado a esto, se observó una mayor expresión a nivel de las células de la teca en relación a las células de la granulosa en las poblaciones de folículos preantrales grandes, antrales pequeños y antrales (figura 36 y 40).

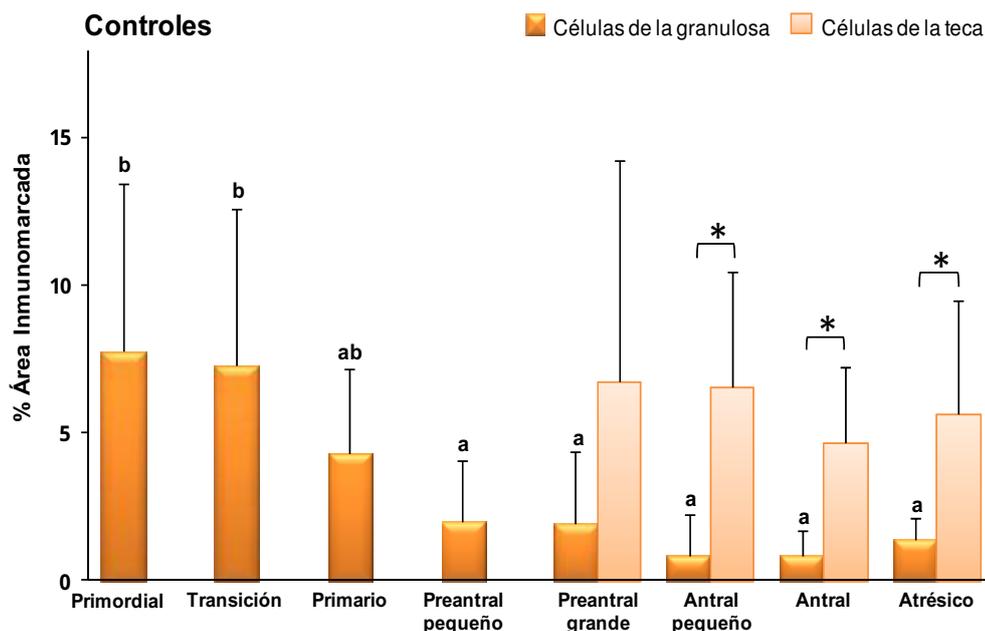


Figura 35: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

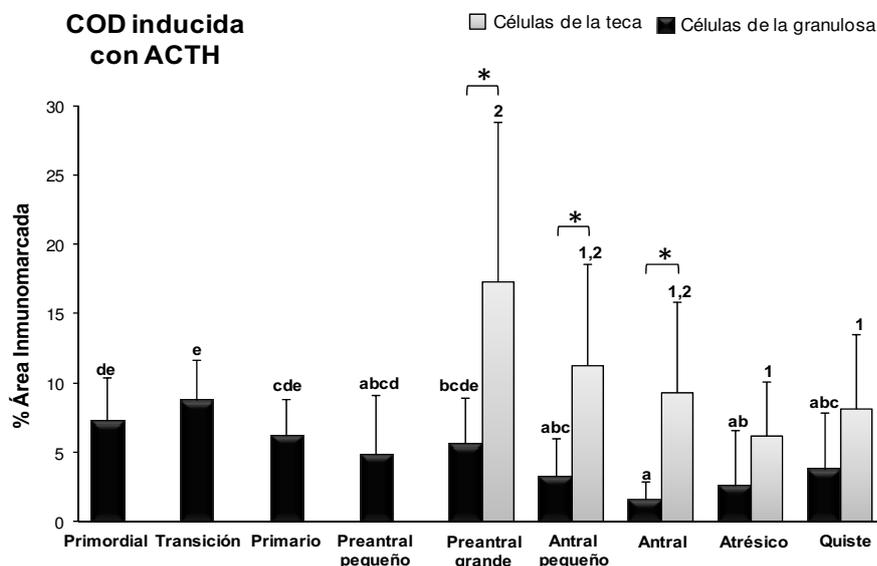


Figura 36: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en el grupo COD inducida con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo de COD espontánea, el patrón de expresión fue similar a aquel observado en el grupo de COD inducida con ACTH. En las células de la granulosa se observó una menor expresión de BMP-4 en los folículos antrales, atrésicos y quistes en relación a los folículos

primordiales y de transición. En este sentido, los folículos atrésicos también presentaron menor marcación que los folículos primarios. A nivel de las células de la teca, los folículos antrales pequeños evidenciaron mayor expresión de BMP-4 que los folículos atrésicos. Igualmente, se observó una mayor expresión en las células de la teca en relación a las células de la granulosa en las categorías de folículos antrales pequeños, antrales, atrésicos y quísticos (figura 37 y 40).

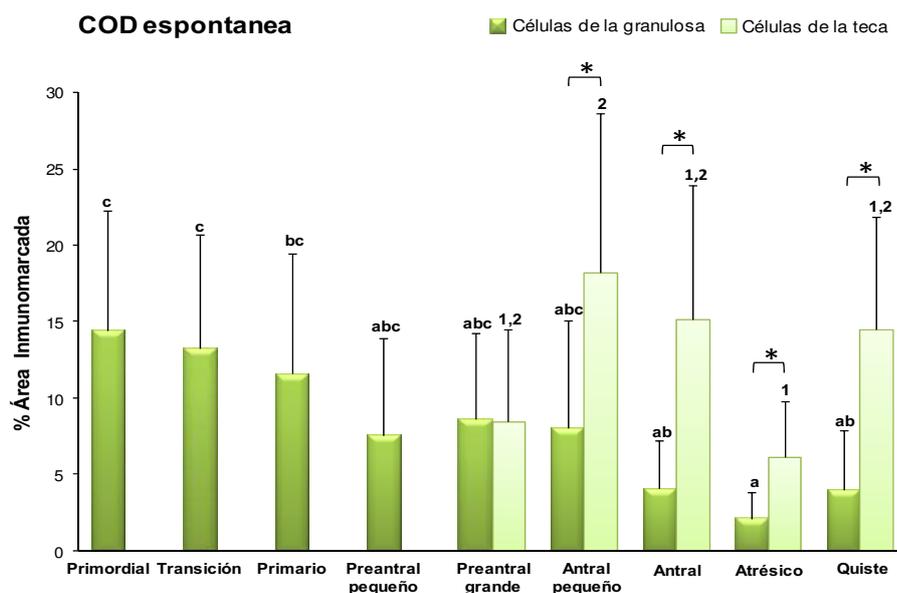


Figura 37: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando cada categoría folicular fue comparada entre los grupos en estudio, se observó que las células de la granulosa del grupo COD espontánea presentaban una mayor expresión en folículos primordiales, primarios y antrales que la misma capa de células de los grupos control y de COD inducida con ACTH ($p < 0,05$). De la misma forma, esta población celular del grupo COD espontánea también presentó una mayor expresión en los folículos de transición, preantrales pequeños y grandes y antrales pequeños en relación al grupo control (figura 38). Además, no se hallaron diferencias cuando se compararon quistes en relación a folículos antrales pequeños y antrales del grupo control que fueron tomadas como estructuras de referencia. (figura 40)

En las células de la teca interna, los folículos antrales pequeños y antrales del grupo COD espontánea mostraron mayor expresión que los del grupo control. Cuando se realizó la

comparación en la expresión de BMP-4 en la teca interna de folículos antrales pequeños y antrales del grupo control con los quistes, inducidos o espontáneos, se encontró mayor expresión en el grupo de COD espontánea (figura 39 y 40).

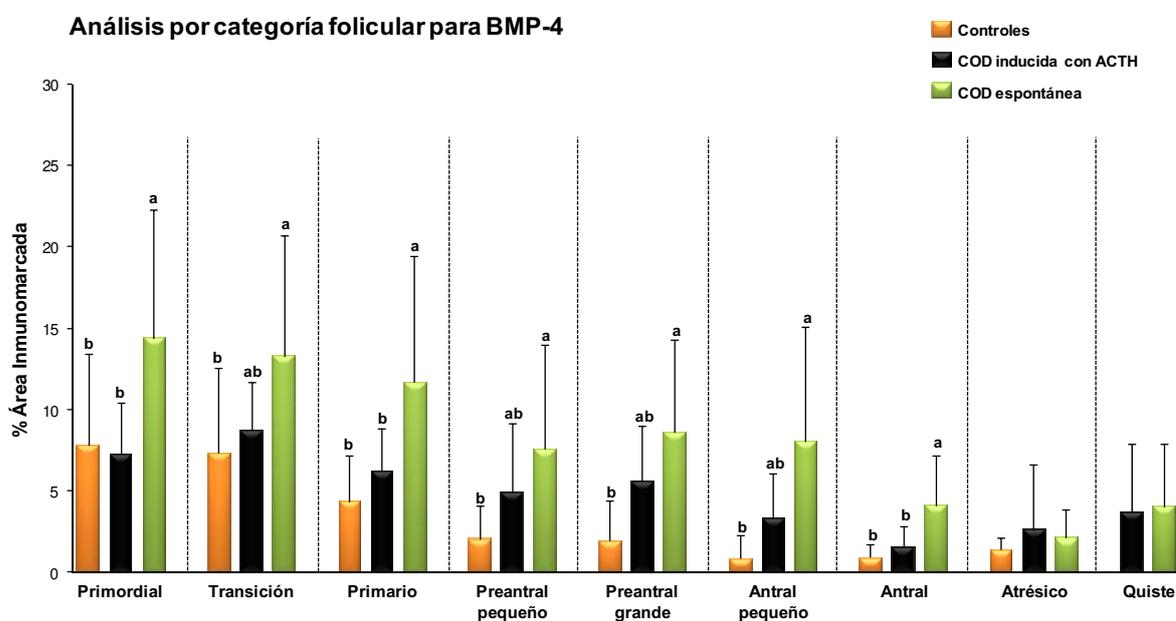


Figura 38: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

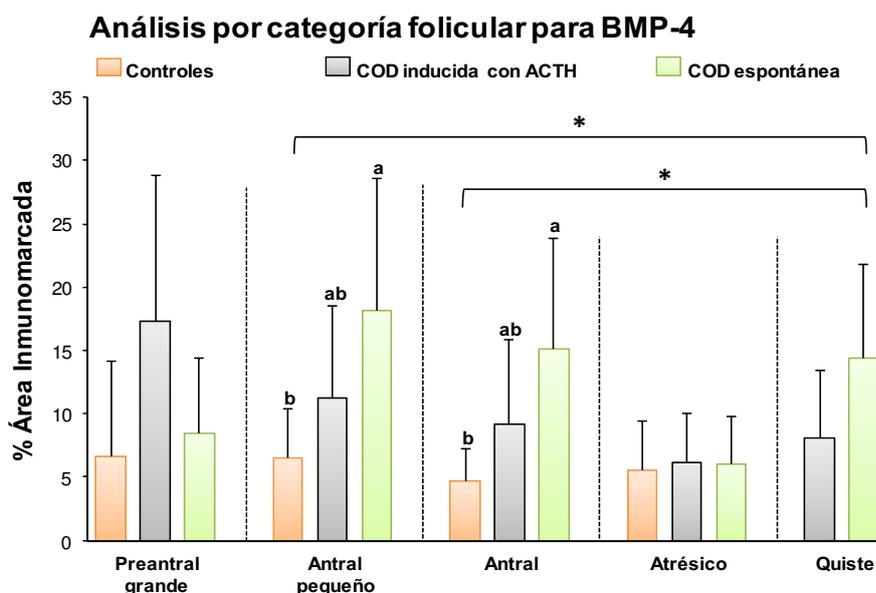


Figura 39: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

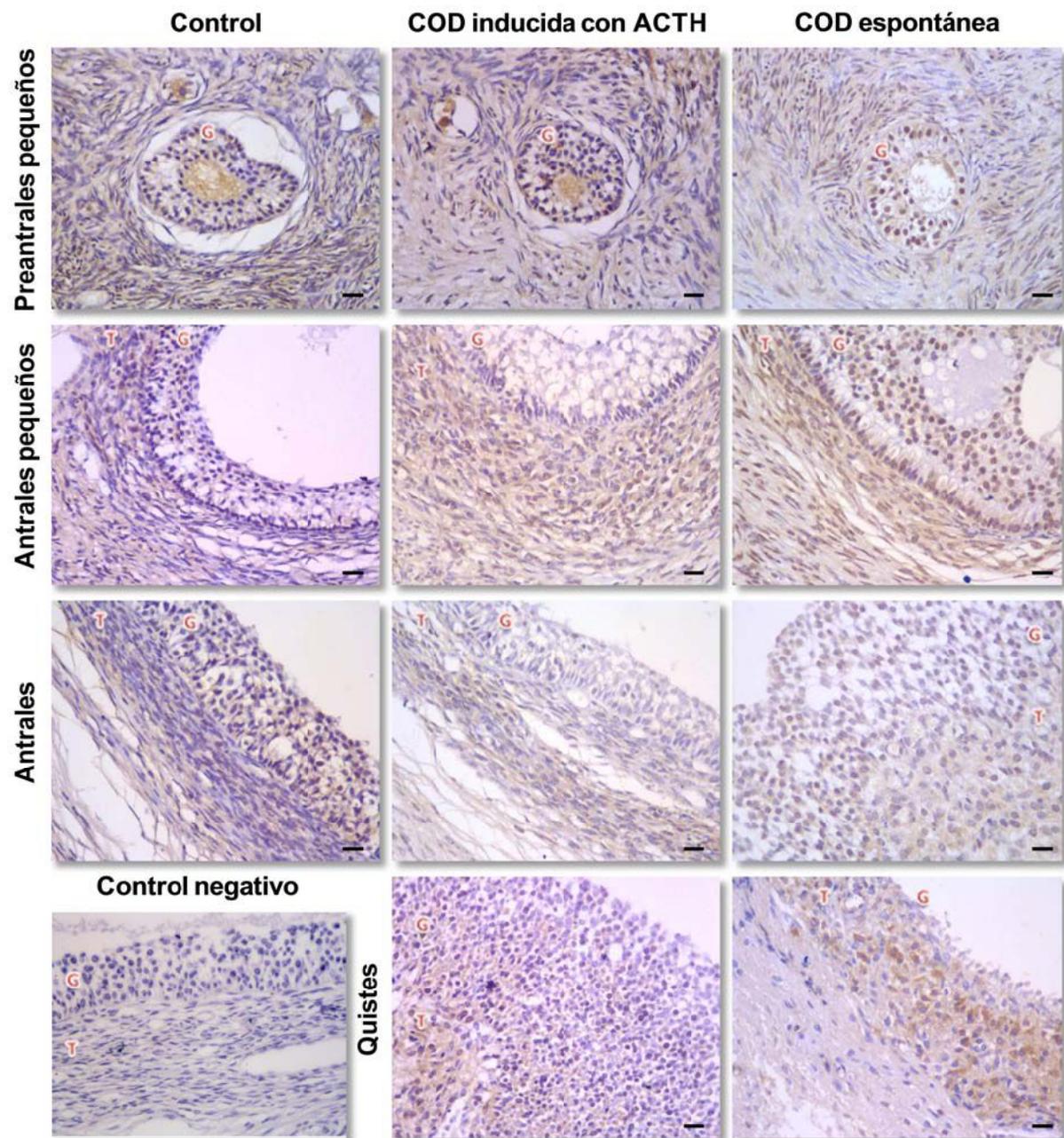


Figura 40: Imágenes representativas de la inmunomarcación de BMP-4 en distintas categorías foliculares de los grupos control, COD espontánea e inducida con ACTH. Se muestra además un control negativo de la inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m.

4.2.3. BMP-6

4.2.3.1. Expresión génica en los grupos COD espontánea y control.

El ARNm de BMP-6 fue detectado débilmente en todas las muestras foliculares evaluadas. En este sentido, un 80% de las muestras han expresado este gen fuera del rango dinámico de trabajo, por lo que no se pudo realizar la cuantificación correspondiente.

4.2.3.2. Expresión proteica y localización en los grupos COD espontánea, COD inducida con ACTH y control.

La BMP-6 fue localizada en el citoplasma de células de la granulosa y teca interna de todos los folículos y grupos analizados. En los animales controles se observó una alta expresión en la capa granulosa de todas las categorías foliculares. Esta expresión fue mayor en folículos preantrales grandes con respecto a folículos antrales y atrésicos. En células de la teca, los folículos atrésicos mostraron mayor expresión que los folículos preantrales grandes. Además, las células de la granulosa de los folículos preantrales grandes, antrales pequeños y antrales mostraron mayor expresión que la observada en las células de la teca, dentro de la misma categoría folicular (figura 41 y 46).

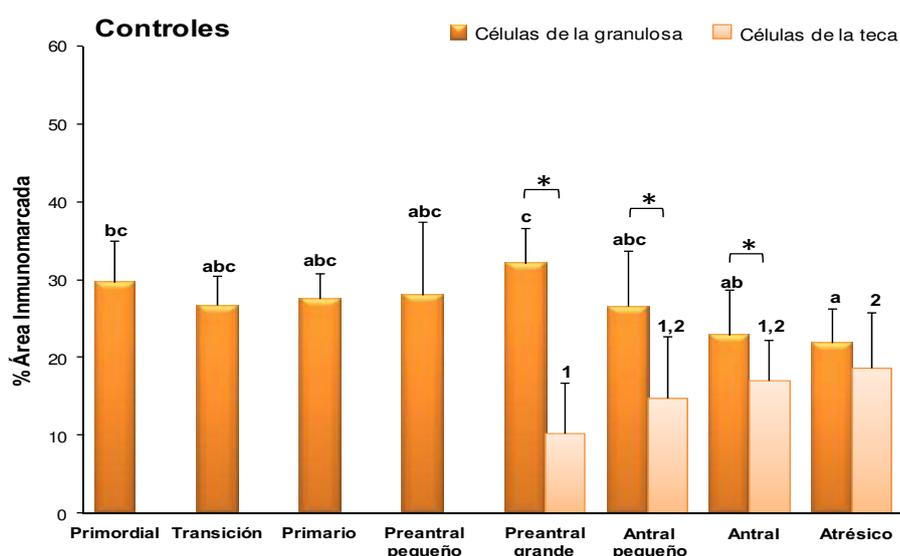


Figura 41: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo de COD inducido con ACTH, las células de la granulosa de los folículos primordiales, primarios, antrales pequeños y quísticos mostraron expresiones similares para BMP-6. Además, la expresión en los folículos preantrales grandes fue significativamente más alta que la de los folículos de transición, preantrales pequeños, antrales y atrésicos. Sumado a esto, no se encontraron diferencias en la expresión de esta proteína a nivel de las células de la teca. Por otro lado, se evidenció una mayor expresión en las células de la granulosa en relación a las células de la teca a nivel de los folículos preantrales grandes (figura 42 y 46).

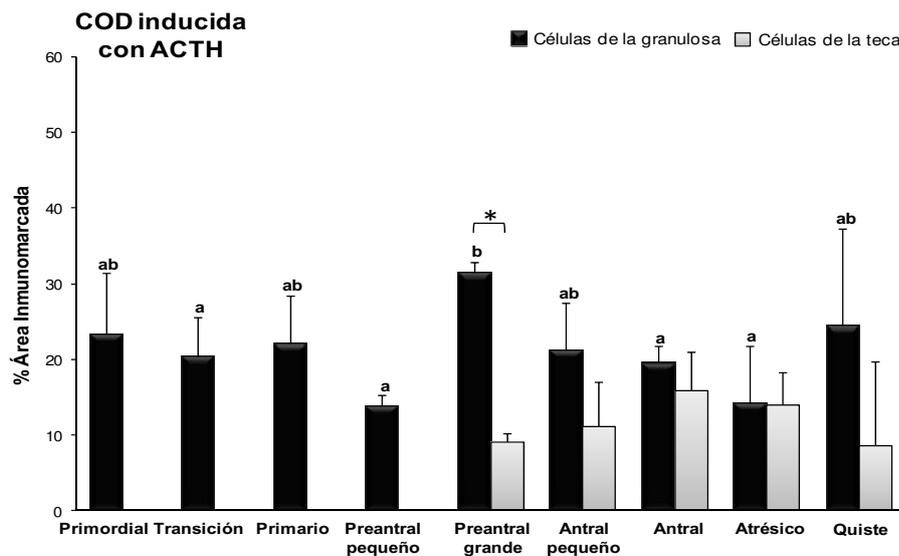


Figura 42: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en el grupo COD inducida con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo de COD espontánea, a nivel de las células de la granulosa, los folículos quísticos mostraron la mayor expresión en relación a las demás estructuras foliculares analizadas. Además, en las células de la teca, la expresión en los folículos preantrales grandes fue menor que aquella encontrada en las demás categorías analizadas. Por otro lado, los folículos preantrales grandes, antrales pequeños y quísticos, presentaron expresiones mayores en la capa de células de la granulosa en relación a la de células de la teca (figura 43 y 46).

Al comparar entre sí, las estructuras foliculares equivalentes de cada grupo, se observaron diferencias en las células de la granulosa de folículos de transición y preantrales pequeños siendo más baja la expresión en el grupo de COD inducida con ACTH en relación a los grupos control y de COD espontánea. Los folículos antrales y atrésicos mostraron una expresión similar entre los grupos, siendo más alta en los folículos del grupo de COD espontánea que en los de COD inducida con ACTH, sin encontrarse diferencias en relación a los controles. También, se comparó la expresión de BMP-6 en quistes en relación a folículos antrales y antrales pequeños, pudiéndose observar que los quistes espontáneos mostraban mayor expresión con respecto a los folículos antrales del grupo control (figura 44 y 46).

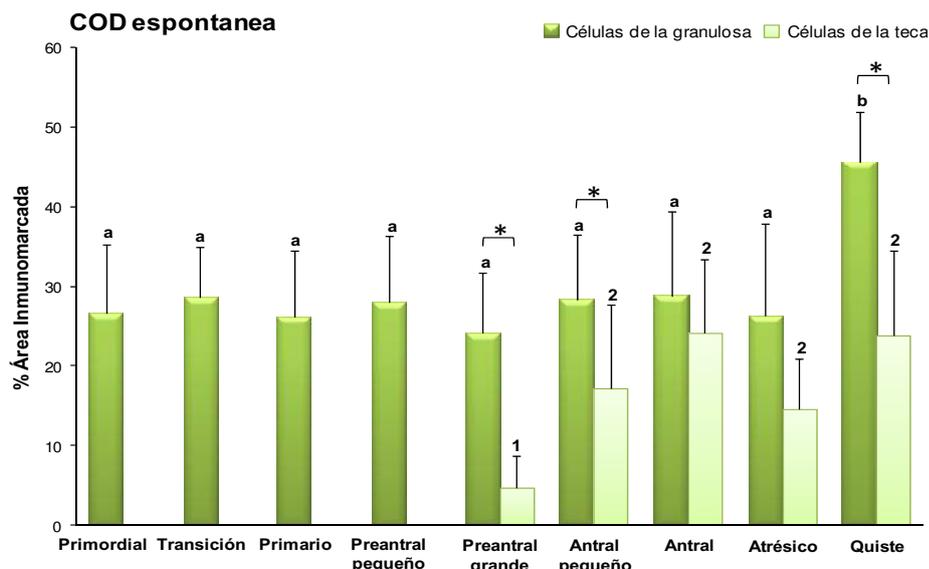


Figura 43: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

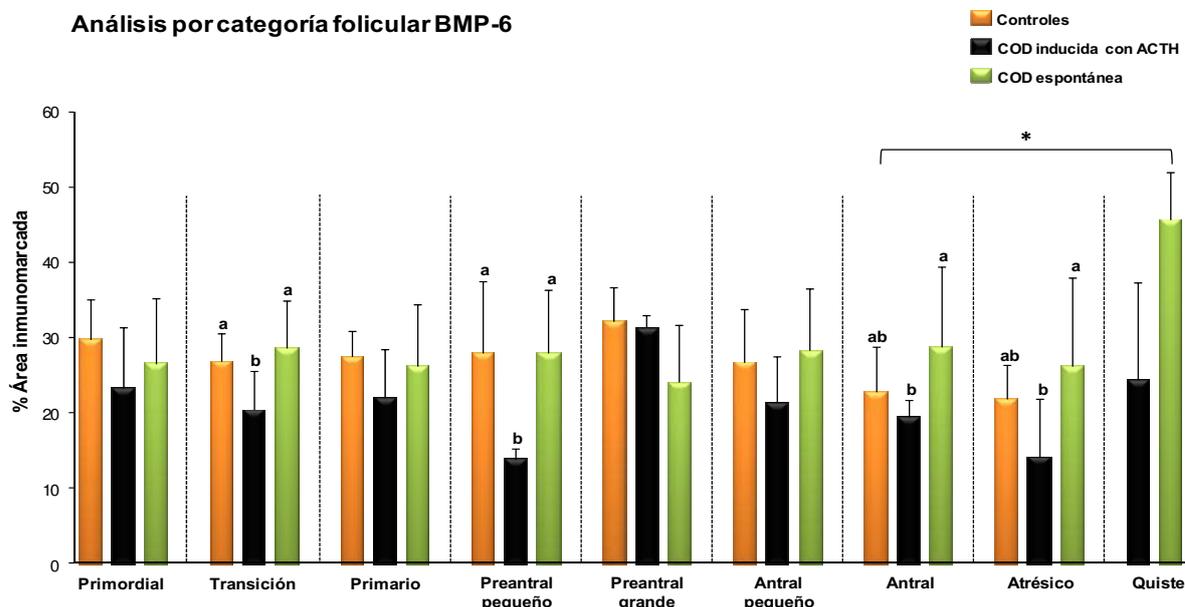


Figura 44: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

En células de la teca fue posible evidenciar una alta expresión de la proteína en los folículos antrales y quistes del grupo COD espontánea con respecto al grupo de COD inducida con ACTH, sin encontrarse diferencias con el grupo control. Además, no se hallaron diferencias cuando se compararon quistes en relación a folículos antrales pequeños y antrales del grupo control que fueron tomadas como estructuras de referencia (figura 45 y 46).

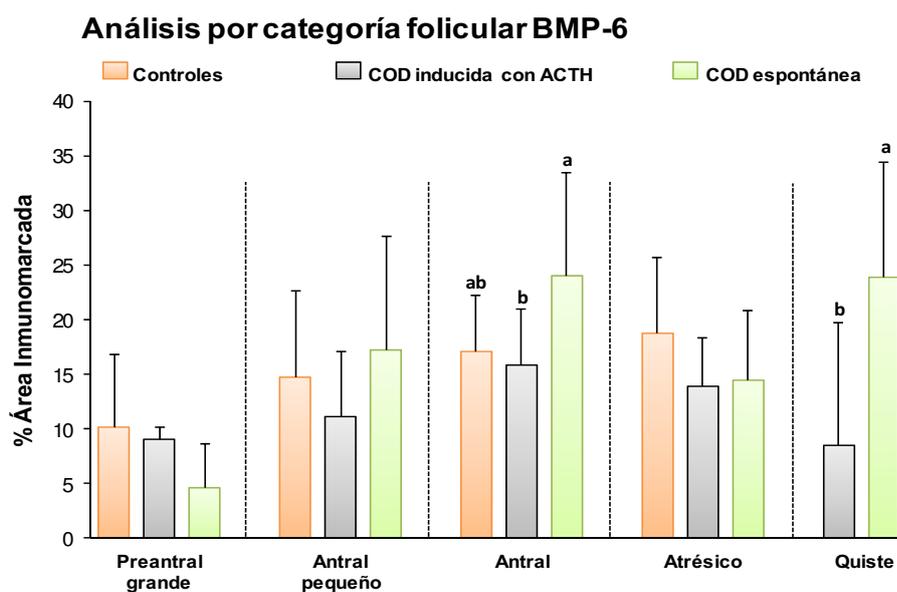


Figura 45: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

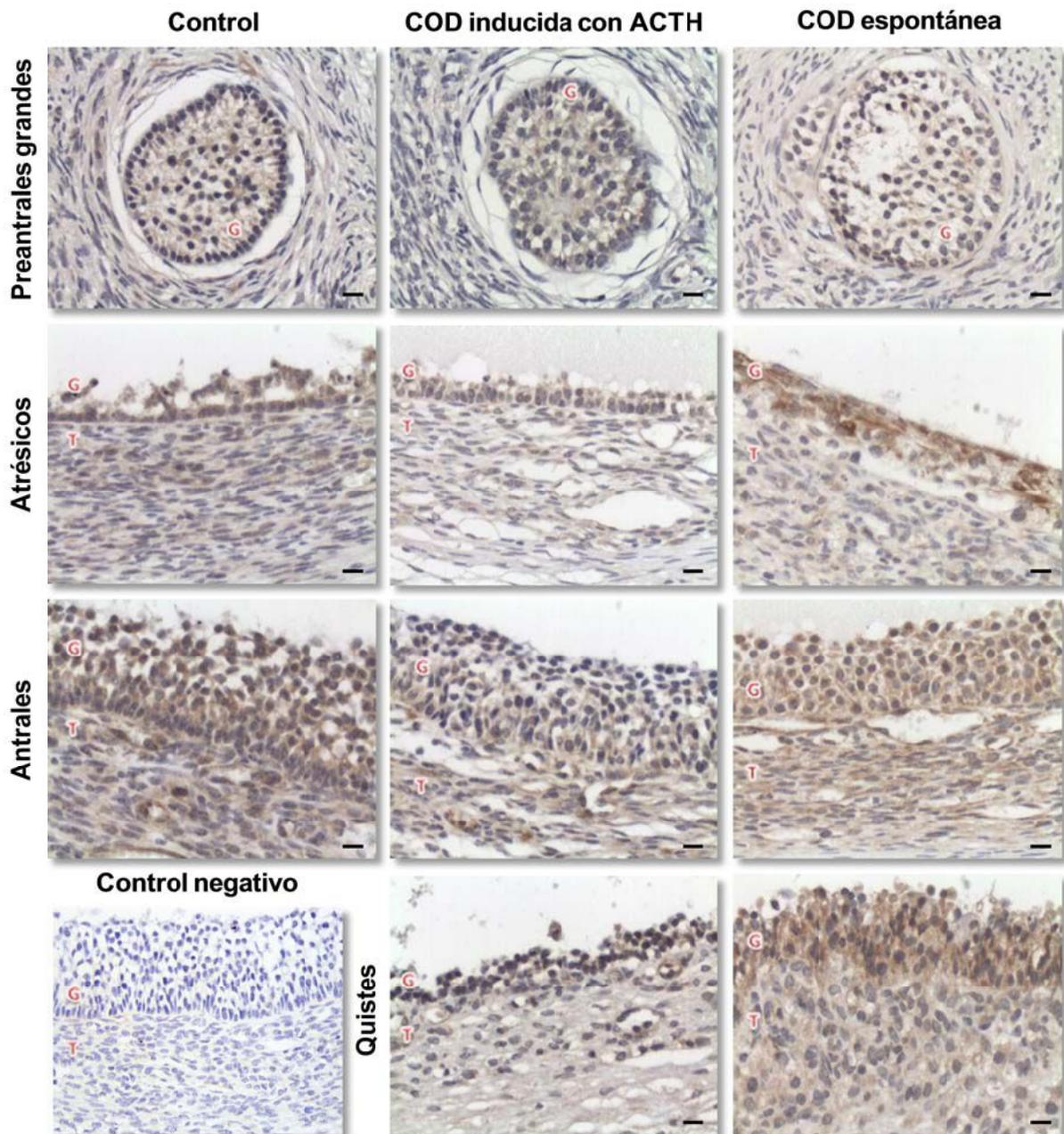


Figura 46: Imágenes representativas de la inmunomarcación de BMP-6 en distintas categorías foliculares de los grupos control, COD espontánea e inducida con ACTH. Se muestra además un control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m.

4.2.4. BMPR-1B

4.2.4.1. Expresión proteica y localización en los grupos COD espontánea, COD inducida con ACTH y control.

El BMPR-1B fue localizado en el citoplasma de células de la granulosa y teca interna de todos los folículos y grupos analizados. Particularmente, en los animales controles no se

observaron diferencias entre las distintas categorías foliculares durante la foliculogénesis tanto a nivel de las células de la granulosa como de las células de la teca. Además, no se hallaron diferencias significativas al comparar la expresión del receptor en las células de la granulosa y de la teca dentro de la misma categoría folicular (figura 47 y 52).

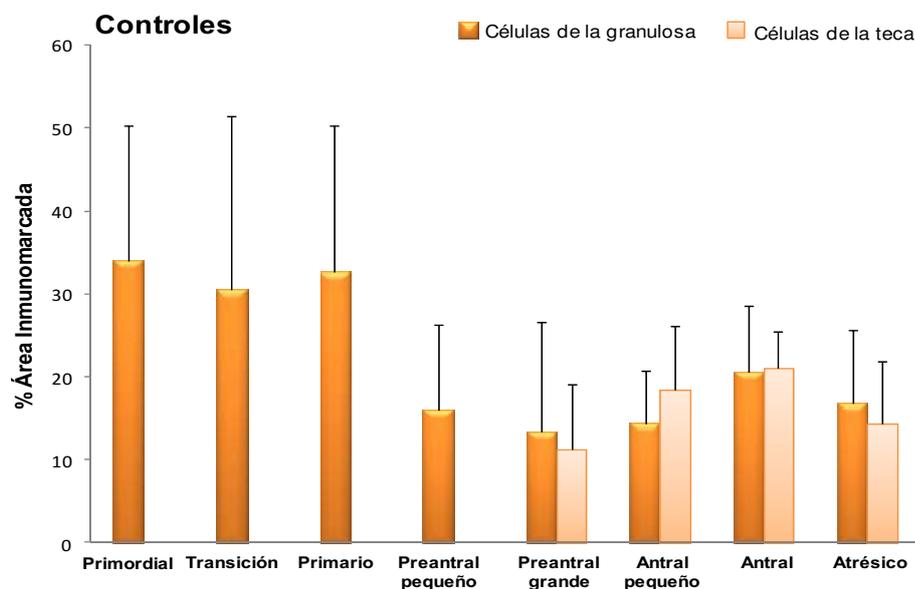


Figura 47: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMPR-1B en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

En el grupo COD inducida con ACTH la expresión de BMPR-1B en células de la granulosa fue mayor en los folículos en estadios iniciales de desarrollo en relación a los folículos antrales pequeños, antrales y atrésicos. Además, la expresión a nivel de células de la teca no presentó diferencias entre las distintas categorías foliculares. Sumado a esto, tampoco se hallaron diferencias entre las células de la granulosa y de la teca al compararlas en la misma categoría folicular (figura 48 y 52).

En la evaluación de los resultados de los grupos COD espontánea observamos que a nivel de las células de la granulosa los folículos primordiales, de transición, primarios y preantrales pequeños presentaron una mayor expresión del receptor que los folículos antrales pequeños y, las categorías de primarios y preantrales pequeños presentaron mayor expresión en relación a los folículos preantrales grandes. Además, en la capa de células de la teca la menor expresión fue encontrada en los folículos atrésicos al compararlos con las demás categorías foliculares. Sumado a esto, los folículos antrales pequeños expresaron mayor BMPR-1B que los folículos preantrales grandes. Al comparar la expresión entre células de la granulosa y de la teca dentro de la misma categoría folicular observamos que en los folículos

atrésicos la expresión fue mayor en células de la granulosa que en células de la teca (figura 49 y 52).

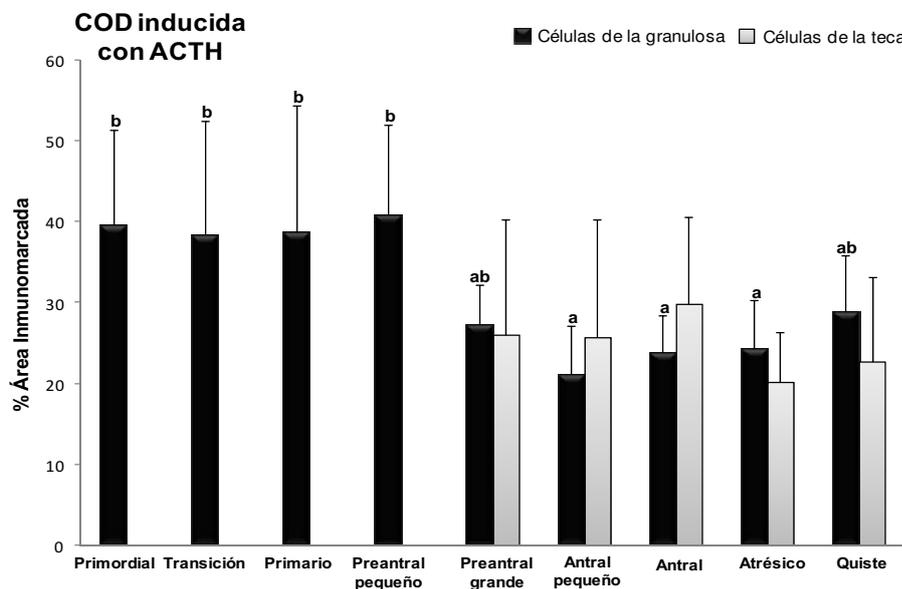


Figura 48: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMPR-1B en el grupos COD inducida con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y foliculos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

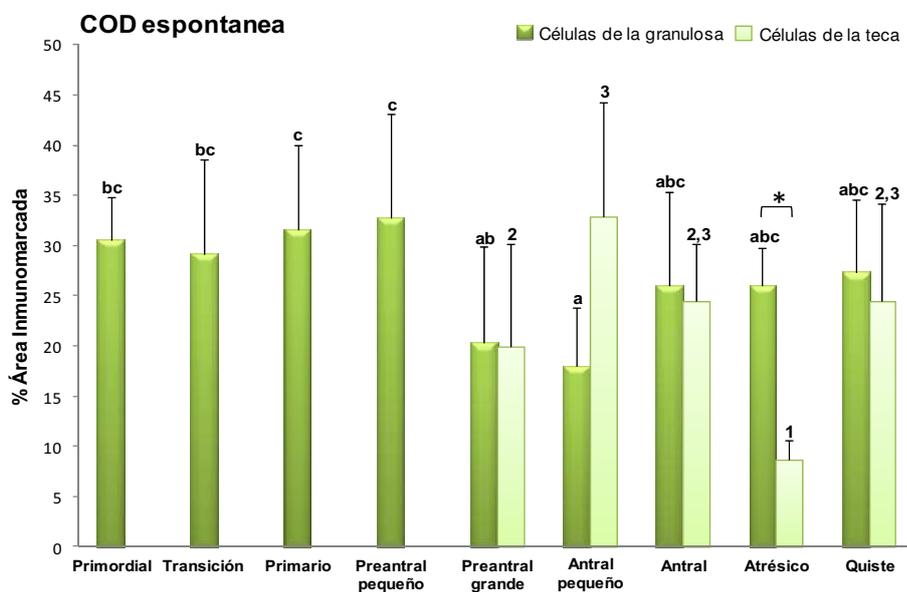


Figura 49: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMPR-1B en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y foliculos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

También, se realizó la comparación de las categorías foliculares equivalentes entre los diferentes grupos en estudios. De esta forma pudimos observar que a nivel de células de la granulosa el BMPR-1B mostró una expresión homogénea dentro de cada categoría, con excepción de los folículos preantrales, donde los grupos COD inducida con ACTH y espontánea mostraron mayores porcentajes de marcación en relación al grupo control. Asimismo, al comparar las estructuras quísticas pertenecientes a los grupos COD inducida con ACTH y COD espontánea con las estructuras controles de referencia (folículos antrales pequeños y antrales) fue observada una mayor expresión en los quistes de ambos grupos con COD en relación a los folículos antrales pequeños controles (figura 50 y 52).

En células de la teca se observaron diferencias en la categoría de folículos atrésicos, donde el grupo con COD inducida con ACTH evidenció mayor porcentaje de marcación que los mismos del grupo COD espontánea. Además, no se encontraron diferencias entre los folículos quísticos de ambos grupos con COD y los folículos antrales pequeños y antrales controles, que fueron tomados como estructuras de referencia (figura 51 y 52).

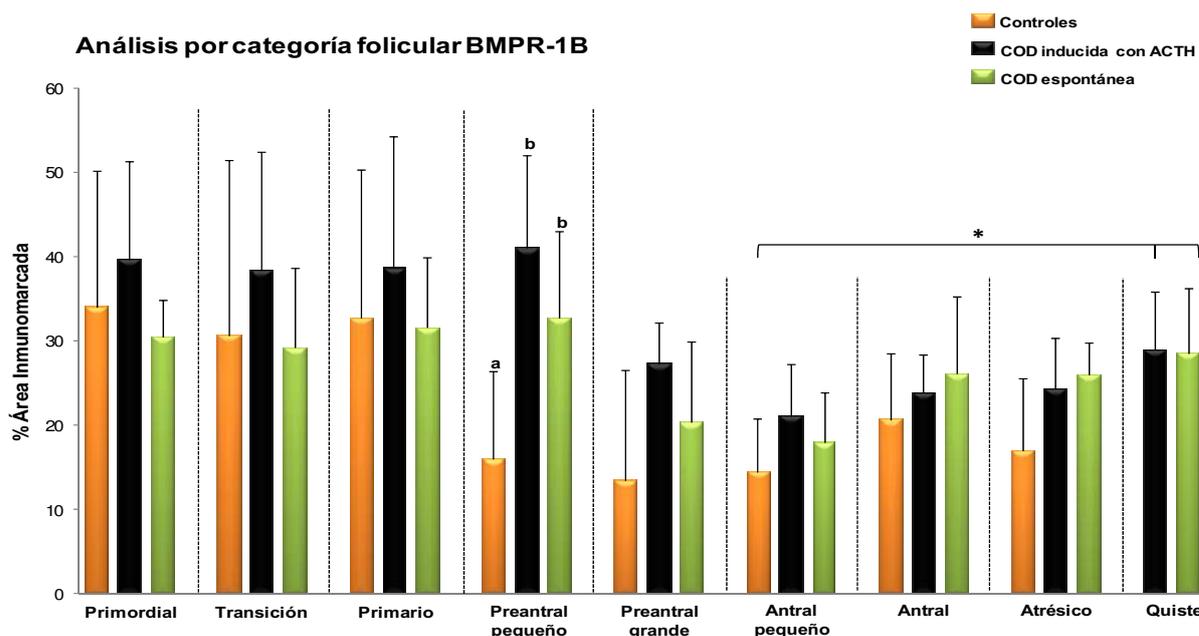


Figura 50: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMPR-1B en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

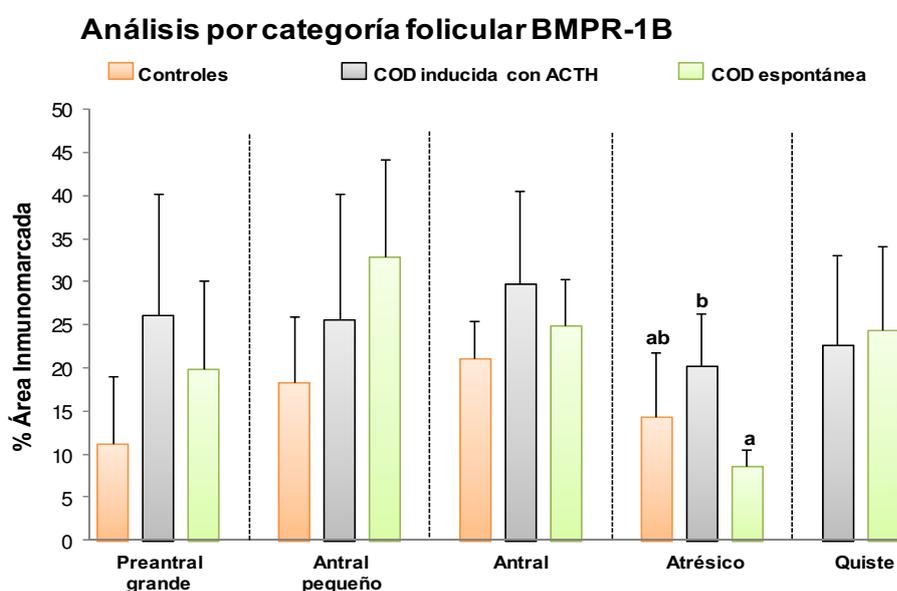


Figura 51: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMPR-1B en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

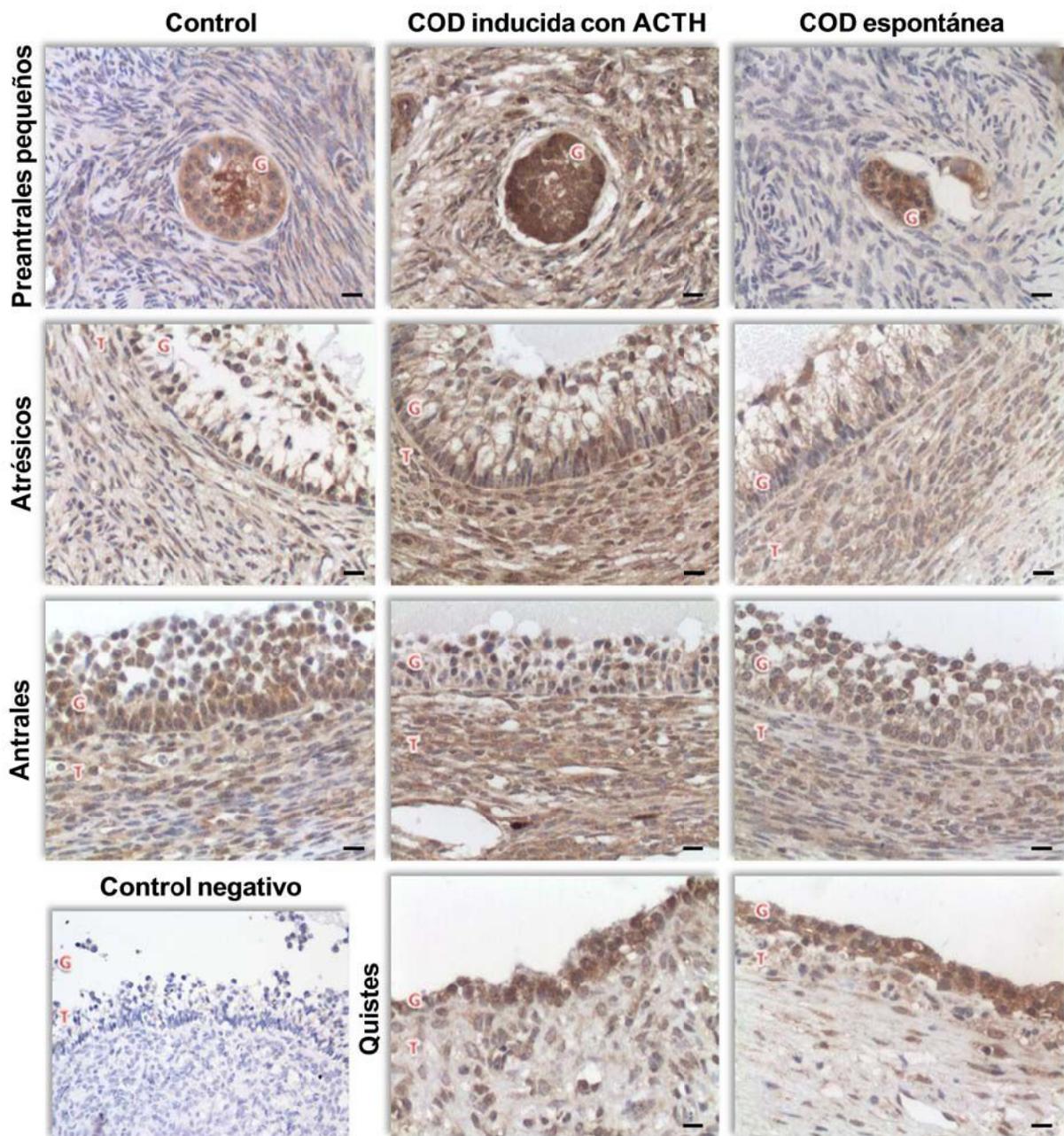


Figura 52: Imágenes representativas de la inmunomarcación de BMPR-1B en distintas categorías foliculares de los grupos control, COD espontánea e inducida con ACTH. Se muestra además un control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m.

4.3. Localización y expresión proteica de BMP-2, BMP-4 y BMP-6 en folículos ováricos durante la persistencia folicular inducida mediante P4.

La expresión proteica de estas tres proteínas fue analizada en folículos primarios, preantrales pequeños, preantrales grandes, antrales y atrésicos en el grupo control, sumándose a estas categorías, los folículos persistentes de los grupos P5, P10 y P15. Se han excluidos de este análisis las categorías de folículos primordiales, de transición, ya que en los estudios

realizados sobre los modelos de COD espontánea e inducida con ACTH, no presentaron variaciones de importancia, tanto en la evaluación por categoría folicular como durante el análisis de la dinámica folicular.

4.3.1. BMP-2

4.3.1.1. Expresión y localización

El análisis de BMP-2 se realizó sobre muestras ováricas provenientes del modelo de inducción de persistencia folicular, correspondientes a los grupos P5, P10 y P15, y al grupo control. La BMP-2 fue localizada en el citoplasma de células de la granulosa y teca interna de todos los folículos y grupos analizados.

Se realizó una comparación de la inmunomarcación (células de la granulosa y teca interna por separado) de cada categoría folicular entre los distintos grupos analizados. La expresión de BMP-2 en células de la granulosa fue alta en todas las estructuras foliculares y grupos analizados. En este sentido, solamente se detectaron variaciones en la expresión en la categoría de folículos preantrales pequeños del grupo P5 con respecto a los demás grupos en estudio (figura 53 y 59).

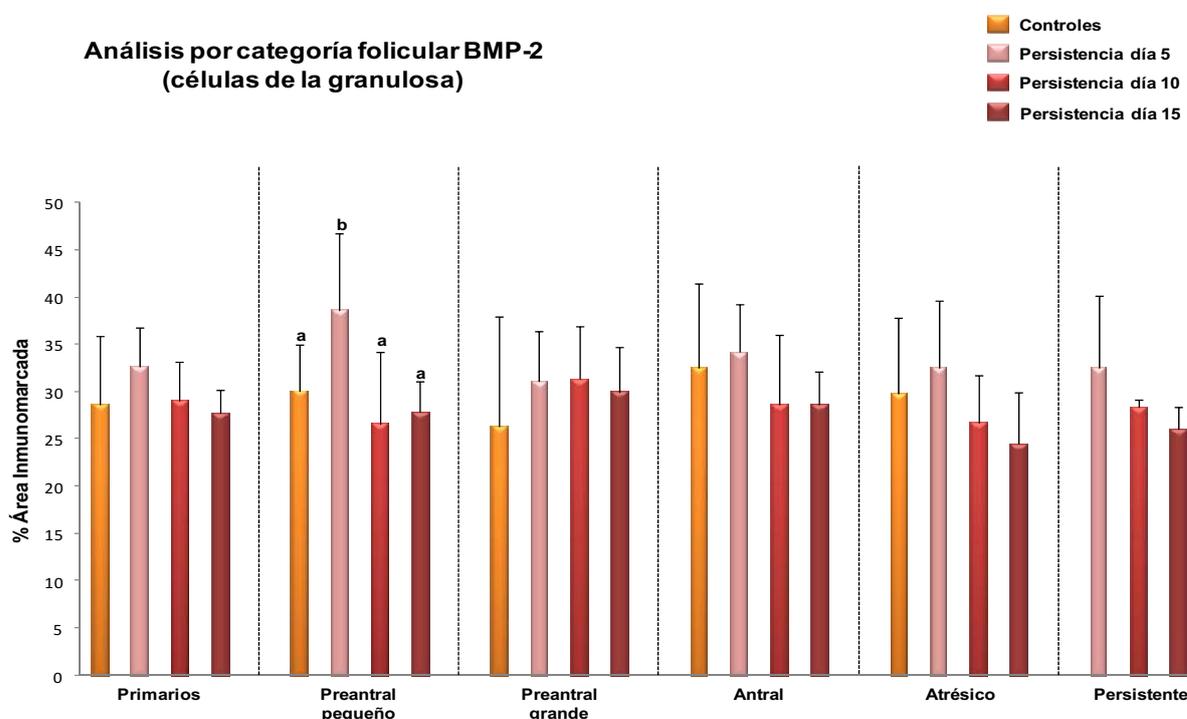


Figura 53: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

En la teca interna, se observó una expresión más heterogénea de esta proteína. Así, los folículos preantrales grandes del grupo control mostraron mayor expresión que los preantrales grandes del grupo P15. Además, en la categoría de folículos atrésicos, el grupo control presentó mayor expresión con respecto a los grupos P10 y P15, sin encontrarse diferencias en las categorías de folículos antrales y persistentes. Sumado a esto, no se encontraron diferencias significativas al comparar los porcentajes de marcación en células de la granulosa y teca interna de los folículos persistentes de los tres grupos tratados (P5, P10 y P15) con los folículos antrales del grupo control (estructuras de referencia) (figura 54 y 59).

En cada grupo experimental se realizó el análisis de la expresión de esta proteína a lo largo de la foliculogénesis. A diferencia del grupo control, en los tres grupos tratados (P5, P10 y P15), la expresión en células de la granulosa de todas las categorías foliculares evaluadas fue mayor que en la teca interna (figuras 56, 57 y 58). En el grupo control no se encontraron diferencias tanto en las células de la granulosa como en las de la teca (figura 55 y 59).

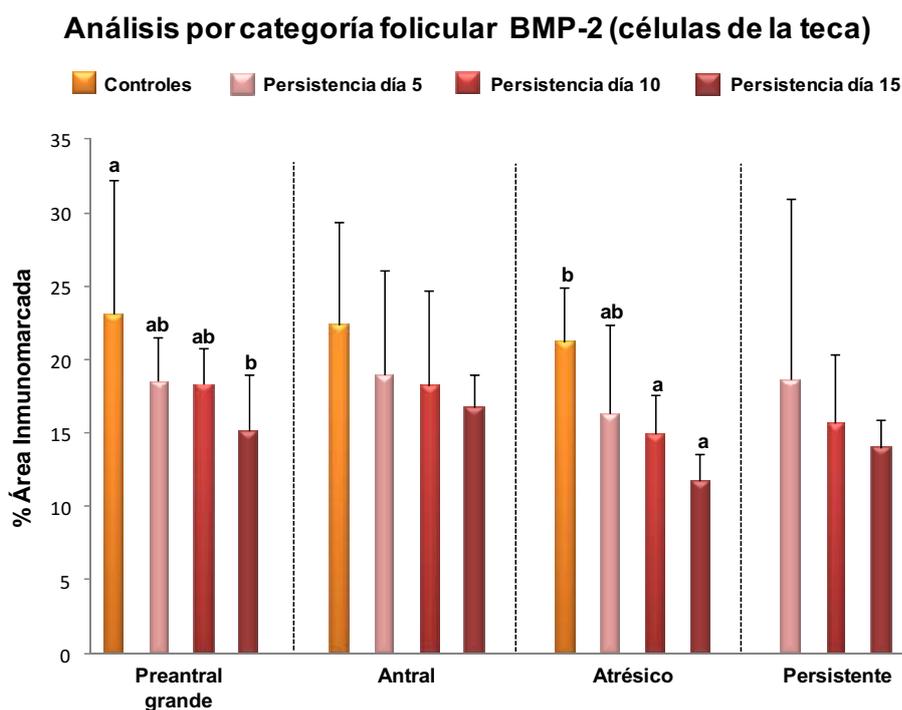


Figura 54: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

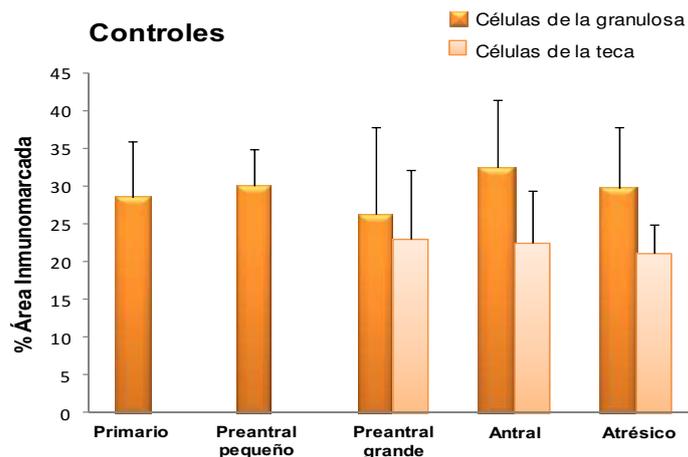


Figura 55: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

En el grupo experimental P5, no se hallaron diferencias significativas en la expresión de BMP-2 durante la foliculogénesis, tanto a nivel de las células de la granulosa como de las células de la teca (figura 56 y 59). La expresión de esta proteína en el grupo P10 se comportó de una manera similar a la observada en el grupo P5 (figura 57 y 59).

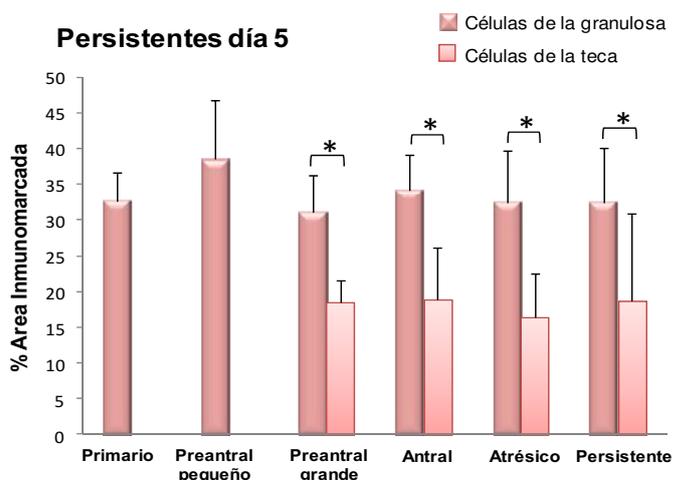


Figura 56: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular ($p < 0,05$).

De forma equivalente, la expresión de BMP-2 en el grupo P15 no presentó diferencias de expresión en las células de la granulosa, sin embargo, en células de la teca los folículos antrales presentaron una mayor expresión que los folículos atrésicos (figura 58 y 59).

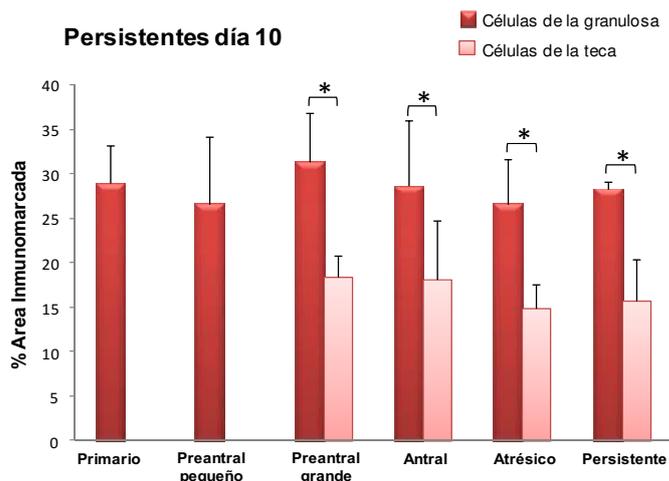


Figura 57: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular ($p < 0,05$).

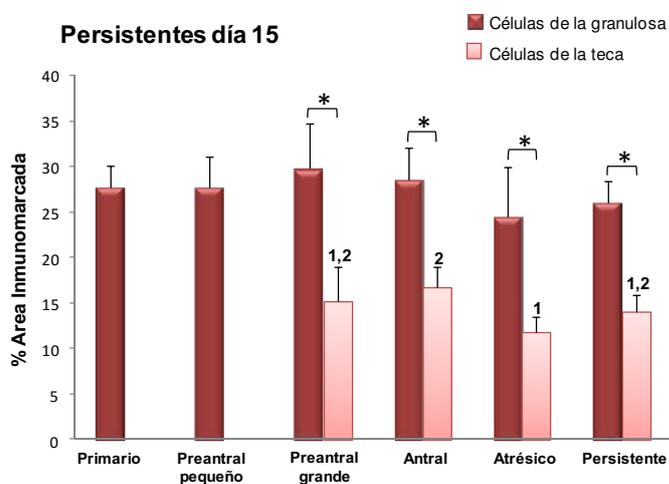


Figura 58: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-2 en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

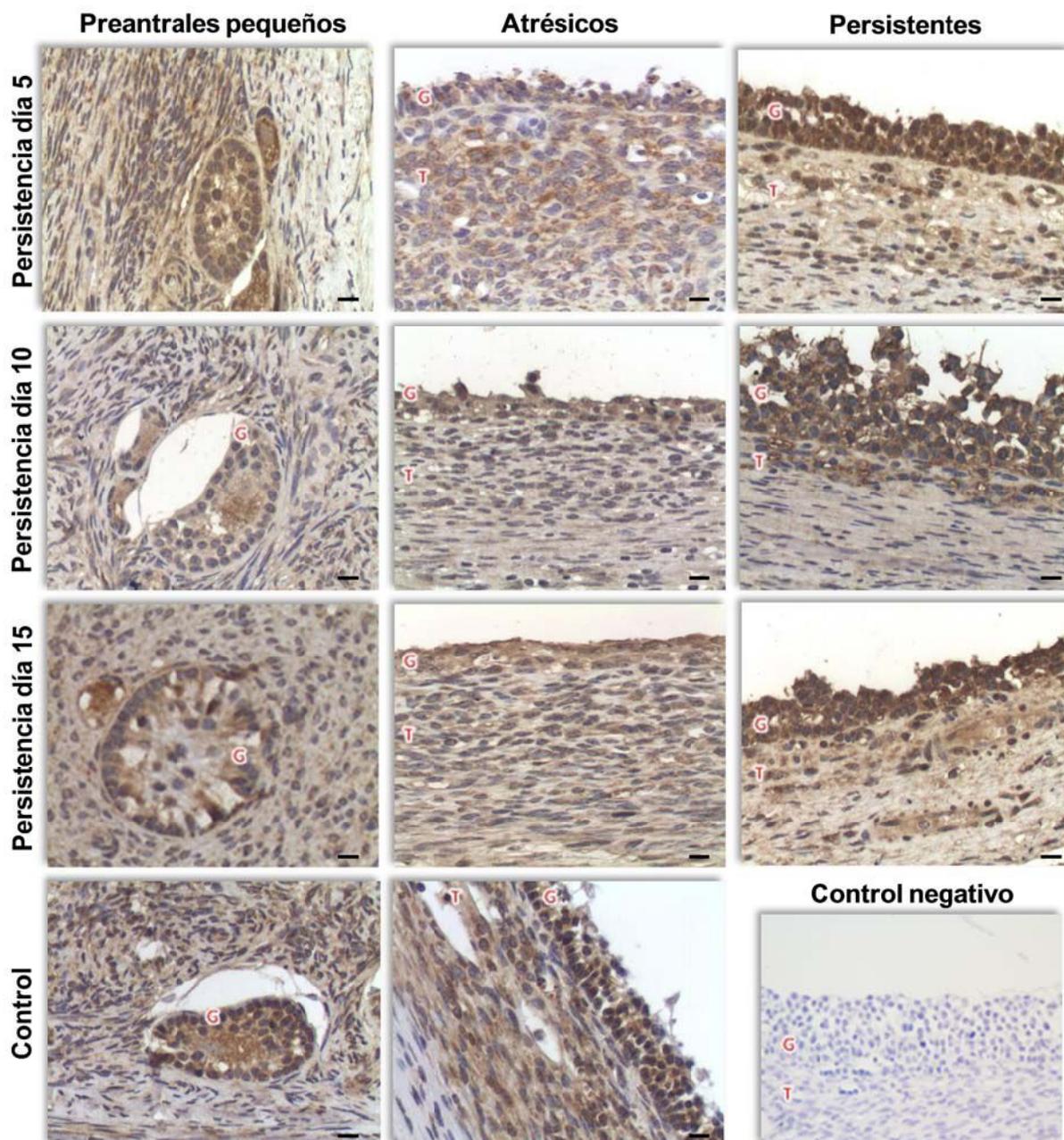


Figura 59: Imágenes representativas de la inmunomarcación de BMP-2 en distintas categorías foliculares de los grupos control, P5, P10 y P15. Se muestra además un control negativo de la inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 µm.

4.3.2. BMP-4

4.3.2.1. Expresión y localización

El análisis de la expresión de BMP-4 se realizó sobre muestras provenientes del modelo de inducción de persistencia folicular, correspondientes a los grupos P5, P10 y P15, y al grupo control. Se detectó marcación positiva para BMP-4 en el citoplasma de las células de

la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares evaluadas dentro de cada grupo. La BMP-4 mostró un patrón de expresión característico a nivel de las células de la teca, siendo mayor en éstas últimas en relación a las células de la granulosa (figura 66).

Se realizó un análisis de la expresión en células de la granulosa y de la teca interna por categoría folicular entre los distintos grupos en estudio. De esta forma, en células de la granulosa se observó una expresión mayoritaria de la proteína en las poblaciones foliculares perteneciente al grupo P10. Así, los folículos primarios y preantrales pequeños del grupo control y P15 mostraron una menor expresión que los grupos P5 y P10. Además, los folículos preantrales grandes de P10 presentaron mayor expresión que los controles. Asimismo, en la categoría antrales, los grupos control y P15 mostraron menor expresión en relación al grupo P5. De una manera similar, los folículos atrésicos controles tuvieron menor expresión que la misma categoría en P5. Al comparar las folículos persistentes de los grupos P5, P10 y P15 con las estructuras controles de referencia (folículos antrales) se observó mayor expresión en los folículos persistentes de P10 en relación a los folículos antrales controles (figura 60 y 66).

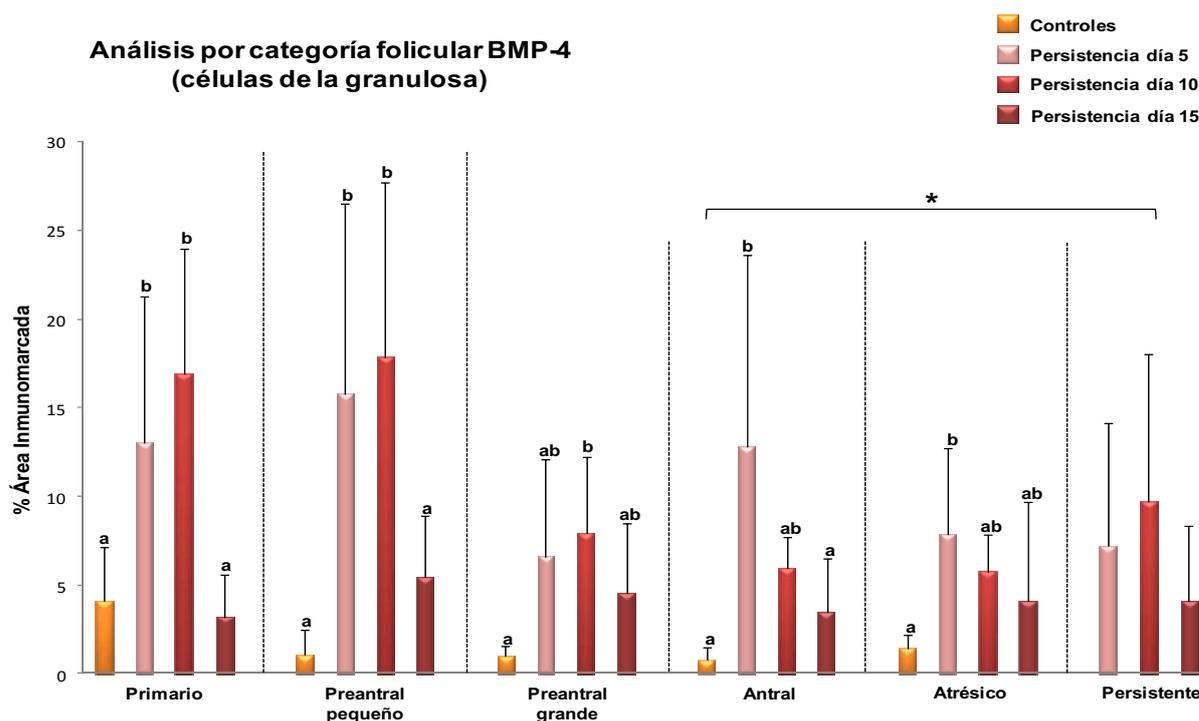


Figura 60: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

En células de la teca interna la expresión de BMP-4 fue mayor en folículos preantrales grandes del grupo P10 en comparación con P15. De forma equivalente, en los folículos

atrésicos, los folículos del grupo P10 expresaron mayor BMP-4 que los folículos controles y los del grupo P15. Particularmente en folículos antrales la expresión fue mayor en los tres grupos tratados en relación a los controles. Además, los folículos persistentes de día 10 mostraron mayor marcación en comparación con los de día 5 y 15. Al comparar los folículos persistentes con los folículos antrales controles se observó una mayor expresión en los folículos persistentes del grupo P10 en relación a los folículos antrales controles (figura 61 y 66).

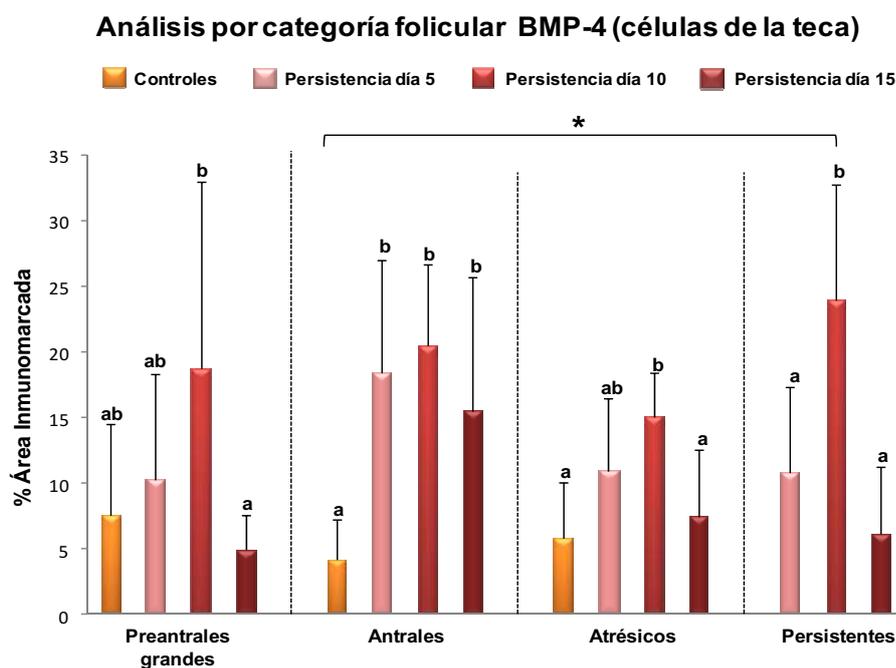


Figura 61: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

En la evaluación de BMP-4 a través de la foliculogénesis dentro de cada grupo en estudio, encontramos que la expresión en células de la granulosa en el grupo control fue significativamente mayor en la categoría de los folículos primarios en relación a las demás estructuras evaluadas. Sumado a esto, no se encontraron diferencias en la expresión en las células de la teca interna. Al comparar la expresión entre las distintas poblaciones celulares dentro de cada categoría folicular, pudimos observar una tendencia a expresarse mayormente en las células de la teca interna (figura 62 y 66).

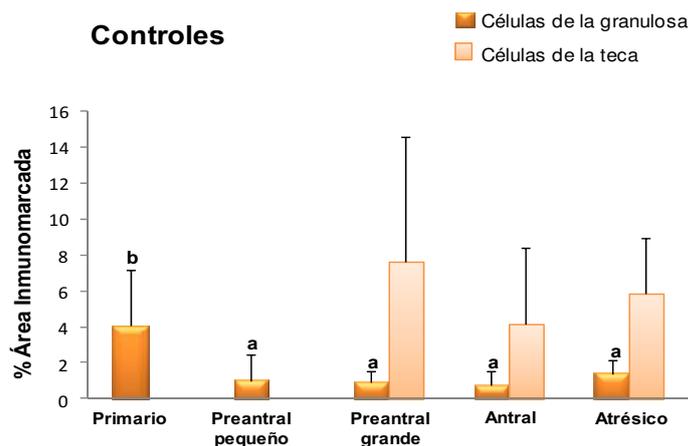


Figura 62: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A los 5 días de persistencia no se evidenciaron diferencias en la expresión de BMP-4 a través de la foliculogénesis, tanto en células de la granulosa como en células de la teca interna (figura 63 y 66). Sin embargo, en células de la granulosa durante el desarrollo folicular a los 10 días de persistencia se determinó una mayor expresión en folículos primarios y preantrales pequeños en comparación con los folículos preantrales grandes, antrales y atrésicos. De manera similar a lo observado en el grupo P5, no se encontraron diferencias de expresión en células de la teca a los 10 días de persistencia. Sí se observó una mayor expresión en células de la teca de folículos antrales y atrésicos en relación a las células de la granulosa de las mismas categorías foliculares (figura 64 y 66).

A los 15 días de persistencia, no se hallaron diferencias en la expresión de BMP-4 en las células de la granulosa. Sin embargo, en las células de la teca interna, los folículos antrales presentaron mayor expresión en relación a los folículos preantrales grandes y persistentes. Además, la expresión en células de la teca de los folículos antrales fue mayor que la encontrada a nivel de las células de la granulosa de la misma población folicular (figura 65 y 66).

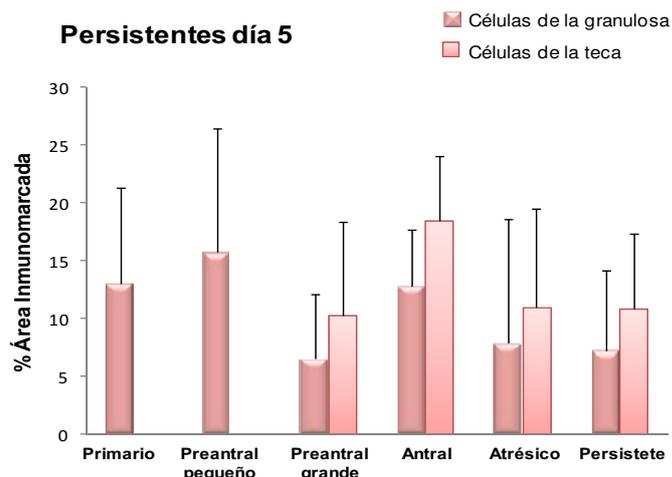


Figura 63: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

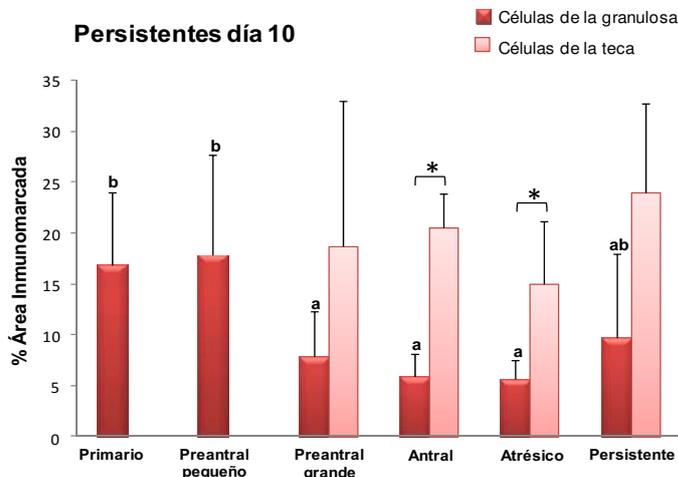


Figura 64: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

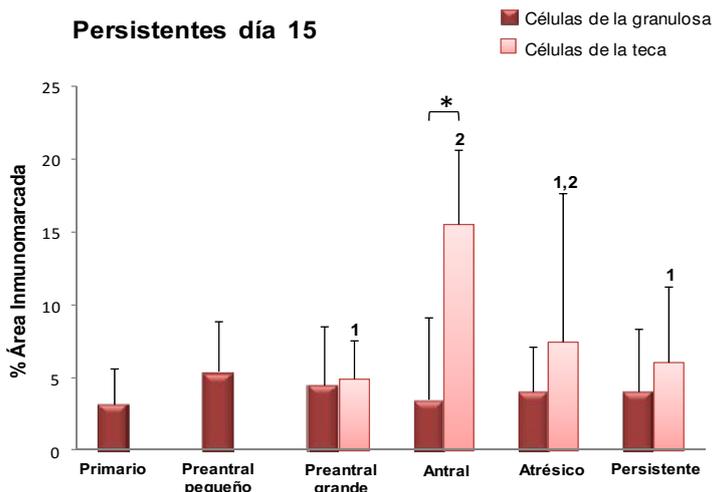


Figura 65: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-4 en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

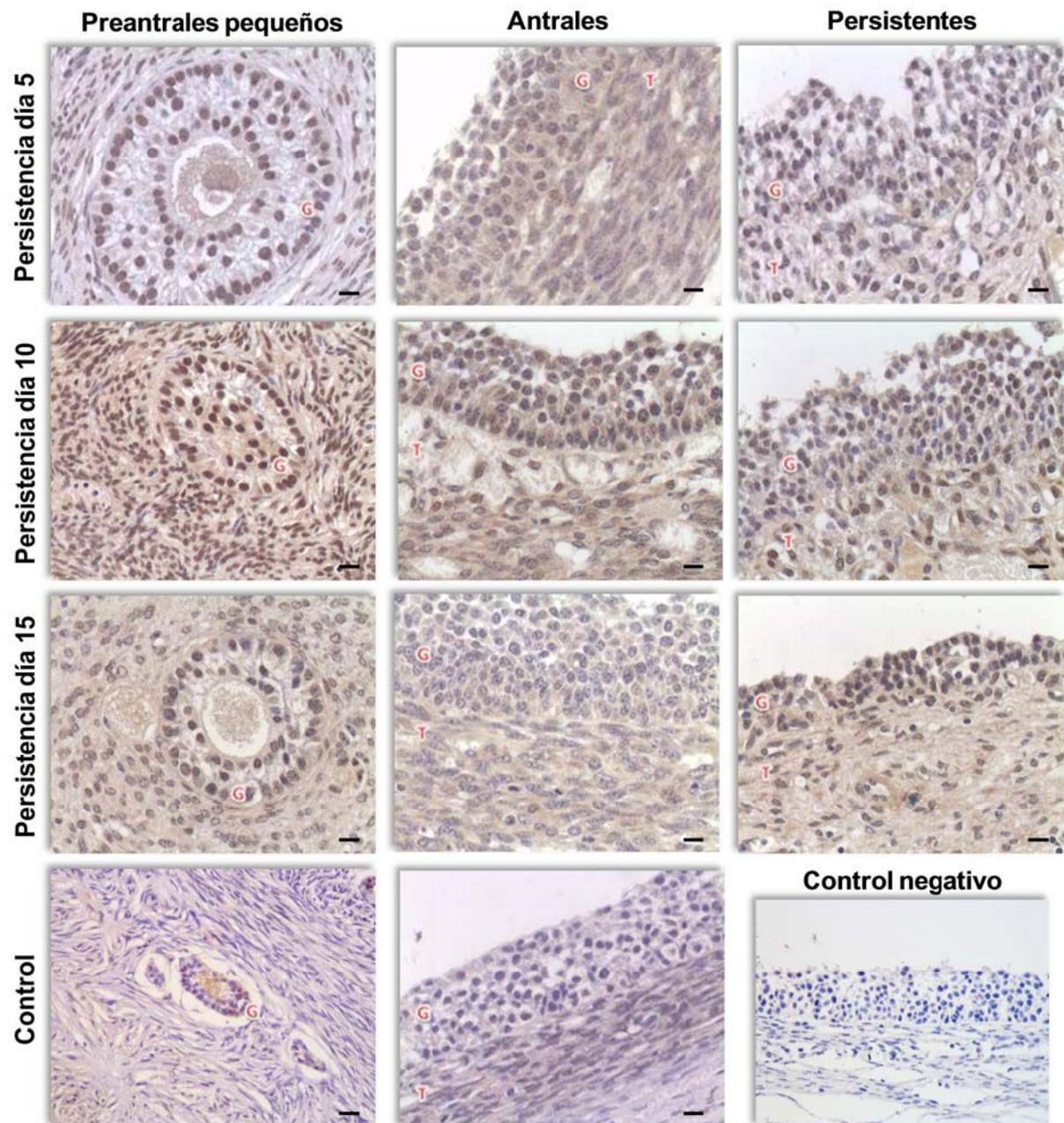


Figura 66: Imágenes representativas de la inmunomarcación de BMP-4 en distintas categorías foliculares de los grupos control, P5, P10 y P15. Se muestra además un control negativo de la inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m.

4.3.3. BMP-6

4.3.3.1. Expresión y localización

El análisis de BMP-6 se realizó sobre muestras provenientes del modelo de inducción de persistencia folicular, correspondientes a los grupos P5, P10 y P15, y al grupo control. Se

detectó marcación positiva para BMP-6 en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares evaluadas dentro de cada grupo.

En el análisis por categoría folicular entre los grupos pudo detectarse que en células de la granulosa los folículos primarios de los grupos P10 y P15 mostraron mayor expresión que los de los grupos control y P5. Los folículos preantrales pequeños del grupo P15 presentaron mayor expresión que los del grupo control. Además, los folículos preantrales grandes de los grupos P10 y P15 evidenciaron una mayor expresión que los controles. De la misma forma, en las capas de células de la granulosa de la categoría antrales y atrésicos hubo diferencias significativas entre el grupo control y los tres grupos tratados, siendo mayor la expresión en estos últimos. No se encontraron diferencias en la expresión en los folículos persistentes de todos los grupos. Al evaluar comparativamente las células de la granulosa entre los folículos persistentes y los antrales controles, encontramos que los folículos persistentes de los tres grupos (P5, P10 y P15) tenían mayor expresión que los folículos antrales controles (estructuras de referencia) (figura 67 y 73).

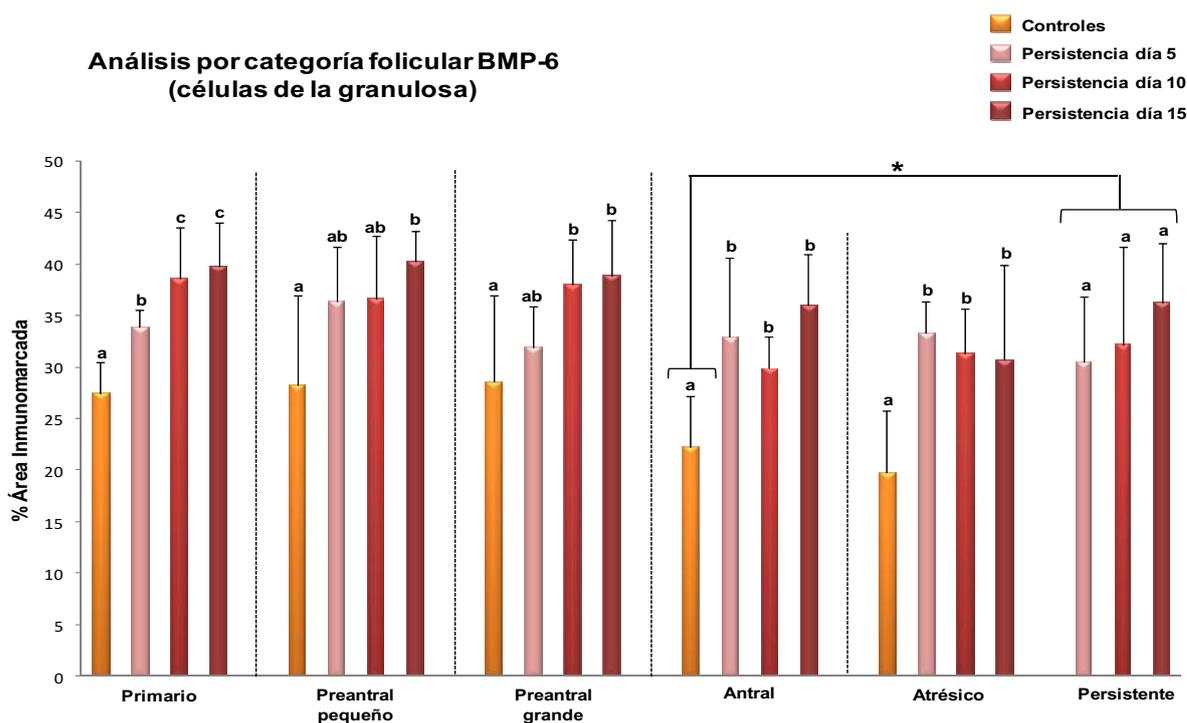


Figura 67: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

A nivel de las células de la teca, solamente se hallaron diferencias en la categoría de folículos antrales donde los tres grupos tratados presentaron mayor expresión que los antrales

pertencientes al grupo control. Sumado a esto, no se encontraron diferencias significativas al comparar la expresión en células de la teca interna de los folículos persistentes de los tres grupos tratados (P5, P10 y P15) con los folículos antrales del grupo control (estructuras de referencia) (figura 68 y 73).

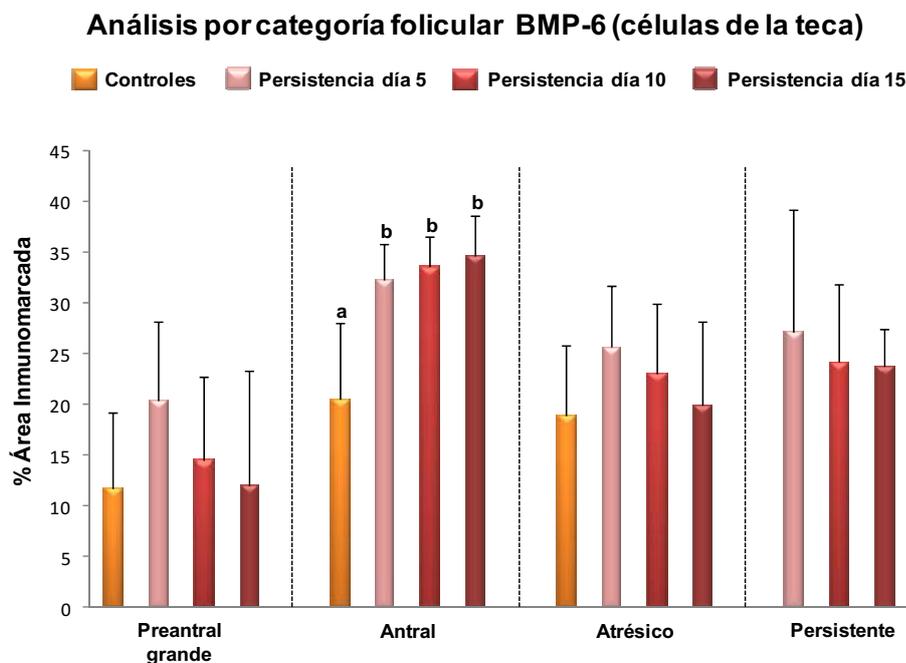


Figura 68: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

Por otra parte, se realizó el análisis de la expresión de BMP-6 a través de la foliculogénesis. En células de la granulosa del grupo control, la expresión fue mayor en los folículos primarios, preantrales pequeños y preantrales grandes en relación a los folículos atrésicos. Además, la expresión en estas mismas células de los folículos preantrales grandes fue mayor que la observada en teca interna de la misma categoría. Para las células de la teca interna la marcación fue significativamente mayor en los antrales respecto a los preantrales grandes (figura 69 y 73).

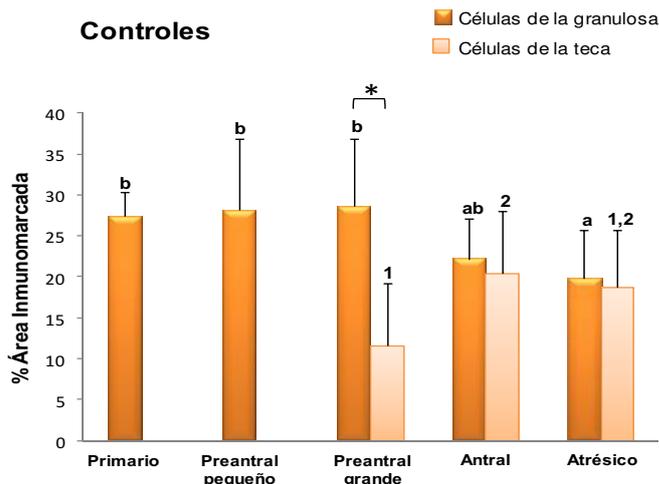


Figura 69: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$).

En el grupo P5 no se encontraron diferencias en la expresión a nivel de las células de la granulosa de todas las categorías foliculares. En la teca interna los folículos antrales mostraron una expresión más alta que los preantrales grandes. Además, ésta última categoría folicular mostró mayor porcentaje de marcación en células de la granulosa respecto a células de la teca interna (figura 70 y 73).

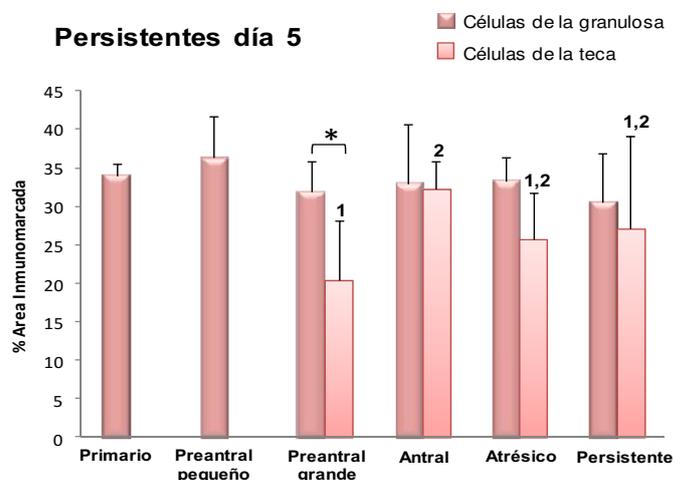


Figura 70: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$).

Por otro lado, el grupo experimental P10, en células de la granulosa mostró un menor porcentaje de marcación para BMP-6 en folículos antrales con respecto a los primarios y preantrales grandes. A nivel de la teca interna los folículos preantrales grandes evidenciaron una menor expresión que los folículos antrales y persistentes. A su vez, estos últimos junto con los folículos atrésicos tuvieron una menor expresión que los folículos antrales. Además, los folículos preantrales grandes expresaron mayor BMP-6 en la granulosa con relación las células de la teca (figura 71 y 73).

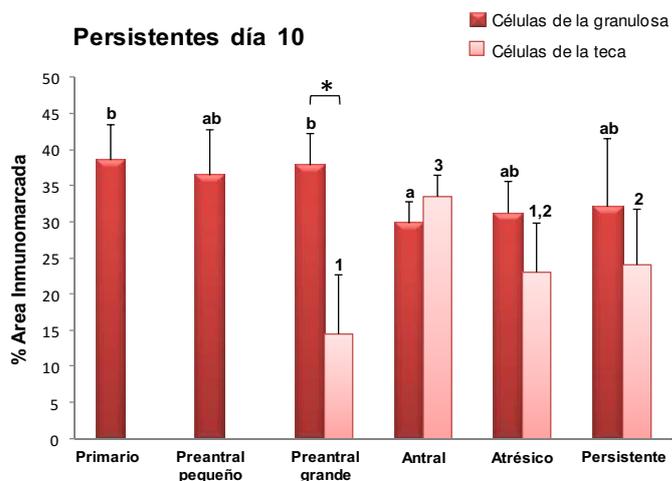


Figura 71: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) y números (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$).

La evaluación de la expresión de BMP-6 a lo largo de la foliculogénesis en el grupo P15 evidenció, en células de la granulosa, una mayor expresión en las categorías de folículos primarios, preantrales pequeños y preantrales grandes con respecto a los folículos atrésicos. En células de la teca interna los folículos preantrales grandes tuvieron menor expresión que los folículos antrales y persistentes. A su vez, estos últimos y los folículos atrésicos tuvieron menor marcación que los folículos antrales. En relación a la expresión en ambas poblaciones celulares, los folículos preantrales grandes, atrésicos y persistentes presentaron una mayor expresión en granulosa respecto a teca interna (figura 72 y 73).

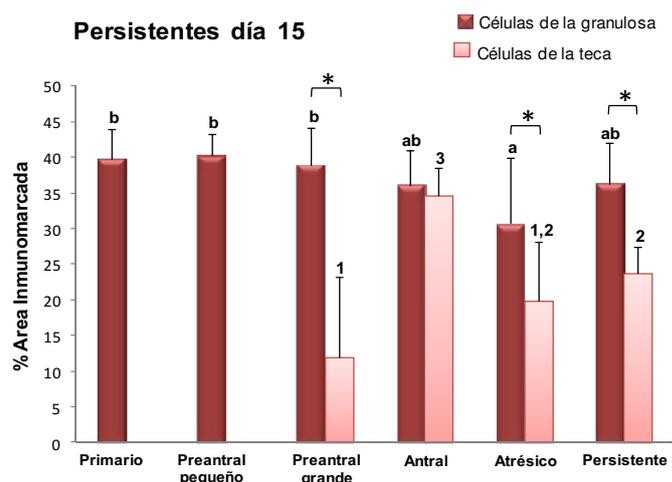


Figura 72: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de BMP-6 en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares y folículos persistentes. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre células de la granulosa y de la teca interna dentro de la misma categoría folicular. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$).

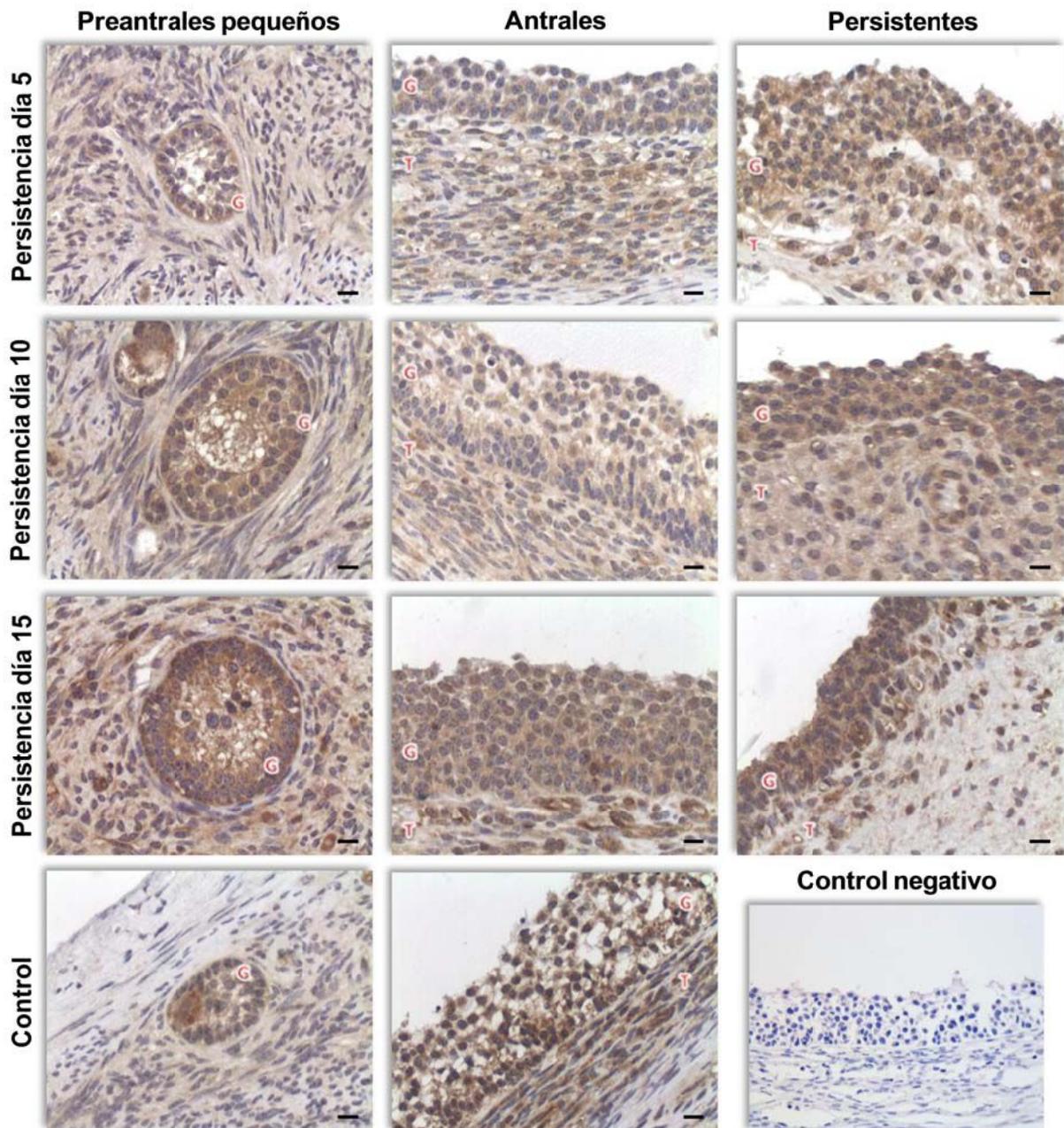


Figura 73: Imágenes representativas de la inmunomarcación de BMP-6 en distintas categorías foliculares de los grupos control, P5, P10 y P15. Se muestra además un control negativo de la inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m.

4.4. Especificidad de los anticuerpos.

El análisis mediante la técnica de western blot permitió detectar intensas bandas positivas de peso molecular apropiado para cada una de las moléculas evaluadas por IHQ. BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-1B fueron detectados como bandas de 32-33 kDa, 47-50 kDa, 55 kDa y 50 kDa, respectivamente (figura 74). En todos los casos pudieron observarse otras bandas

correspondientes a dímeros que han sido descritos en la bibliografía (Israel y col., 1996; Brankin y col., 2005; Sun y col., 2006)

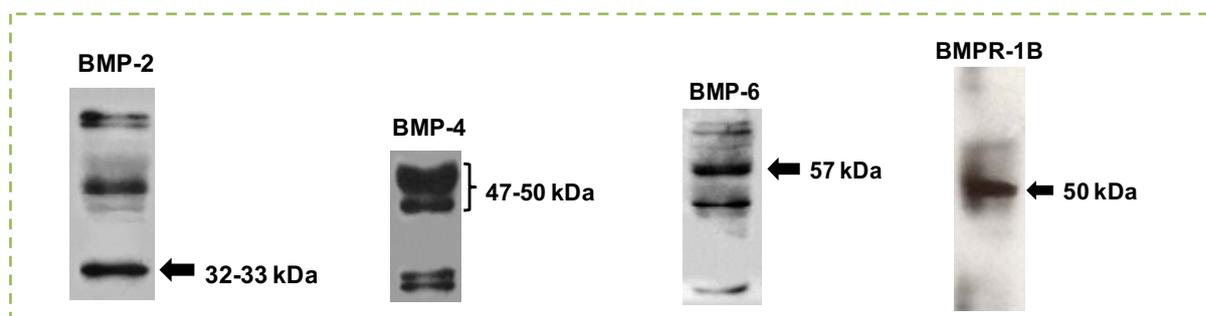


Figura 74: Los inmunoblot muestran la especificidad de los anticuerpos utilizados. Las flechas indican las bandas correspondientes al peso molecular de cada proteína.

4.5. Localización y expresión proteica de AMH en folículos ováricos durante la persistencia folicular, en COD espontánea a campo y controles.

La expresión proteica de AMH se estudió en muestras provenientes del grupo COD espontánea, del grupo control y de los grupos provenientes del protocolo de inducción de folículos persistentes (grupos P5, P10 y P15).

Se detectó marcación positiva para AMH en las células de la granulosa de todas las categorías foliculares dentro de cada uno de los grupos estudiados. En las células de la teca la expresión fue extremadamente baja, con una expresión que fluctuó entre un máximo de 3,64% de marcación en folículos antrales del grupo P10 y un mínimo de 0,03% de marcación en folículo preantrales grandes del grupo control. Por esta razón, los datos de marcación a nivel de la teca interna se consideraron despreciables y no fueron sujetos al análisis correspondiente (figura 81).

En el análisis de la expresión de AMH en células de la granulosa por categoría folicular entre los distintos grupos en estudio, se pudo observar que los folículos primarios de los grupos COD espontánea y controles tenían menor expresión que aquellos de los grupos P5 y P10. A su vez, los folículos primarios del grupo P15 presentaron una expresión menor que los mismos del grupo P10. En la categoría de preantrales pequeños, los folículos del grupo P10 tuvieron mayor marcación que los mismos en los grupos COD espontánea y P5. Además, en las células de la granulosa de las categorías preantrales grandes y antrales no se encontraron diferencias en el análisis por categoría folicular entre los distintos grupos en estudio. De la misma forma, el análisis de las categorías de folículos atresicos y persistentes

evidenció una muy baja marcación a nivel de las células de la granulosa sin hallarse diferencias significativas entre los distintos grupos evaluados (figura 75 y 81).

Al evaluar la expresión de los folículos persistentes de los grupos P5, P10 y P15 y los quistes del grupo COD espontánea en relación a los folículos antrales del grupo control, pudimos observar que estos últimos tuvieron una notable y significativamente mayor expresión en comparación con el resto de las estructuras evaluadas (figura 75 y 81).

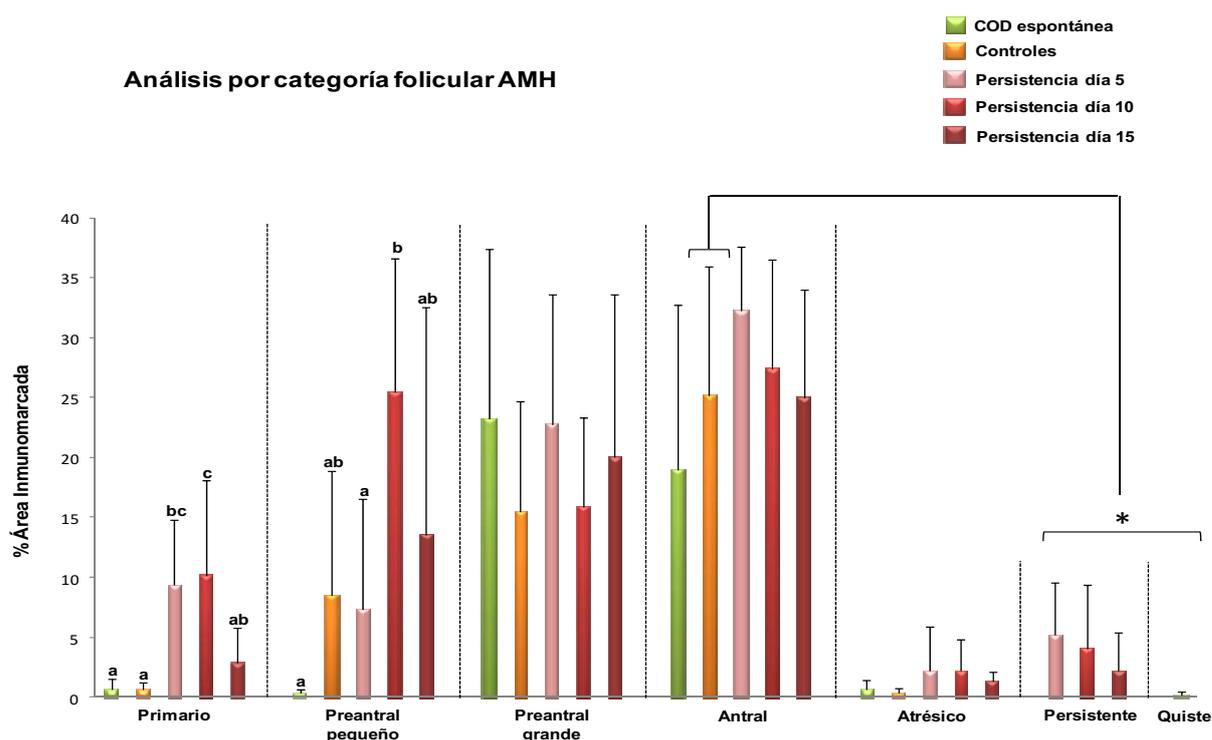


Figura 75: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMH en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

Adicionalmente, se realizó el estudio del patrón de expresión de AMH durante el desarrollo folicular. Así, se evaluaron las dinámicas foliculares en los grupos control, P5, P10, P15 y COD espontánea.

En el grupo control, la expresión de AMH mostró un incremento gradual a través de la foliculogénesis, observándose menor expresión en los folículos primarios, preantrales pequeños y atrésicos en relación a los antrales. Además, los folículos preantrales grandes tuvieron una mayor expresión que los primarios y atrésicos (figura 76 y 81).

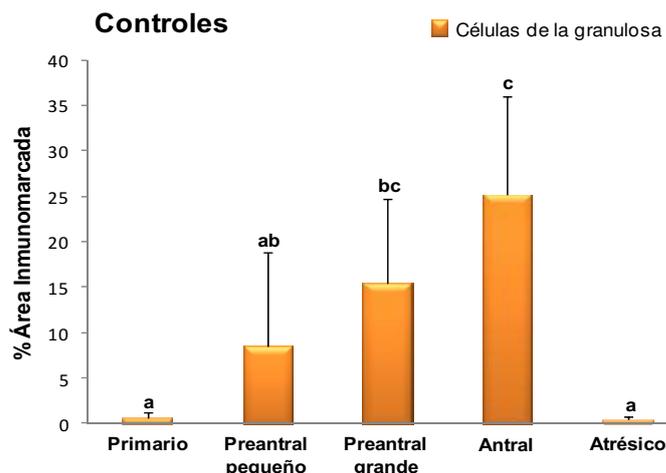


Figura 76: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMH en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$).

En el grupo de COD espontánea los patrones de marcación a través del desarrollo folicular evidenciaron una expresión notablemente mayor en los folículos preantrales grandes y antrales en relación a los folículos primarios y preantrales pequeños, así como también con los folículos atrésicos y quistes (figura 77 y 81).

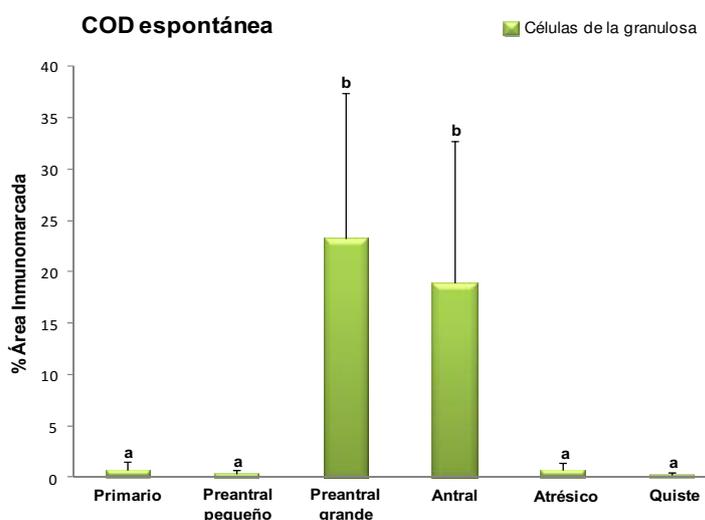


Figura 77: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMH en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$).

En lo que respecta a la persistencia folicular, se observó durante el desarrollo de las estructuras ováricas que en el grupo P5, al igual que el grupo COD espontánea, los folículos en estadios avanzados de desarrollo (preantrales grandes y antrales) tuvieron mayor marcación positiva que los folículos primarios, preantrales pequeños, atrésicos y también que los folículos persistentes (figura 78 y 81).

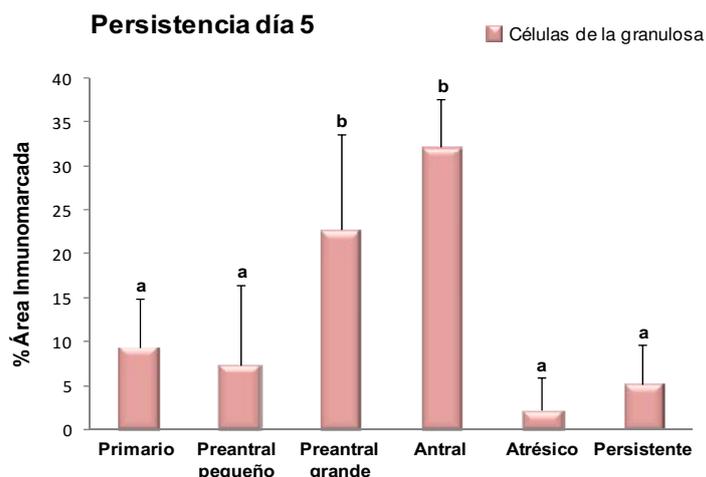


Figura 78: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMH en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$).

Hacia el día 10 del modelo de persistencia folicular la expresión de AMH presentó también un patrón similar al visto a los 5 días de persistencia, con una menor marcación en los folículos primarios, preantrales grandes, atrésicos y persistentes, en relación a los folículos antrales. Sin embargo, los folículos atrésicos y persistentes expresaron una menor marcación proteica que los folículos preantrales pequeños y grandes. De esta misma forma, los folículos primarios tuvieron una menor expresión al compararlos con los folículos preantrales pequeños (figura 79 y 81).

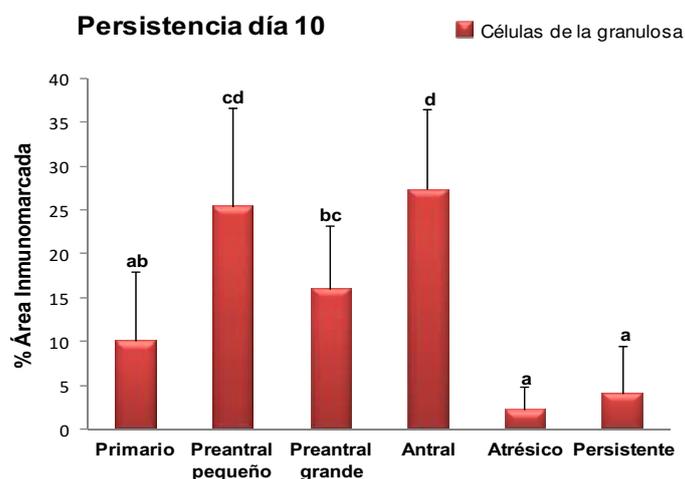


Figura 79: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMH en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$).

Finalmente, el grupo P15 presentó expresiones similares a los grupos anteriores. De esta manera, los folículos preantrales grandes y antrales continuaron mostrando mayor expresión que los primarios, atrésicos y persistentes, no siendo así con respecto a los preantrales pequeños (figura 80 y 81).

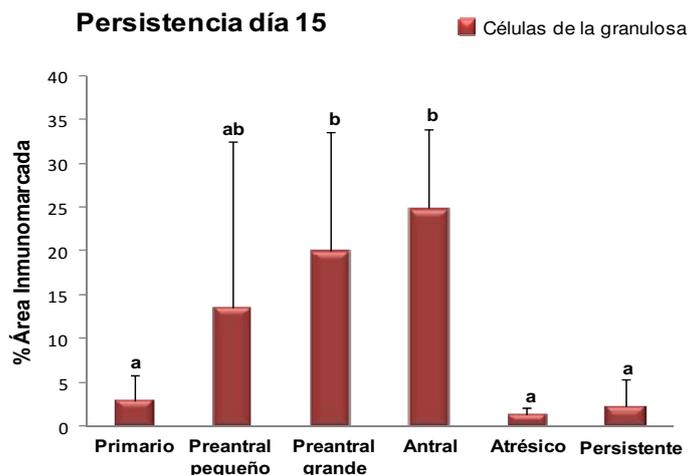


Figura 80: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de AMH en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas dentro de la misma población celular ($p < 0,05$).

4.5.1. Determinación de la concentración de AMH en líquido folicular por ELISA, en los grupos de persistencia folicular inducida, COD espontánea y controles.

Las pruebas realizadas sobre muestras de suero provenientes de casos de COD espontánea a campo, de los grupos P5, P10 y P15, y del grupo control, no pudieron ser evaluadas ya que las concentraciones de AMH presentes en las muestras, no lograron llegar al límite de detección de la técnica. Por otra parte, se pudo evaluar la concentración de AMH en las muestras de líquido folicular provenientes de casos de COD espontánea, de los grupos P5, P10 y P15, y del grupo control.

Las menores concentraciones se observaron en los grupos control, COD espontánea y P5, siendo mayores en los grupos P10 y P15. En este sentido, las concentraciones halladas a los 10 días de persistencia fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) a las encontradas en los grupos control y COD espontánea. Asimismo, los niveles a los 15 días de persistencia fueron también mayores a los hallados en el grupo con COD espontánea (figura 82).

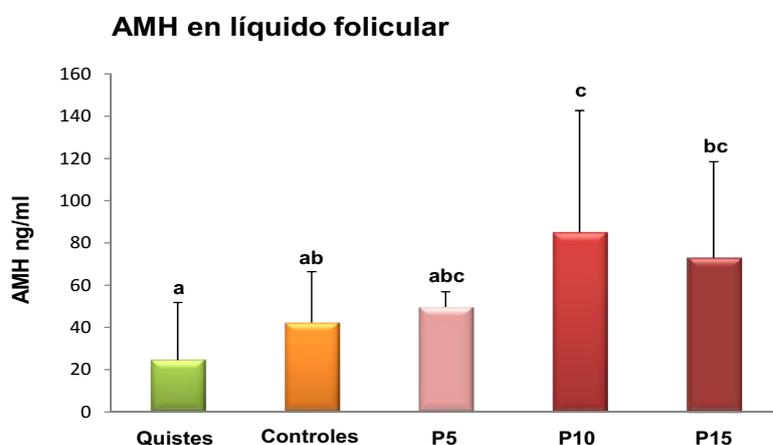


Figura 82 Determinación de AMH en líquido folicular de folículos con 5, 10 y 15 días de persistencia (P5, P10, P15), de quistes espontáneos a campo y controles. Las barras representan la media \pm DE y las letras denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

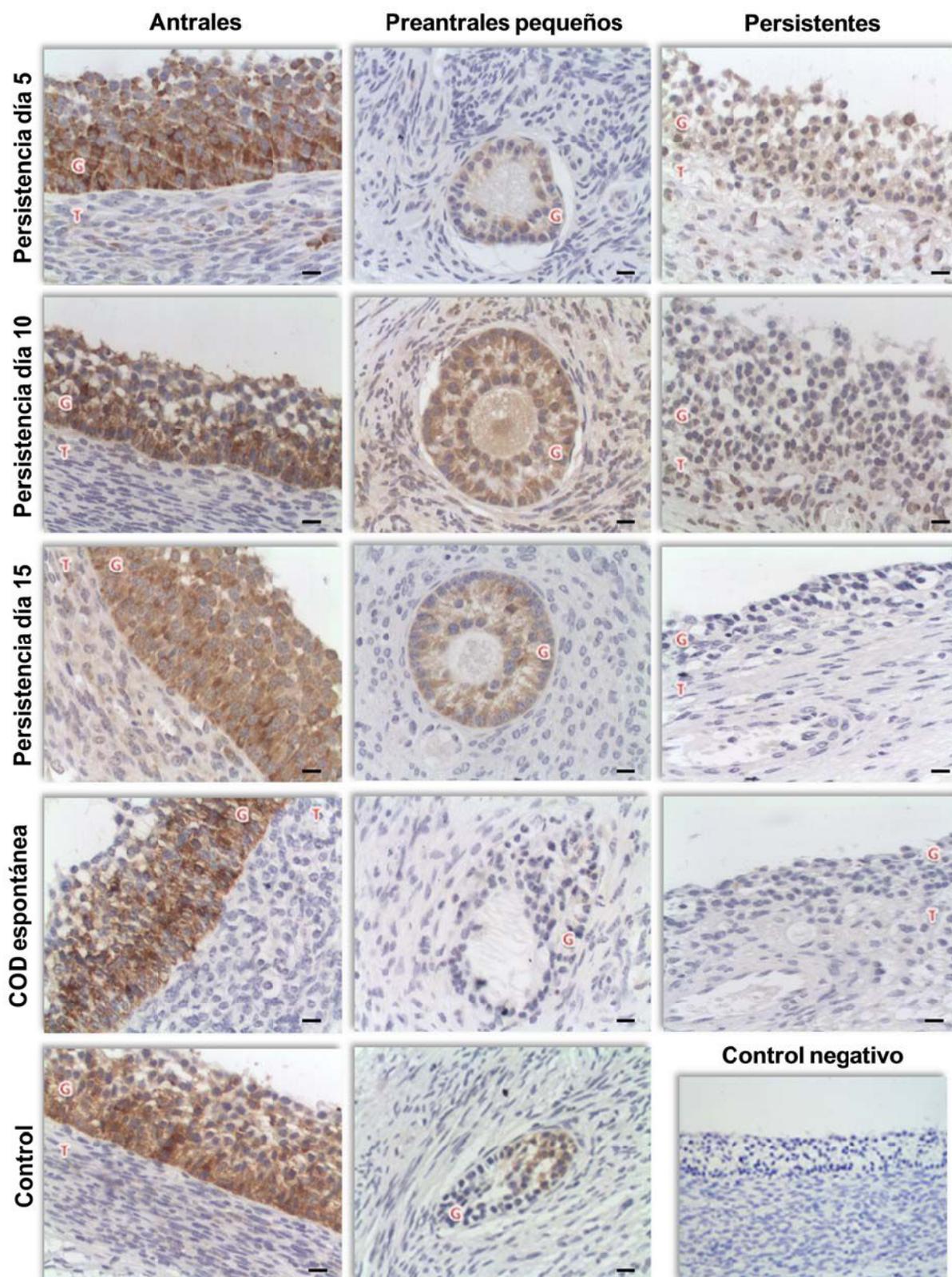


Figura 81: Imágenes representativas de la inmunomarcación de AMH en distintas categorías foliculares de los grupos control, COD espontánea, P5, P10 y P15. Se muestra además un control negativo de la inmunohistoquímica. Capa de células de la granulosa (G), teca interna (T). Barras = 20 μ m.

5. Discusión

5.1. Inducción experimental de la enfermedad quística ovárica: relaciones con hallazgos en la enfermedad espontánea en bovinos

Ha sido claramente documentado que la mayor dificultad a la hora de estudiar la COD en bovinos es el desconocimiento de los estadios iniciales debido a que la formación de quistes sólo puede ser abordada luego de que el folículo atravesó numerosos cambios morfológicos y fisiológicos desconocidos (Roth y col., 2012). En el modelo utilizado, el tratamiento con ACTH generó cambios en las concentraciones séricas de hormonas esteroides. Los niveles de E2, P4 y cortisol aumentaron durante el tratamiento con ACTH mientras que la testosterona no mostró diferencias con los animales controles. Después del tratamiento, los niveles de E2 permanecieron significativamente elevados, mientras que la P4 no incrementó sus valores en los animales tratados, como sí lo hizo en animales del grupo control, los cuales desarrollaron un cuerpo lúteo luego de la ovulación. Este ambiente hormonal y la falta de luteinización de las células foliculares, es propio de la persistencia folicular que ocurre como una etapa previa al desarrollo de la COD (Cook y col., 1990; Hamilton y col., 1995; Ortega y col., 2015). Estos datos son compatibles con los descritos por Dobson y col. (2000), quienes mostraron que los niveles de estrógenos permanecen elevados hasta el día 30 aproximadamente. Es por ello que proponen que dicha hormona junto a la inhibina (pero no la ACTH, cortisol o P4) ejercen un fuerte efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH (Baird y col., 1991) que impide el inicio de una nueva onda de crecimiento folicular. Sin embargo, estos autores no analizaron los niveles de testosterona. En nuestro estudio, la testosterona aumentó en el grupo control hacia el final del muestreo (días 26 a 28), lo que presumiblemente se deba a la presencia de uno o varios folículos de la primera onda de crecimiento folicular post-ovulación. Para esos días (alrededor del día 6-7 del nuevo ciclo estral a partir de la ovulación), estos folículos suelen ser de un tamaño mayor a 10 mm (Bó y Caccia, 2002) y son capaces de producir una importante cantidad de andrógenos en las células de la teca que luego serán aromatizados en la granulosa.

Al momento de la ovariectomía, se encontró una clara asociación entre los niveles en suero y líquido folicular de E2 y P4, tanto en folículos control como en quistes inducidos y espontáneos. A pesar de no hallarse cambios séricos al momento de la ovariectomía, el cortisol mostró diferencias significativas a nivel folicular, con mayores valores en los folículos quísticos, lo que permite sospechar la existencia de un mecanismo de regulación intrafolicular. Las concentraciones de cortisol en líquido folicular fueron aún mayores en

animales tratados con ACTH. Esto coincide con hallazgos previos, dónde se observó la expresión de receptores de ACTH y la capacidad de ACTH de inducir secreción de esteroides y de regular la expresión de enzimas relacionadas como la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en células foliculares ováricas (Amweg y col., 2011, 2013).

En este sentido, no han sido descritas alteraciones en la función adrenal ni en el cortisol sérico entre vacas cíclicas normales y vacas con COD de presentación espontánea (Silvia y col., 2005). En este trabajo, no se encontraron diferencia en los niveles de cortisol una vez finalizado el tratamiento, pero si se hallaron durante el período de tratamiento con ACTH. Por esto podríamos sugerir que no existe evidencia que indique una alteración en la función adrenal en vacas con la enfermedad. Debido a que los glucocorticoides sólo serían sintetizados en la corteza adrenal y viajan sistémicamente por todo el organismo, la presencia de una ruta enzimática local es crucial para modular las concentraciones de la forma activa de dicha hormona (Krozowski y col., 1999; Tetsuka y col., 2003).

En cuanto a la implicancia de estos hallazgos en la patogenia de la COD a nivel del ovario, hemos demostrado que los quistes ováricos están expuestos a altas concentraciones de cortisol y que además, de acuerdo con otros estudios, tienen la capacidad de aumentar aún más estas concentraciones a nivel folicular en respuesta a estímulos específicos (Amweg y col., 2011).

Un retraso en la regresión del folículo luego de la falla en la ovulación es una causa alternativa de formación de quistes, debido a que usualmente debería producirse la atresia y regresión de aquellos folículos que no están destinados a ovular. En este contexto, la capacidad de los glucocorticoides para inhibir la apoptosis de células de la granulosa (Sasson y col., 2001) también puede ser importante en la limitación de atresia de folículos antrales persistentes (y pueden incluso prevenir la degeneración apoptótica de quistes ováricos) (Amsterdam, 2002; Sunak y col., 2007; Komiyama y col., 2008; Salvetti y col., 2010).

Las vacas con quistes presentan altas concentraciones de LH en relación a vacas que ovulan normalmente, particularmente durante los últimos días de la maduración folicular (Hamilton y col., 1995). Los quistes foliculares tienen niveles altos de ARNm que codifica para receptores de LH, particularmente en células de la granulosa de acuerdo a lo descrito por Calder y col. (2001). Sin embargo, estos resultados no coinciden con lo descrito por Marelli y col. (2014) quienes detectaron baja expresión de receptores para LH así como una disminución en la expresión de los receptores de FSH en los quistes en relación a los folículos controles. Las discrepancias posiblemente se expliquen debido a los tipos de folículos

utilizados por Calder y col. (2001) quienes los clasificaron como folículos quísticos en dominantes y no dominantes. Las modificaciones en los receptores de gonadotropinas probablemente influyan en las acciones de las mismas a nivel folicular alterando la esteroidogénesis ovárica. Los folículos destinados a la formación de quistes secretan más E2 que los que ovulan normalmente (Kittok y col., 1974; Hamilton y col., 1995) posiblemente debido a su exposición a altos niveles de LH. Uno de los principales componentes implicados en la formación de quistes, es la falla en los mecanismos de retroalimentación positiva de los E2 para estimular la liberación en oleada de GnRH desde los centros hipotalámicos, con la ausencia concomitante del pico preovulatorio de LH. Este concepto se ve apoyado además, por la observación de que los tratamientos que bloquean el pico preovulatorio de LH en vacas con ciclos normales da lugar a la formación de folículos persistentes que logran desarrollarse hasta el estadio de quistes (Lee y col., 2001).

Existe una fuerte asociación entre las concentraciones intermedias de P4 y la ocurrencia de los quistes foliculares ováricos. La insensibilidad hipotalámica a los E2 puede ser mediada por la concentración de P4 en niveles subluteales en la circulación periférica, cuya fuente podría ser el propio quiste folicular (Silvia y col., 2002; Hatler y col., 2003).

Con respecto a la testosterona, los cambios en su concentración a nivel folicular responden claramente a las modificaciones encontradas a nivel histológico. Como fue descrito por Salvetti y col., (2010), a medida que avanza la persistencia en el tiempo de los folículos, se van perdiendo una gran cantidad células de la granulosa, las que, como consecuencia cambian o pierden 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 (Greenwald y Roy, 1994). Por lo tanto, es claramente comprensible que el líquido folicular de los quistes inducidos contenga mayor cantidad de testosterona que 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.

5.2. Inducción experimental de la persistencia folicular asociada a COD.

Una de las mayores dificultades para estudiar la enfermedad quística ovárica del ganado de leche es debido a que la formación del quiste puede ser solamente reconocida retrospectivamente, después de que el folículo ha sufrido extensos cambios morfológicos y

fisiológicos (Roth y col., 2012). Numerosos estudios acerca de las características histológicas y endócrinas de esta enfermedad fueron realizados con material proveniente de frigorífico, donde la historia reproductiva de los animales así como el tiempo de persistencia de los quistes en el ovario, no son conocidos. En el presente estudio, con dosis bajas de P4, se indujeron folículos persistentes que llegaron con el tiempo a ser estructuras compatibles con la definición de quistes foliculares y por ende asociados a la COD. Durante el estudio, las muestras fueron tomadas conociendo la dinámica de crecimiento folicular, permitiendo un riguroso y más certero análisis de la funcionalidad ovárica y el potencial esteroidogénico. Caracterizamos el medio endócrino y la dinámica folicular que preceden y que continúan al desarrollo de quistes foliculares ováricos inducidos con dosis bajas de P4 en vacas lecheras. La duración del tratamiento con P4 (15 días) nos permitió demostrar, momento a momento, los cambios que se producen en el folículo ovárico durante el proceso de cistogénesis, basándonos en una de las más utilizadas definiciones de quistes foliculares. Los quistes son definidos como estructuras foliculares, presente en uno o ambos ovarios, con un diámetro de al menos 19 mm, con un mínimo de 10 días de persistencia en el ovario en ausencia de tejido luteal (Vanholder y col., 2006). Aunque modelos similares han sido caracterizados, no existe información publicada acerca de los niveles intrafoliculares de esteroides y de las características histológicas a través de un periodo de persistencia a largo plazo de un folículo no ovulatorio. El tratamiento con P4 resultó en cambios en los niveles séricos de gonadotrofinas y hormonas esteroides.

Como en numerosos experimentos previos, la administración de manera continua de dosis bajas de P4 llevó a concentraciones intermedias (subluteales) de esta hormona en sangre que fueron efectivas para suprimir la aparición del pico preovulatorio de LH y por ende la ovulación en vacas lecheras (Kindahl y col., 1979; Roche y Ireland, 1981; Kesner y col., 1982; Lee y col., 1988; Lucy y col., 1990; Sirois y Fortune, 1990; Adams y col., 1992; Savio y col., 1993; Stock y Fortune, 1993; Noble y col., 2000; Hatler y col., 2008).

5.2.1. Concentraciones intermedias de progesterona: su efecto sobre la histomorfometría ovárica.

Durante la inducción experimental, los folículos persistentes incrementaron su tamaño hasta el día 15 de persistencia, mostrando hacia el día 5 y 10 de persistencia, capas de células de la granulosa y de células de la teca similares a aquellas presentes en los folículos

preovulatorios. En contraste, hacia el día 15 de persistencia, ambas capas de células mostraron una reducción en su espesor.

Los quistes espontáneos, en los cuales el tiempo de persistencia en el ovario no es conocido, muestran una variedad de características a nivel histológico, tales como una pérdida parcial o total de las capas de las células de la granulosa, luteinización de células de la teca, hialinización de las capas de células tecales, o una completa ausencia de células diferenciadas (granulosas y/o tecales), dejando sólo la cavidad del quiste rodeada por tejido estromal. Estos han sido descritos y clasificados de diferentes maneras por numerosos autores, quienes también han intentado correlacionar el tiempo de persistencia del quiste con características morfológicas y funcionales (Nakama, 1976; Al-Dahash y David, 1977a,b,c; Lopez-Díaz y Bosu, 1992).

En el modelo de persistencia inducida con P4, observamos que los folículos que pueden potencialmente llegar a ser quistes siguen siendo similares a folículos sanos en sus características, y gradualmente van perdiendo células de la granulosa, pero en ningún caso llegan a mostrar su pérdida completa o la luteinización de las células de la teca, al menos hasta el día 15 de persistencia. Esto fue corroborado por medición en líquido folicular de los niveles de E2 y testosterona en diferentes momentos del protocolo, observándose variaciones en las concentraciones de hormonas esteroides en los estadios más avanzados de persistencia.

Describimos que histológicamente los folículos persistentes, incluso en las etapas de persistencia más avanzadas, mantienen todas las capas foliculares, las células de la granulosa muestran algunos núcleos picnóticos y células con signos de apoptosis, y muchas células sanas se asemejan a aquellas encontradas en folículos antrales grandes normales o en folículos con atresia incipiente (Irving-Rodgers y col., 2001). Por otra parte, demostramos previamente que la expresión de componentes del citoesqueleto (Ortega y col., 2007), así como algunos factores de crecimiento y receptores hormonales (Salveti y col., 2007b; Ortega y col., 2008) en quistes foliculares son similares a aquellos hallados en folículos atrésicos. En efecto, los quistes espontáneos tienen características únicas, que los llevan a comportarse de manera diferente a los folículos sanos o atrésicos. En este sentido hallazgos previos evidencian una alteración en el balance entre factores pro y anti-apoptóticos en los quistes foliculares espontáneos e inducidos con ACTH (Salveti y col., 2010). Sin embargo, las células continúan siendo esteroidogénicamente activas.

Trabajos anteriores han mostrado también la existencia de alteraciones significativas en la tasa de apoptosis en folículos de vacas con quistes ováricos espontáneos o inducidos, y

estos hallazgos apoyan la noción de que la persistencia folicular es un componente importante de la patogénesis de la COD (Isobe y Yoshimura, 2007; Salvetti y col., 2010). Cómo se describió, el retraso de la regresión folicular después de la ovulación es una componente importante en esta enfermedad, porque un folículo preovulatorio que no puede ser ovulado no crecerá más si logra atresarse inmediatamente, por lo tanto, no se formaría un folículo quístico. La capacidad esteroidogénica y de producción de factores de crecimiento y otras moléculas son características propias de los folículos que persisten sin atresarse (quistes) y que contribuyen en gran medida a su propio mantenimiento y probablemente influyan sobre los folículos en desarrollo impidiendo la ovulación de un nuevo folículo preovulatorio. Esto lleva a la generación de un círculo vicioso que tal vez tenga un origen a nivel hipotálamo-hipofisario pero que luego es mantenido debido a los cambios ováricos ocurridos por la presencia de esta estructura folicular persistente.

5.2.2. Concentraciones intermedias de progesterona: su efecto sobre los niveles de gonadotrofinas y de hormonas esteroides

5.2.2.1. Gonadotrofinas

La frecuencia pulsátil de LH a los días 5 y 10 de persistencia folicular en las vacas tratadas fue similar a aquella ocurrida en la fase folicular y significativamente mayor que aquella ocurrida en la mitad de la fase lútea en los animales controles, confirmando que los cambios en la frecuencia pulsátil de LH ocurren con rapidez después de la exposición a dosis bajas de P4 (Roberson y col., 1989; Savio y col., 1993; Stock y Fortune, 1993; Custer y col., 1994; Bergfeld y col., 1996; Bridges y Fortune, 2003). La continuidad de esta alta frecuencia de pulsos más allá de la fase folicular coincide con el hecho de que la formación de un nuevo quiste está asociada a cambios en la secreción de LH (Hampton y col., 2003; Vanholder y col., 2006). También, teniendo en cuenta que la concentración de los pulsos en los animales tratados durante la persistencia folicular fue más alta que aquella encontrada en la fase lútea, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la hipersecreción de LH puede jugar un rol en la persistencia de los quistes foliculares (Hampton y col., 2003).

Aunque la frecuencia pulsátil fue similar durante la fase folicular en los grupos controles y tratados, la concentración y amplitud de los pulsos fueron más altas en controles que en tratados. Esta información sugiere que la falla en la ovulación podría estar relacionada

a una reducción en la concentración y amplitud de los pulsos de LH más que a cambios en la frecuencia de los pulsos. Además, la frecuencia pulsátil se incrementó a los 5 días de persistencia, siendo muy similar a la frecuencia de pulsos presente en la fase folicular de los animales controles, pero sin que se produzca la ovulación. De hecho, la concentración y amplitud de los pulsos a los 5 días de persistencia fueron menores que aquellas encontradas en la fase folicular de las vacas controles, sugiriendo nuevamente que los parámetros de concentración y amplitud son esenciales para inducir normalmente la ovulación.

Por otro lado, las concentraciones de FSH no fueron afectadas por el tratamiento con P4, y sólo se observaron cambios relacionados con la ocurrencia de ondas de crecimiento folicular propias del ciclo estral en controles. Estos datos sugieren que los mecanismos de retroalimentación funcionan correctamente y que el E2 (no la P4) es el principal regulador de la secreción de FSH, con elevaciones que acompañan a cada onda de crecimiento folicular. Estos resultados están en acuerdo con reportes anteriores que indican que los cambios en los patrones de secreción y concentraciones de FSH podría no ser un factor de importancia en la etiología de la persistencia folicular y los quistes ováricos (Cook y col., 1990; Hamilton y col., 1995; Ribadu y col., 2000).

5.2.2.2. Esteroides gonadales

En animales controles y tratados, las concentraciones de E2 en suero fueron similares hasta un corto periodo de tiempo posterior a la ovulación, cuando el crecimiento folicular prolongado en los animales tratados produjo una elevación en los niveles de E2, los cuales alcanzaron su más alta concentración en el día 10 de persistencia. Este incremento en las concentraciones de E2 ha sido asociado con un incremento en la frecuencia pulsátil de LH, como fue observado en el día 10 de persistencia, siendo similar a aquellas concentraciones detectadas en las etapas tempranas de desarrollo de un estadio de dominancia prolongada (Stock y Fortune, 1993; Bridges y Fortune, 2003). Además, las concentraciones séricas de E2 indican que la producción de este esteroide desde los folículos persistentes declina hacia el día 11 de persistencia, en acuerdo con los cambios histológicos observados en las células de la granulosa de los folículos con 15 días de persistencia, como se discute más adelante. Amweg y col. (2013) describieron una relación entre los valores de E2 en proestro y los quistes espontáneos e inducidos con ACTH, por lo que las concentraciones observadas en el día 15 de persistencia podrían ser similares a aquellas encontradas en quistes. Estos datos destacan la

conveniencia de nuestro modelo para estudiar los cambios histológicos y hormonales durante el proceso de formación de quistes, por sobre la mayoría de otros estudios que han sido realizados con quistes provenientes de casos espontáneos a campo o de frigorífico, donde la fase de persistencia, que precede a la formación de los quistes, es desconocida.

Después de la ovulación, las concentraciones de P4 se incrementaron en los controles, reflejando la luteinización del folículo ovulatorio y el surgimiento de un CL activo. En los animales tratados, las concentraciones de P4 se mantuvieron alrededor de 2 ng/ml, excepto cuando las vacas recibieron un nuevo dispositivo intravaginal, donde las concentraciones de P4 alcanzaron valores de aproximadamente 4 ng/ml por un día (día 5 y 12 de persistencia). Estos valores de P4 coinciden con los perfiles plasmáticos descritos previamente para dispositivos de liberación de P4 similares (Sirois y Fortune, 1990; Stock y Fortune, 1993; Custer y col., 1994; Bigelow y Fortune, 1998; Noble y col., 2000; Bridges y Fortune, 2003; Kim y col., 2004; Gümen y Wiltbank, 2005; Hatler y col., 2008).

Las concentraciones en E2 fueron constantes entre el proestro y el día 10 de persistencia, decreciendo significativamente hacia el día 15 de persistencia. Este incremento en las concentraciones séricas podría reflejar la producción de E2 por las células de la granulosa sanas hasta el día 10 de persistencia. En este sentido, ha sido propuesto que el gran diámetro de los folículos persistentes, va acoplado a un incremento en la masa de tejido esteroideogénico, y que los folículos persistentes tienen capacidades esteroideogénicas similares a las de folículos antrales dominantes normales (Bigelow y Fortune, 1998). También, la alta frecuencia de pulsos de LH podría promover la producción de andrógenos foliculares, llevando a una síntesis incrementada de E2 (Fortune, 1986), y esto ha sido asociado con la patogénesis de los quistes foliculares (Hatler y col., 2003).

La P4 mostró un incremento en sus concentraciones intrafoliculares en los folículos preovulatorios, pero se mantuvo baja en los folículos persistentes. Este incremento ha sido descrito como un evento clave en el mecanismo que conlleva a la ovulación. Mientras el mecanismo de estas hormonas no ha sido totalmente elucidado, la P4 parece estimular la transformación de prostaglandina E2 a PGF2 α y la inducción de metaloproteinasas (Curry y Smith, 2006).

Hemos descrito previamente cambios significativos en los receptores de esteroides, incluyendo el receptor de P4 (Salveti y col., 2007b, 2012; Alfaro y col., 2012). En este contexto, ha sido demostrado que la P4 estimula la diferenciación de las células de la granulosa (Schams y Berisha, 2002; Schams y col., 2003). Los animales con COD usualmente

presentan alteraciones en la expresión del receptor de P4, que sumado a los niveles intermedios de P4, puede inducir cambios en los mecanismos de proliferación/apoptosis en las células foliculares, contribuyendo de esta forma a la aparición de folículos persistentes en el ovario (Salvetti y col., 2010).

La testosterona muestra un incremento gradual desde la etapa preovulatoria hasta el día 15 de persistencia, con una correlación significativa entre las concentraciones séricas e intrafoliculares. Estos resultados sugieren que los folículos persistentes fueron capaces de mantener su habilidad de síntesis de andrógenos por un período extendido de tiempo, pero hacia el día 15 de persistencia podría haber comenzado a decrecer su capacidad para sintetizar estrógenos (aromatización), como ha sido descrito previamente, tanto en folículos persistentes como en quistes foliculares (Kojima y col., 2003; Amweg y col., 2013). Por lo tanto, esta deficiente capacidad de aromatización de los andrógenos, por cambios morfo-funcionales en las células de la granulosa, podría ser responsable del incremento en las concentraciones de testosterona que caracteriza a los quistes foliculares en la vaca lechera (Dobson y Smith, 1995; Amweg y col., 2013).

Este estudio es el primero en documentar la relación entre las concentraciones séricas e intrafoliculares de 17OHP4. Los niveles séricos de esta hormona se incrementaron gradualmente en animales con folículos persistentes, con las mayores concentraciones en el día 15 de persistencia. Este incremento fue acompañado por un aumento correlativo en las concentraciones en el líquido folicular, mostrando que los folículos son aún metabólicamente activos y que esto está relacionado a los hallazgos histológicos observados. Ha sido descrito que la estrona y el E2 son los principales esteroides formados desde acetato-1-C¹⁴ en el folículo maduro (Ryan y Smith, 1961), mientras que Δ 4-androstenediona, dehidroepiandrosterona y 17-hidroxiprogesterona son las principales hormonas producidas en los folículos atrésicos bajo idénticas condiciones experimentales (Mori, 1975). Hasta hoy, la 17OHP4 no ha sido estudiada en relación a la reproducción a nivel del ovario bovino. En contraste, ha sido documentado que las mujeres con Síndrome Poliquístico Ovárico (PCOS, del inglés: *Polycystic Ovarian Syndrome*) exhiben hiperreactividad de 17OHP4 a las pruebas de LH y gonadotrofina coriónica humana (hCG) (McCartney y col., 2004). El mecanismo concreto responsable de esta respuesta en la esteroideogénesis en las mujeres con PCOS no ha sido aún establecido, aunque se ha propuesto que una anomalía intrínseca dentro de las células de la teca está asociada con la sobreproducción de andrógenos ováricos (Pasquali y col., 2007). En este sentido, el incremento de 17OHP4 observado en suero y líquido folicular

fue en paralelo con aumentos en los niveles de testosterona y ambas hormonas presentaron patrones de concentración similares.

5.2.3. Conclusiones parciales

En términos de la implicancia de estos hallazgos en la patogénesis de la COD, este estudio sugiere que los ovarios quísticos son formados cuando la adenohipófisis falla en liberar el pico preovulatorio de LH en respuesta a un incremento preovulatorio de estradiol (Silvia y col., 2002). Ha sido propuesto que el defecto primario reside en el hipotálamo, el cual falla en liberar un pico de GnRH en respuesta al estímulo de E2 y que esta insensibilidad hipotalámica puede estar dada por concentraciones intermedias de P4 circulantes (Silvia y col., 2002; Vanholder y col., 2006). En este sentido, las concentraciones periféricas de P4 en vacas con quistes foliculares aparecen frecuentemente en un rango intermedio (0.1–1.0 ng/ml) (Carroll y col., 1990; Hamilton y col., 1995; Yoshioka y col., 1996; Calder y col., 1999). También, ha sido claramente demostrado que la mayoría de los quistes foliculares están asociados con concentraciones intermedias de P4 al momento de su detección (Hatler y col., 2003). Los folículos persistentes inducidos por este modelo parecen imitar adecuadamente a los quistes foliculares que surgen de forma espontánea en las vacas lecheras, proveyendo una nueva herramienta para estudiar los estadios tempranos de formación de la COD.

En conclusión, estos hallazgos indican que los quistes ováricos son similares en muchas características a los folículos persistentes inducidos por la administración prolongada de P4. El perfil endócrino, la dinámica de crecimiento y las características histológicas de los folículos persistentes son análogas a las de los quistes espontáneos, confirmando así el rol local de las concentraciones intermedias de P4 en la patogénesis de la COD y en los mecanismos regulatorios de la función ovárica

5.3. Expresión de integrantes de la subfamilia de las BMPs en ovarios de animales normales y con persistencia folicular inducida con P4, COD espontánea y COD inducida con ACTH.

Los miembros de la familia de las BMPs han sido propuestos como importantes reguladores locales del desarrollo folicular y por lo tanto su expresión normal o alterada podría intervenir en la regulación de las funciones que posee el ovario (Shimasaki y col.,

2004, Knight y Glister, 2006; Glister y col., 2010, 2013). En el presente estudio, encontramos que las BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-1B son expresadas en células de la granulosa y células de la teca de diferentes estructuras foliculares en el ovario bovino y que esta expresión difiere entre los animales controles y aquellos que poseen folículos persistentes, COD espontánea o COD inducida con ACTH.

5.3.1. Expresión de BMP-2

En el grupo control hallamos una expresión de BMP-2 constante a lo largo de las diferentes categorías foliculares, tanto en células de la granulosa como de la teca. Asimismo, pudimos observar la expresión de ARNm para BMP-2 en las células de folículos antrales estrogénicamente activos. De manera similar a lo observado en los controles, en los tres grupos con persistencia folicular (P5, P10 y P15) la expresión de BMP-2 se mantuvo constante a través de la foliculogénesis, existiendo una mayor expresión en células de la granulosa respecto a las células de la teca, situación esta que se repitió en el grupo con COD espontánea. Estos resultados están parcialmente de acuerdo con aquellos hallados por Glister y col. (2010) quienes examinaron la expresión de BMP-2 y observaron que la abundancia de ARNm y la inmunoreactividad de esta proteína fueron más altas en células de la granulosa que en células de la teca. Además, estos resultados están en concordancia con los estudios llevados a cabo por Kayani y col. (2009). Por el contrario, Fatehi y col. (2005) encontraron expresión de BMP-2 en células de la teca pero no en granulosa de folículos antrales bovinos, estando también en folículos de transición, primarios y preantrales. Por otro lado, Juengel y col. (2006) detectaron por PCR y por hibridación *in situ* ARNm de BMP-2 en células de la granulosa ovinas. Ellos fueron capaces de detectar ARNm de BMP-2 en células de la granulosa de folículos antrales en regresión pero no en la granulosa de folículos antrales sanos. Glister y col. (2010), observaron que la expresión de BMP-2 en células de la granulosa decrecía alrededor de 10 veces en folículos de 7-8 mm estrogénicamente activos, sin encontrar diferencias con los folículos estrogénicamente inactivos (en regresión). En células de la teca, ellos observaron que la abundancia de los transcritos de BMP-2 seguía un patrón inverso al visto en las células de la granulosa, aunque todos los niveles de expresión fueron más bajos. Adicionalmente, estos autores encontraron una correlación negativa entre BMP-2 y la regulación positiva de otros transcritos claves para el metabolismo de células de la granulosa provenientes de folículos estrogénicamente activos, como CYP19A1, inhibina A,

inhibina BA e inhibina BB. En contraste con los hallazgos de Glister y col. (2010), Selvaraju y col. (2013) observaron en bovinos una regulación específica de la etapa de la onda folicular para BMP-2, así como para los ARNm de los receptores tipo I y II de BMP-2, evidenciando una mayor expresión en la etapa de folículo preovulatorio. El ARNm de BMP-2 en las células de la granulosa incrementa su expresión después de la selección del folículo dominante (en muestras colectadas en etapas preovulatorias y de dominancia media) en relación a los folículos dominantes colectados durante las etapas de dominancia temprana o a folículos obtenidos en etapas previas a la desviación folicular (Selvaraju y col., 2013). Ellos postularon que una regulación temporal del ARNm de BMP-2 apoya la idea de un potencial rol regulatorio local en el desarrollo de los folículos dominantes.

De manera interesante evidenciamos una mayor expresión en los quistes con respecto a los folículos de las etapas iniciales del desarrollo folicular (primordiales, primarios, preantrales pequeños y antrales pequeños), en los grupos de COD inducida con ACTH y espontánea. Los quistes foliculares y folículos persistentes son considerados como estructuras no luteinizadas, que poseen bajas concentraciones de P4 y altas de E2 (Stock y Fortune, 1993; Vanholder y col., 2006). Ha sido reportado que la BMP-2, que se encuentra expresada en quistes y folículos persistentes, forma parte junto a BMP-4, BMP-6, BMP-7 y BMP-15 de las denominadas “BMPs inhibidoras de la luteinización” y actúan inhibiendo la producción de P4 y estimulando la de E2 de folículos en fase folicular de crecimiento (Shimasaki y col., 2003; Otsuka, 2010). Por otro lado, los grupos con distintos días de persistencia y quistes presentaron niveles de expresión de BMP-2 alterados para diferentes categorías foliculares desde preantrales pequeños hasta atrésicos. Estos resultados muestran la presencia de BMP-2 en folículos más allá del período preovulatorio (folículos persistentes y quísticos), así como también la existencia de modificaciones en la expresión en los grupos con folículos persistentes y con COD. Estos cambios pueden alterar mecanismos fisiológicos de importancia radical en el ovario, como la esteroidogénesis (Souza y col., 2002; Glister y col., 2004, 2010, 2011), proliferación celular (Souza y col., 2002; Brankin y col., 2005) y desarrollo folicular (Webb y col., 2007).

5.3.2. Expresión de BMP-4

En relación a BMP-4, observamos ARNm en folículos antrales estrogénicamente activos, y expresión proteica en células de la granulosa y células de la teca interna de todos

los folículos ováricos estudiados. La expresión proteica en células de la granulosa fue disminuyendo a lo largo de la foliculogénesis, patrón que se repitió en los grupos de persistencia folicular, COD inducida con ACTH y de COD espontánea. La expresión en células de la teca aunque fue mayor que aquella encontrada en células de la granulosa, también disminuyó en relación al desarrollo folicular. Fatehi y col. (2005) no encontraron expresión de BMP-4 en las células de la granulosa de folículos en crecimiento, a pesar de haber demostrado expresión de ARNm en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales menores a 8 mm de diámetro. Por otro lado, Kayani y col. (2009) y Glister y col. (2010) demostraron la expresión de ARNm y la inmunoreactividad para esta proteína tanto en las capas de células de la teca como de la granulosa, aunque sus transcritos fueron más abundantes en células de la teca que en células de la granulosa, estando esto último en concordancia con evidencia anterior obtenida a partir de IHQ en bovinos (Glister y col., 2004) y más actual en otras especies (Khalaf y col., 2013). Sumado a esto, Juengel y col. (2006) no encontraron expresión de BMP-4 utilizando hibridación *in situ* en células de la granulosa de ovejas, pero sí lo hicieron por RT-PCR en *pools* de células de la granulosa.

En el presente estudio pudimos distinguir un incremento en la expresión proteica de BMP-4 a través de la foliculogénesis en las células de la granulosa del grupo COD espontánea en relación a todas las categorías foliculares del grupo control y algunas (primarios y antrales) del grupo COD inducida con ACTH. En las células de la teca de los folículos antrales pequeños y antrales del grupo COD espontánea, se pudo observar un incremento en la expresión de BMP-4 en relación al grupo control. Adicionalmente, también en células de la teca, los quistes espontáneos mostraron un incremento de BMP-4 comparado con los folículos antrales pequeños y antrales del grupo control. Sin embargo, este hallazgo no coincide con la disminución observada en su ARNm. Esto probablemente sea debido a la composición celular de las muestras en las cuales se analizó la expresión de ARNm (compuestas por células de la granulosa y de la teca); y el tipo de folículos antrales utilizados como control en los estudios de ARNm (estrogénicamente activos). Además, debido al tiempo de persistencia de los quistes espontáneos, es probable que parte del ARNm fuese degradado por las enzimas presentes en el líquido folicular (Borbolis y Syntichaki, 2015). Por otra parte, en los grupos con persistencia folicular inducida, pudimos observar que la expresión de BMP-4 en células de la teca de los folículos antrales de los grupos P5, P10 y P15, estaba aumentada en relación a los antrales controles y que este aumento se mantenía en los folículos persistentes de P10, los cuales expresaron más BMP-4 que los folículos antrales controles (estructuras de

referencia). Además, en células de la granulosa los folículos persistentes de P10 también presentaron expresiones mayores que los antrales del grupo control. Actualmente es conocido que factores de crecimiento derivados de células de la teca como BMP-4 y BMP-7 afectan directamente la función de las células de la granulosa (Lee y col., 2001; Kayamori y col., 2009; Shimizu y col., 2012a), en este sentido ha sido documentado en estudios sobre ovarios de ratas, que una caída en la expresión en células de la teca de BMP-4 y BMP-7 es una causa particular de atresia (Erickson y Shimasaki, 2003). Asimismo, ha sido estudiado que BMP-4 y BMP-7 suprimen la apoptosis de células de la granulosa (Kayamori y col., 2009; Shimizu y col., 2012a). Estos antecedentes sugieren que las BMPs derivadas de células de la teca pueden actuar como factores que promueven la supervivencia de los folículos a través de su habilidad de mejorar la proliferación celular y suprimir la apoptosis (Shimizu y col., 2012a). En el presente estudio, observamos expresión aumentada de BMP-4 tanto en células de la granulosa como en células de la teca de las distintas poblaciones foliculares en relación a los grupos control, a partir de esto podemos suponer que este aumento en los niveles de expresión puede estar relacionado a un incremento en la proliferación celular, una disminución de la apoptosis, (Salveti y col., 2010, Shimizu y col., 2012a,b) y a un aumento en E2 y disminución de P4 (Shimasaki y col., 2003, Otsuka, 2010; Amweg y col., 2013). Siendo todas estas características, propias de los folículos persistentes así como también de los quistes foliculares.

5.3.3. Expresión de BMP-6

El ARNm para BMP-6 pudo ser detectado en folículos antrales estrogénicamente activos. Complementariamente, si bien la expresión proteica de BMP-6 fue en general alta en todas las estructuras y grupos analizados, pudimos observar algunas diferencias durante la foliculogénesis y entre las distintas categorías foliculares. En este sentido, evidenciamos que la expresión en células de la granulosa del grupo control disminuye a nivel de los folículos antrales y atrésicos en relación a los folículos preantrales grandes, presentando un patrón de mayor expresión en los primeros estadios de desarrollo folicular. Este mismo patrón se evidenció en las células de la granulosa de los tres grupos del protocolo de persistencia folicular (P5, P10 y P15). Asimismo, si bien en el grupo COD inducida con ACTH hubo algunas modificaciones, la expresión en células de la granulosa se comportó de manera similar, presentando los folículos antrales y atrésicos, junto con los preantrales pequeños y de

transición una menor expresión que los preantrales grandes. Por otro lado, tanto en los grupos control, COD inducida y COD espontánea, la expresión en células de la teca se comportó de manera opuesta a la observada en células de la granulosa, evidenciándose los menores niveles de inmunomarcación en los folículos preantrales grandes y los mayores en las categorías de antrales, atrésicos y quistes. De igual manera, en los grupos P10 y P15 los folículos preantrales grandes y persistentes presentaron menores niveles de expresión que los folículos antrales. Nuestros hallazgos coinciden con los estudios llevados a cabo por Glister y col. (2004) donde mediante IHQ en cultivos celulares de folículos antrales bovinos pudieron observar que la mayor inmunomarcación para BMP-6 se encontraba a nivel de las células de la granulosa y ovocitos, siendo más débil en células de la teca. En estudios posteriores, ellos estudiaron la expresión de ARNm de BMP-6 a través de PCR en tiempo real y no encontraron diferencias en la abundancia relativa de ARNm tanto en células de la granulosa como de la teca durante el desarrollo folicular (folículos de 1 a 18 mm). Además, coincidiendo con los resultados aquí presentados, ellos detectaron por IHQ expresión proteica positiva para BMP-6 tanto en células de la granulosa como en células de la teca (Glister y col., 2010). Estos resultados también coinciden con los obtenidos por Kayani y col. (2009).

En el grupo de COD espontánea durante el desarrollo folicular no se observaron diferencias en la expresión de BMP-6 en las células de la granulosa, con excepción de los folículos quísticos que mostraron niveles de inmunomarcación mayores a las demás categorías foliculares. De manera similar, la expresión de BMP-6 en células de la granulosa mostró un incremento a medida avanza el tiempo de persistencia folicular, así los folículos antrales y atrésicos de los grupos P5, P10 y P15 presentaron mayores niveles que las mismas categoría en los controles. Además, los folículos persistentes de los tres grupos y los quistes del grupo COD espontánea presentaron mayor inmunomarcación que los folículos antrales controles (estructuras de referencia). En células de la teca esta expresión mayor en los grupos con persistencia sólo se observó en la categoría de folículos antrales. Recientemente, Polat y col. (2015) evaluaron, en bovinos, las concentraciones de BMP-6 en líquido folicular y su expresión proteica en folículos preovulatorios (controles), folículos atrésicos del diestro (desarrollados en un ambiente rico en P4) y en quistes tipo 2 luteales (Braw-tal y col., 2009). Ellos pudieron observar que tanto los quistes como los folículos atrésicos presentaban en el líquido folicular una concentración menor de BMP-6 que los controles preovulatorios. Además, tanto en células de la granulosa como de la teca, ellos hallaron una muy baja inmunomarcación de BMP-6 en los quistes en relación a los folículos atrésicos y controles

preovulatorios dónde esta fue mayor. Si bien, estos hallazgos no coinciden con los de la presente tesis, hay que considerar que ellos estudiaron estructuras que se desarrollan en un ambiente de alta concentración de P4 como son los quistes tipo 2. Sin embargo, sí coinciden los datos obtenidos por ellos en los folículos antrales preovulatorios, dónde la BMP-6 mostró altas concentraciones en líquido folicular y alta expresión proteica a nivel celular. Tanto los folículos persistentes como los quistes foliculares evaluados presentaron niveles elevados de E2 y bajos de P4, datos que son coincidentes con reportes previos sobre este tema (Hatler y col., 2003; Vanholder y col., 2006; Probo y col., 2011). Estas dos estructuras patológicas devienen de un folículo antral que falla en su mecanismo ovulatorio, siendo una condición compartida entre las dos la ausencia de tejido luteal en el ovario. Sumado a esto, como ya se ha hecho mención en esta tesis, BMP-6 junto con otras BMPs son considerados factores inhibidores de la luteinización (Shimasaki y col., 2003; Otsuka, 2010) por lo que es esperable el hallazgo de alta expresión en los folículos persistentes y quistes que poseen como una de sus características, no estar luteinizados.

5.3.4. Expresión de BMPR-1B

La expresión proteica de BMPR-1B en el grupo control se mantuvo en niveles constantes a lo largo del desarrollo folicular, siendo esto evidente en todas las categorías foliculares tanto en la capa de células de la granulosa como de células de la teca interna. En cambio, su expresión decreció durante la foliculogénesis en el grupo de COD inducido con ACTH, siendo este patrón parcialmente repetido en el grupo de COD espontánea, donde los folículos antrales mostraron niveles similares a los observados en la categoría de folículos preantrales. Sin embargo, los folículos quísticos de ambos grupos con COD, mostraron mayores niveles de expresión que los folículos antrales pequeños controles.

En los bovinos, ha sido descripto que la expresión de ambos BMPR-1B y BMPR-2 se incrementa progresivamente en las células de la granulosa mientras decrecen ligeramente en las células de la teca durante el desarrollo de los folículos antrales (Glister y col., 2010). Esto sugiere un cambio progresivo en el balance de las respuestas de las células de la granulosa y de la teca a ligandos intrafoliculares como las BMPs que utilizan una combinación particular de estos receptores tipo I y tipo II para poder actuar. Los ligandos que se conoce reclutan a esta combinación de receptores tipo I y tipo II incluyen a BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 y BMP-15 (Glister y col., 2010). De esta manera, las células de la granulosa llegan a ser más

sensibles a medida aumenta el tamaño de los folículos, mientras las células de la teca lo hacen a la inversa; responden menos a medida que el desarrollo folicular avanza (Glister y col., 2010).

5.3.5 Conclusiones parciales

Es conocido que las acciones de las BMPs sobre la función ovárica varían entre distintas especies. Bajo condiciones *in vitro*, se han obtenido resultados muy interesantes a partir de células ováricas de bovinos, rata y humanos. Los tratamientos de células de la teca bovinas con BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-7 promueven una profunda supresión de la expresión de la enzima CYP17A1, tanto en condiciones de cultivo basales como con estimulación de LH. Igualmente, las BMPs reducen la expresión de otros transcritos claves para el proceso de esteroidogénesis como lo son LHCGR, StaR, CYP11A1 y HSD3 β , aunque lo hacen en un menor grado que a la supresión sobre CYP17A1 (Glister y col., 2005, 2011). Una característica de los quistes foliculares en las vacas lecheras son las altas concentraciones de andrógenos que poseen (Dobson y Smith, 1995; Amweg y col., 2013), siendo esto similar en los folículos persistentes donde los niveles de testosterona aumentan a medida avanza la persistencia. Estos resultados parecerían no coincidir con los altos niveles de BMPs encontrados y su efecto anti-androgénico. Sin embargo, existen circuitos de autorregulación local tanto en células de la granulosa como de la teca, donde son las BMPs las que estimulan a sus propios antagonistas (proteínas de unión), como lo son noggina, gremlina, cordina y folistatina que juegan un papel importante en la regulación de la actividad de las BMPs, evitando un exceso de señalización (Glister y col., 2011), este mecanismo podría explicar la síntesis de andrógenos en presencia de altos niveles de BMPs, los cuales se acumularían a medida los folículos persistentes pierden células de la granulosa y concomitantemente, capacidad para aromatizar andrógenos a E2.

Estudios previos realizados por Selvaraju y col. (2013) demostraron en bovinos los efectos estimulatorios de BMP-2 sobre la producción de E2 por parte de las células de la granulosa cultivadas *in vitro*. A pesar de esto, el efecto sobre la producción de P4 fue negativo y no encontraron efectos estimulatorios sobre el número de células de la granulosa. Estudios realizados por otros autores observaron receptores funcionales/vías de señalización para BMP-4, BMP-6 y BMP-7 en células de la granulosa bovinas (Glister y col., 2004). El tratamiento con cualquiera de estos ligandos promueve un incremento en la acumulación de

proteínas SMAD1 en su forma fosforilada y mejora la producción de E2 basal y la estimulada por IGF-1 (Glister y col., 2004). Los tratamientos con BMP-4 y BMP-7 disminuyen los niveles de apoptosis en células de la granulosa bovinas (Kayamori y col., 2009; Shimizu y col., 2012a), y los tratamientos con BMP-2 de células de la granulosa de humanos produce incrementos en el receptor de FSH y el ARNm de la enzima aromatasa (Shi y col., 2009).

A sido demostrado que BMP-4, BMP-6 y BMP-7 *in vitro* pueden actuar sobre células de la teca suprimiendo la producción de andrógenos estimulada por LH y mejorar la secreción por parte de las células de la granulosa de E2, inhibina-A, activina-A y folistatina (Glister y col., 2005, 2013) coincidiendo con los resultados obtenidos por Shi y col. (2009) en células de la granulosa humanas.

Tomando toda esta información en conjunto, podemos concluir que las BMPs generan un incremento de E2, una disminución en los niveles de andrógenos y P4, y considerando que en los quistes espontáneos así como en los folículos persistentes hay un incremento en la expresión de BMP-4 y BMP-6 y una expresión sostenidamente alta de BMP-2; es plausible postular que el incremento en la expresión de estas BMPs contribuye al desbalance hormonal a nivel local, que previamente fue observado en los animales con COD (Amweg y col., 2013). Animales con persistencia folicular inducida, COD espontánea, e inducida con ACTH poseen bajos niveles séricos e intrafoliculares de P4, y niveles elevados de E2 similares a los existentes en los folículos preovulatorios normales (Amweg y col., 2013). Los altos niveles de BMP-4 y BMP-6 y los sostenidos niveles de BMP-2 en los quistes espontáneos y folículos persistentes, pueden contribuir a este desbalance. Por otro lado, se observaron altos niveles de testosterona en líquido folicular de COD espontáneos e inducido con ACTH y folículos persistentes de día 15, y de cortisol en los dos grupos con COD. Hemos evidenciado previamente que otros miembros de la familia TGF- β e IGF están alterados en ovarios de animales con esta enfermedad (Ortega y col., 2008, 2015; Rey y col., 2010; Rodríguez y col., 2011, 2013, 2015; Stangaferro y col., 2014; Matiller y col., 2014). Este desequilibrio hormonal puede afectar, entre otros, el balance entre proliferación y apoptosis, así como entre los factores pro y anti-apoptosis en folículos ováricos de animales con COD. Ha sido previamente confirmado por nuestro grupo de trabajo, así como por otros autores, que el balance proliferación/apoptosis está alterado en los quistes de animales con COD espontánea e inducida con ACTH favoreciendo la persistencia del folículo debido a una baja proliferación de las células foliculares y a una baja tasa de apoptosis celular (Isobe y Yoshimura, 2007; Salvetti y col., 2010).

Basado en nuestros resultados, podemos postular que el delicado balance entre los componentes del sistema de BMPs está alterado. Esto contribuiría al mecanismo que lleva a prolongar la persistencia folicular, con bajos niveles de apoptosis y proliferación en estas estructuras (Isobe y Yoshimura, 2007; Salvetti y col., 2010) y con una alteración en la esteroidogénesis en respuesta al estímulo gonadotrófico (Amweg y col., 2013).

Finalmente, las diferencias encontradas entre animales con quistes espontáneos, inducidos con ACTH y folículos persistentes, son probablemente debido a diferencias en las condiciones del ambiente celular y al tiempo de persistencia de los quistes, lo que podría influir en la expresión de estos componentes.

5.4. Expresión de AMH en folículos preovulatorios normales, en animales con COD espontánea y en la persistencia folicular inducida.

Este trabajo es el primero en evaluar la expresión de AMH durante un protocolo de persistencia folicular a largo plazo inducido con dosis bajas de progesterona y correlacionarlo con el comportamiento de AMH en las estructuras quísticas de aparición espontánea del ganado lechero.

Detectamos expresión de AMH en las células de la granulosa de todas las categorías foliculares dentro de cada uno de los grupos estudiados. Asimismo, pudimos observar que dicha expresión fue mayor en los estadios de folículos preantrales grandes y antrales. Esto concuerda con los hallazgos de Rico y col. (2011) quienes mediante IHQ detectaron que la AMH se expresaba en folículos preantrales, antrales, y en células del *cumulus oophorus*, sin encontrarse diferencias en la intensidad de marcación entre los distintos grupos evaluados por ellos. En el presente trabajo, los altos niveles de expresión encontrados en las categorías de folículos preantrales y antrales fueron significativamente mayores que los hallados en los folículos persistentes de los tres grupos (P5, P10 y P15) y en los folículos atrésicos de todos los grupos evaluados (COD espontánea, persistentes y controles), de la misma manera diversos autores han observado que la expresión de AMH en células de la granulosa decrece a medida que avanza el estado de atresia de los folículos (Knight y Glister, 2006; La Marca y Volpe, 2006; Rico y col., 2009, 2011). También, hemos observado que la expresión de AMH fue significativamente más baja a nivel de las células de la granulosa de los folículos quísticos y persistentes en relación a los folículos antrales controles. Esta diferencia en la marcación no se observó al comparar los quistes espontáneos con los folículos persistentes, siendo esta

similitud en la expresión de AMH un punto en común entre estas dos entidades patológicas. Además de estos hallazgos, al evaluar las concentraciones de AMH en las muestras de líquido folicular, observamos que los grupos con 10 y 15 días de persistencia presentaban niveles significativamente mayores a los encontrados en los grupos control y con COD espontánea. Un estudio realizado por Monniaux y col. (2008) reportaron que tanto las concentraciones de AMH en líquido folicular como el nivel de expresión de su ARNm en células de la granulosa de folículos antrales grandes y quistes no presentaban diferencias significativas. De una manera similar El-Sheikh Ali y col. (2013) no encontraron diferencias en los niveles plasmáticos de AMH entre muestras provenientes de animales con COD espontánea a campo y aquellos provenientes de animales con ciclos estrales normales. Si bien, algunos estudios establecen que los niveles intrafoliculares y plasmáticos de AMH no pueden ser usados como biomarcadores para conocer la existencia de los quistes foliculares en el ovario de las vacas (Monniaux y col., 2008; Kitahara y col., 2012; El-Sheikh Ali y col., 2013), ellos no evaluaron los niveles en líquido folicular durante las etapas iniciales de formación de los quistes. Así, como fue señalado anteriormente, los folículos persistentes obtenidos en el modelo de inducción de persistencia folicular presentaron altas concentraciones de AMH a los 10 y 15 días de persistencia. Ahora bien, estos niveles de AMH no fueron acompañados por altos porcentajes de expresión proteica en las células de la granulosa. En este sentido, en un trabajo realizado por Polat y col. (2015) en bovinos, observaron que las concentraciones en líquido folicular de AMH en quistes no fueron significativamente diferentes a las halladas en folículos antrales en regresión que se desarrollan durante el diestro (alta P4), pero sí lo fueron en relación a los folículos preovulatorios, donde la AMH fue significativamente más baja. Además, y al igual que en nuestro trabajo, al estudiar la expresión de AMH tanto en folículos quísticos como en folículos en regresión (diestro) mediante IHQ pudieron observar que la inmunomarcación fue muy débil en todas las capas de células foliculares. Sin embargo, es conveniente considerar que ellos evaluaron quistes tipo 2 (Braw-tal y col., 2009) los cuales presentan altas concentraciones de P4, en este sentido aunque los folículos persistentes de los grupos P10 y P15 no poseen altas concentraciones de P4, sí presentan niveles elevados de 17OHP4 en líquido folicular y suero que podrían actuar sobre el mismo receptor que P4 (Blackmore y col., 1990; Ashley y col., 2006; Manuk y col., 2011), por lo tanto 17OHP4 estaría actuando de manera similar a las concentraciones de P4 existentes en los quistes tipo 2.

Por otro lado, debe considerarse que las BMP-6 y BMP-4 mejoran la secreción de AMH en folículos de 5 a 10 mm, e incrementan los niveles de su ARNm en células de la

granulosa de folículos de 3 a 5 mm y de 5 a 10 mm. Inversamente, FSH reduce la secreción y la expresión de AMH en estas mismas poblaciones foliculares. Estos datos evidencian un antagonismo entre FSH y BMPs en la regulación de la expresión y producción de AMH por las células de la granulosa de folículos bovinos (Rico y col., 2011). Estos resultados pueden ser relacionados con nuestros hallazgos, dónde es factible observar un incremento de BMP-4 y BMP-6 en las células de la granulosa y de la teca de la mayoría de las categorías foliculares dentro de los grupos de persistencia folicular en relación a los folículos controles. Estas influencias por parte de los factores locales (BMPs) podrían estar controlando en parte el aumento de AMH en el líquido folicular. Actualmente es aceptado que varios mecanismos postranscripcionales como son la tasa de secreción y la unión a proteínas de la matriz extracelular podrían regular la acumulación de los factores de crecimiento a nivel del antro folicular (Gumienny y Padgett, 2002; Monniaux y col., 2008).

La AMH ejerce un efecto negativo sobre la transición de los folículos primordiales a primarios y consecuentemente el desarrollo de folículos preantrales (Knight y Glister, 2006). Asimismo, Durlinger y col. (2001) evidenciaron que AMH inhibe el crecimiento dependiente de FSH de los folículos antrales. Además, es conocido que la medición de AMH plasmática puede utilizarse para conocer la reserva folicular ovárica (recuento de folículos antrales) (Ireland y col., 2011) y que esta reserva está altamente correlacionada con el desempeño reproductivo futuro de los bovinos (Rico y col., 2012). Las altas concentraciones de AMH encontradas en el líquido folicular de los folículos con 10 y 15 días de persistencia podrían estar ejerciendo un efecto negativo sobre los folículos en estadios iniciales de crecimiento, evitando su pasaje a fases más avanzadas de desarrollo (preantrales), generando con esto una caída en el desarrollo de nuevas ondas foliculares o una alteración en la capacidad de respuesta a las gonadotrofinas hipofisarias. Asimismo, AMH inhibe la enzima CYP19A1 y el LHR inducido por FSH en células de la granulosa de folículos antrales (Di Clemente y col., 1994; Monniaux y col., 2008). A través de estas funciones AMH reduce la respuesta a FSH de los folículos preantrales y antrales pequeños y de esta manera ejerce un rol negativo en el reclutamiento cíclico y el proceso de selección del folículo dominante (Durlinger y col., 2002a,b; Visser y Themmen, 2005; Knight y Glister, 2006).

6. Conclusiones

Las vacas lecheras son animales seleccionados para producir grandes cantidades de leche y para lograr estos altos niveles de producción ponen en funcionamiento numerosos procesos fisiológicos con altas demandas de energía, la cual debe ser ingerida con la dieta. Esta gran demanda energética está acompañada del estrés que sufre el animal como resultado del manejo, rutina de ordeño, clima (alta temperatura y humedad), enfermedades, hacinamiento, entre otros. Esta combinación de alta producción, déficit energético y estrés ponen en peligro la funcionalidad de los sistemas orgánicos del animal, siendo el sistema reproductor uno de los más sensibles y por ende de los primeros en afectarse. Para mantener la alta productividad, las vacas deben parir con un intervalo cercano a los 13 meses entre partos, con la dificultad que implica la aparición de enfermedades relacionadas al tracto reproductor, tales como anestro, retardo en el reinicio de la actividad ovárica, aparición de COD y persistencia folicular asociada a la COD. Todo esto impide que la preñez ocurra en un intervalo tan ajustado, lo que repercute en la rentabilidad del tambo a través de la disminución de la producción de litros de leche y del aumento en los costos debido a tratamientos veterinarios. Por este motivo existen justificaciones de índole productivo-económicas para desarrollar modelos que permitan dilucidar los procesos por los cuales se desencadenan las alteraciones de origen ovárico en vacas lecheras, y de esta manera determinar su etiopatogenia y desarrollar posibles medidas preventivas y/o terapéuticas. Los resultados obtenidos en esta tesis aumentan el estado actual del conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad quística ovárica y los mecanismos involucrados en la persistencia folicular.

De esta manera, con los resultados obtenidos y la discusión de los mismos considerando los aportes de otros autores, obtuvimos las siguientes conclusiones:

El estudio de los mecanismos que conllevan a la falla en el proceso de ovulación y la persistencia folicular es una de las llaves para comprender la patogénesis de la COD. En el presente estudio, con dosis bajas de P4, se indujeron folículos persistentes que, al cabo de 15 días de persistencia a partir del momento esperado de ovulación, llegaron a ser estructuras compatibles con la definición de quistes foliculares y por ende asociados a la COD. Así, los folículos persistentes siguen siendo similares en su histomorfometría a los folículos sanos, aunque gradualmente van perdiendo células de la granulosa sin llegar a presentar pérdida completa o luteinización. Esta conservación de capas de células funcionales le permite al folículo persistente responder a los cambios en el ambiente hormonal. Las dosis subluteales

de P4 indujeron un patrón característico en la pulsatilidad de LH, con frecuencias similares a las observadas en la fase folicular del ciclo estral, pero de concentración y amplitud menor. Estos hallazgos sugieren que la formación y persistencia de los quistes pueden estar asociadas a pulsos de LH de menor amplitud y concentración. Además, este tipo de pulsatilidad de LH permitió la síntesis, por parte de células de la granulosa, de altas concentraciones de E2 que fueron máximas hacia el día 10 de persistencia y descendieron a niveles similares a los encontrados en proestro (aún elevados) en el día 15 de persistencia. Estos niveles séricos e intrafoliculares de E2 fueron acompañados por niveles crecientes de sus precursores, andrógenos, que fueron máximos hacia el día 15 de persistencia. Estos hallazgos fueron similares a los observados en los casos de COD espontánea e inducida con ACTH. Además, esta es la primera vez que se documentan las concentraciones séricas e intrafoliculares de la 17OHP4 tanto en folículos preovulatorios controles como en folículos persistentes, las cuales aumentaron en estos últimos progresivamente hasta los 15 días de persistencia. Esta hormona podría actuar de manera similar a la P4 alterando los mecanismos de regulación intraováricos.

Ha sido previamente demostrado que las BMPs cumplen un rol importante en los mecanismos que regulan el mantenimiento y desarrollo de las células foliculares así como en la comunicación entre las diferentes poblaciones que componen el ovario mediante mecanismos paracrinos y autocrinos. Es por esto que una expresión alterada podría modificar las funciones normales del ovario y de esta manera formar parte de procesos patológicos como la persistencia folicular y la COD. En el presente estudio pudimos observar expresión de BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-1B en células de la teca y de la granulosa de todas las categorías foliculares y grupos estudiados. Individualmente pudimos observar que BMP-2 se mantuvo elevada en los folículos más allá del período ovulatorio (folículos persistentes y quistes), presentando además diferencias de expresión en diferentes categorías foliculares entre los distintos grupos estudiados. Por su parte, BMP-4 presentó una expresión elevada en todas las categorías del grupo COD espontánea, siendo particular la mayor expresión en los quistes espontáneos y folículos persistentes del grupo P10 en relación a los folículos antrales controles. Además la BMP-6, mantuvo niveles elevados de expresión en las células de la granulosa de todos los grupos estudiados, y llamativamente fueron mayores en los quistes del grupo COD espontánea y folículos persistentes en relación a los antrales controles. La alta expresión de las BMPs estudiadas fue acompañada con una elevada expresión de BMP-1B en los quistes inducidos con ACTH y espontáneos que favorecería la acción de las BMPs más allá del período ovulatorio. Es de destacar que hemos encontrado diferencias en la expresión

de los componentes de las BMPs desde estadios muy tempranos del desarrollo folicular tanto en grupos con COD como con persistencia folicular. Estos hallazgos se relacionan con los encontrados para AMH, donde las altas concentraciones en líquido folicular a los 10 y 15 días de persistencia podrían actuar negativamente sobre los efectos inducidos por FSH, y así ejercer un rol negativo en el reclutamiento cíclico de folículos en estadios iniciales de desarrollo y la selección del folículo dominante, afectando directamente los mecanismos de desarrollo folicular y ovulación. Considerando el alto grado de reincidencia de la COD, los cambios a nivel del desarrollo folicular temprano pueden afectar la foliculogénesis futura y contribuir a la aparición recurrente de esta enfermedad. La acción sinérgica de las BMPs y AMH a través de la conservación de sus funciones sobre la esteroidogénesis, proliferación y apoptosis celular y desarrollo folicular puede lograr un medio interno con características que permitan al folículo preovulatorio sostener su estructura y funcionalidad más allá del período ovulatorio favoreciendo la persistencia folicular y la aparición de COD. La AMH mantuvo una expresión notablemente mayor en los estadios de folículos preantrales grandes y antrales de todos los grupos, siendo muy baja en quistes y folículos persistentes. Sin embargo, en los folículos persistentes que presentan elevadas concentraciones de 17OHP4, la baja expresión proteica de AMH estuvo acompañada de altas concentraciones en líquido folicular (grupos P10 y P15). Asimismo, existe una posible asociación positiva entre BMP-4 y BMP-6, y la secreción de AMH. Estos hallazgos nos permiten suponer que la medición de AMH en estructuras foliculares de tamaño mayor al ovulatorio podría ser un indicador de persistencia folicular.

La aplicación de técnicas poco invasivas como seguimiento ecográfico, aspirado folicular guiado por ecografía, toma de múltiples muestras de sangre a través de un catéter endovenoso yugular, y de otras invasivas como la ovariectomía, permitieron caracterizar exitosamente el modelo de persistencia folicular, el cual se adaptó a la necesidad de establecer los acontecimientos que suceden en las primeras etapas de formación de los quistes. En conjunto los resultados obtenidos tanto en folículos persistentes como en casos inducidos y espontáneos de COD coinciden en que estas estructuras poseen similares concentraciones de hormonas gonadotróficas y esteroides, y que los factores locales aquí estudiados, a través de sus funciones fisiológicas, permitirían mantener el característico medio intrafolicular de receptores, hormonas y enzimas que acompañan a estas alteraciones ováricas.

La puesta en práctica de estos métodos y el desarrollo de este tipo de modelos experimentales permiten disponer de estrategias de estudio tanto para enfermedades de origen

ovárico como de otro origen, siendo también aplicables a diseños experimentales en otros modelos animales. La adquisición y producción de conocimientos llevados a cabo en esta tesis permitió ampliar la información existente sobre la fisiopatología ovárica en el bovino. El conocimiento del comportamiento hormonal y su relación con la expresión de los factores locales BMPs y AMH, así como de su capacidad de modificar el medio interno folicular, aporta información relevante para la comprensión de la compleja y dinámica etiopatogenia de la COD.

Finalmente, la información recabada y producida permite al grupo de trabajo la posibilidad de trasladar recursos teóricos y técnicos al medio rural donde se produce la enfermedad y de esta manera brindar nuevas herramientas para la comprensión, diagnóstico y tratamiento de los folículos persistentes y quistes, produciendo una mejora en los sistemas de producción lechera.

7. Bibliografía

- 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.
- Aerts JM, Bols PE. 2010. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod Domest Anim.* 45: 171-179.
- Ahmad N, Schrick FN, Butcher RL, Inskeep EK. 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol Reprod.* 52: 1129-1135.
- Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Takamura M, Harada M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Fujii T, Saito S. 2014. The role of bone morphogenetic protein 6 in accumulation and regulation of neutrophils in the human ovary. *Reprod Sci.* 21: 772–777.
- Al-Dahash SY, David JS. 1997a. Anatomical features of cystic ovaries in cattle found during an abattoir survey. *Vet Rec.* 101:320-324.
- Al-Dahash SY, David JS. 1977b. Histological examination of ovaries and uteri from cows with cystic ovaries. *Vet Rec.* 101: 342-347.
- Al-Dahash SY, David JS. 1977c. Histochemistry of cystic ovaries found during an abattoir survey. *Vet Rec.* 101: 361-363.
- 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.
- Alila HW, Hansel W. 1984. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biol Reprod.* 31: 1015-1025.
- 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.

- Amthor H, Christ B, Rashid-Doubell F, Kemp CF, Lang E, Patel K. 2002. Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth. *Developmental Biology*. 243: 115-127.
- Amweg AN, Paredes A, 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 Endocrinol*. 45: 126-140.
- 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.
- Aoki H, Fujii M, Imamura T, Yagi K, Takehara K, Kato M & Miyazono K. 2001. Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *J Cell Sci*. 114: 1483-1489.
- Araújo VR, Lima-Verde IB, Name KPO, Bao SN, Campello CC, Silva JRV, Rodrigues APR, Figueiredo JR. 2010a. Bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) induces atresia in goat primordial follicles cultured in vitro. *Pesq Vet Bras*. 30: 770-776.
- Araújo VR, Silva CMG, Magalhães DM, Silva GM, Bao SN, Silva JRV, Figueiredo JR, Rodrigues APR. 2010b. Effect of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on in vitro survival of caprine preantral follicles. *Pesq Vet Bras*. 30: 305-310.
- Armstrong DG, Mcevoy TG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R. 2002. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction*. 123: 371-378.
- Artini PG, Monteleone P, Toldin MRP, Matteucci C, Ruggiero M, Cela V, Genazzani AR. 2007. Growth factors and folliculogenesis in polycystic ovary patients. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2: 215-217.

- Ashley RL, Clay CM, Farmerie TA, Niswender GD, Nett TM. 2006. Cloning and characterization of an ovine intracellular seven transmembrane receptor for progesterone that mediates calcium mobilization. *Endocrinology*. 147: 4151-4159.
- Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, Grootegoed JA. 1995. Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology*. 136: 4951-4962.
- Baird DT, Campbell BK, Mann GE, McNeilly AS. 1991. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Reprod Fertil Suppl*. 43:125-138.
- Baird DT, Land RB, Scaramuzzi RJ, Wheeler AG. 1976. Endocrine changes associated with luteal regression in the ewe; the secretion of ovarian oestradiol, progesterone and androstenedione and uterine prostaglandin F₂alpha throughout the oestrous cycle. *J Endocrinol*. 69: 275-286.
- 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.
- Barb CR, Kraeling RR. 2004. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Anim Reprod Sci*. 82-83:155-167.
- 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: 1409-1415.
- Bauman DE, Currie WB. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci*. 63: 1514-1529.

- Beam SW, Butler WR. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol Reprod.* 56: 133-142.
- Beam SW, Buttler WR. 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in post partum dairy cows. *J Reprod Fertil Suppl.* 5: 411-424.
- Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 89: 3413-3424.
- Bergfeld EG, Kojima FN, Cupp AS, Wehrman ME, Peters KE, Mariscal V, Sanchez T, Kinder JE. 1996. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 beta-estradiol in bovine females. *Biol Reprod.* 54: 546-553.
- Berkholtz CB, Lai BE, Woodruff TK, Shea LD. 2006. Distribution of extracellular matrix proteins type I collagen, type IV collagen, fibronectin, and laminin in mouse folliculogenesis. *Histochem. Cell Biol.* 126: 583-592.
- Bezard J, Vigier B, Tran D, Mauleon P, Josso N. 1987. Immunocytochemical study of anti-Mu^l llerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. *J Reprod Fertil.* 80: 509-516.
- Bigelow KL, Fortune JE. 1998. Characteristics of prolonged dominant versus control follicles: follicle cell numbers, steroidogenic capabilities, and messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes. *Biol Reprod.* 58: 1241-1249.
- Blackmore PF, Beebe SJ, Danforth DR, Alexander N. 1990. Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem.* 265: 1376-1380.
- Bó GA, Caccia M. 2002. Dinámica folicular en el ganado bovino. En: Ungerfeld R, Reproducción en los animales domésticos. p 57-70. Ed. Melibea, Montevideo.
- Borbolis F, Syntichaki P. 2015. Cytoplasmic mRNA turnover and ageing. *Mech Ageing Dev.* 152: 32-42.
- Bosu WT, Peter AT. 1987. Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 28: 725-736.

- Brankin V, Quinn RL, Webb R, Hunter MG. 2005. BMP-2 and -6 modulate porcine theca cell function alone and co-cultured with granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol.* 29: 593-604.
- Brankin V, Quinn RL, Webb R, Hunter MG. 2005. Evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) system in the porcine ovary. *Domest Anim Endocrinol.* 28: 367-379.
- Braw-Tal R, Pen S, Roth Z. 2009. Ovarian cysts in high-yielding dairy cows. *Theriogenology.* 72: 690-698.
- Braw-Tal R, Roth Z. 2005. Gene expression for LH receptor, 17 alphahydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction.* 129: 453-461.
- 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
- Bridges PJ, Fortune JE. 2003. Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. *Domest Anim Endocrin.* 25: 199-214.
- Brown JL, Schoenemann HM, Reeves JJ. 1986. Effect of FSH treatment on LH and FSH receptors in chronic cystic-ovarian-diseased dairy cows. *J Anim Sci.* 62: 1063-1071.
- Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. 1990. Interactions between somatic cells and germcells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod.* 43: 543-547.
- Butcher RL, Pope RS. 1979. Role of estrogen during prolonged estrous cycles of the rat on subsequent embryonic death or development. *Biol Reprod.* 21: 491-495.
- Butler WR. 1997. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci.* 60-61: 449-457.
- Butler WR. 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci.* 83: 211-218.
- Caixeta ES, Sutton McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson CAP, Machado MF, Lima, PF, Buratini J. 2013. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus–oocyte complexes. *Reproduction.* 146: 27-33.

- 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 beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta(4),delta(5) isomerase compared to normal dominant follicles. *Biol Reprod.* 65:471-476.
- Calder MD, Salfen BE, Bao B, Youngquist RS, Garverick HA. 1999. Administration of progesterone to cows with ovarian follicular cysts results in a reduction in mean LH and LH pulse frequency and initiates ovulatory follicular growth. *J Anim Sci.* 77: 3037-3042.
- 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.
- Canfield RW, Butler WR. 1990. Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 7: 323-330.
- Canty MJ, Boland MP, Evans AC, Crowe MA. 2006. Alterations in follicular IGFBP mRNA expression and follicular fluid IGFBP concentrations during the first follicle wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci.* 93: 199-217.
- Canty-Laird E, Carré GA, Mandon-Pépin B, Kadler KE, Fabre S. 2010. First evidence of bone morphogenetic protein 1 expression and activity in sheep ovarian follicles. *Biol Reprod.* 83: 138-146.
- Carrie're PD, Amaya D, Lee B. 1995. Ultrasonography and endocrinology of ovarian dysfunction in heifers with estradiol valerate. *Theriogenology.* 43: 1061-1076.
- Carroll DJ, Pierson RA, Hauser ER, Grummer RR, Combs DK. 1990. Variability of ovarian structures and plasma progesterone profiles in dairy cows with ovarian cysts. *Theriogenology.* 34: 349-370.
- Cattaneo L, Barberis FC, Stangaferro ML, Signorini ML, Ruiz MF, Zimmermann R, Bo GA, Hein GJ, Ortega HH. 2014. Evaluación de indicadores metabólicos y bioquímicos sanguíneos en vacas en lactancia con Enfermedad Quística Ovárica. *InVet.* 15: 7-15.
- Cattaneo L, Signorini ML, Bertoli J, Bartolomé JA, Gareis NC, Díaz PU, Bó GA, Ortega HH. 2014. Epidemiological description of cystic ovarian disease in argentine dairy herds: risk factors and effects on the reproductive performance of lactating cows. *Reprod Domest Anim.* 49: 1028-1033.

- Celestino JJ, Lima-Verde IB, Bruno JB, Matos MH, Chaves RN, Saraiva MV, Silva CM, Faustino LR, Rossetto R, Lopes CA, Donato MA, Peixoto CA, Campello CC, Silva JR, Figueiredo JR. 2011. Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on in vitro development and survival of preantral follicles. *Mol Cell Endocrinol.* 338: 1-9.
- Chen Y, Zhao S, Qiao J, Liu P, Lian Y, Zheng X. 2009. Expression of bone morphogenetic protein-15 in human oocyte and cumulus granulosa cells primed with recombinant follicle-stimulating hormone followed by human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril.* 92: 2045–2046.
- 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.
- 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.
- Crawford JL, McNatty KP. 2012. The ratio of growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. *Mol Cell Endocrinol.* 348: 339-343.
- Crowe MA. 2008. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 43:20-28.
- Crowe MA, Enright WJ, Boland MP, Roche JF. 2001a. Follicular growth and serum follicle-stimulating hormone (FSH) responses to recombinant bovine FSH in GnRH-immunized anoestrous heifers. *Anim Sci.* 73: 115-122.
- Crowe MA, Kelly P, Driancourt MA, Boland MP, Roche JF. 2001b. Effects of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin releasing hormone-immunized heifers. *Biol Reprod.* 64: 368-374.
- Cupp AS, Garcia-Winder M, Zamudio A, Mariscal V, Wehrman M, Kojima N, Peters K, Bergfeld E, Hernandez P, Sanchez T, Kittok R, Kinder J. 1992. Two concentrations of progesterone (P4) in circulation have a differential effect on pattern of ovarian follicular development in the cow. *Biol Reprod.* 44: 64.

- Curry Jr TE, Smith MF. 2006. Impact of extracellular matrix remodeling on ovulation and the folliculo-luteal transition. *Semin Reprod Med.* 24: 228-241.
- Custer EE, Beal WE, Wilson SJ, Meadows AW, Berardinelli JG, Adair R. 1994. Effect of melengestrol acetate (MGA) or progesterone-releasing intravaginal device (PRID) on follicular development, concentrations of estradiol-17 beta and progesterone, and luteinizing hormone release during an artificially lengthened bovine estrous cycle. *J Anim Sci.* 72:1282-1289.
- D'Occhio MJ, Kinder JE, Schanbacher BD. 1982. Patterns of LH secretion in castrated bulls (steers) during intravenous infusion of androgenic and estrogenic steroids: pituitary response to exogenous luteinizing hormone-releasing hormone. *Biol Reprod.* 26: 249-257.
- Davoren JB, Kasson BG, Li CH, Hsueh AJW. 1986. Specific insulin-like growth factor (IGF) I and II –binding sites on rat granulosa cells: relation to IGF action. *Endocrinology.* 119: 2155-2162.
- Day N. 1991. The treatment and prevention of cystic ovarian disease. *Vet Med.* 86: 761-766.
- De Silva M, Reeves JJ. 1988. Hypothalamic-Pituitary function in chronically cystic and regularly cycling dairy cows. *Biol Reprod.* 38: 264-269.
- de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. 2002. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril.* 77: 357-362.
- Dellmann HD. 1994. Sistema reproductor femenino. En: Dellmann HD, *Histología Veterinaria.* 2^{da} edición. p 267-290. Ed:Editorial Acribia, Zaragoza.
- Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, Heldin CH, Kern SE, Massagué J, Melton DA, Mlodzik M, Padgett RW, Roberts AB, Smith J, Thomsen GH, Vogelstein B, Wang XF. 1996. Nomenclature: vertebrate mediators of TGF- β family signals. *Cell.* 87: 173.
- di Clemente N, Goxe B, Remy JJ, Cate RL, Josso N, Vigier B, Salesse R. 1994. Inhibitory effect of AMH upon the expression of aromatase and LH receptors by cultured granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine.* 2: 553-558.
- Ding X, Zhang X, Mu Y, Li Y, Hao J. 2013. Effects of BMP4/SMAD signaling pathway on mouse primordial follicle growth and survival via up-regulation of *Sohlh2* and *c-kit*. *Mol Reprod Dev.* 80. 70-78.

- Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM. 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci.* 78: 345-370.
- 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. 1995. Stress and reproduction in farm animals. *J Reprod Fertil Suppl.* 49: 451-461.
- Dooley CA, Attia GR, Rainey WE, Moore DR, Carr BR. 2000. Bone morphogenetic protein inhibits ovarian androgen production. *J Clin Endocrinol Metab.* 85: 3331-3337.
- Dorrington JH, Moon YS, Armstrong DT. 1975. Estradiol-17beta biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 97: 1328-1331.
- Ducy P, Karsenty G. 2000. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Inter.* 57: 2207-2214.
- Dudley B, Palumbo C, Nalepka J, Molyneaux K. 2010. BMP signaling controls formation of a primordial germ cell niche within the early genital ridges. *Dev Biol.* 343: 84-93.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. 2002a. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology.* 143:1076-1084.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. 2001. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology.* 142: 4891-4899.
- Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. 1999. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology.* 140: 5789–5796.
- Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. 2002b. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction.* 124: 601-609.

- Ebisawa T, Tada K, Kitajima I, Tojo K, Sampath TK, Kawabata M, Miyazono K, Imamura T. 1999. Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Sci.* 112: 3519-3527.
- Ebneshahidi A. 2006. *Reproductive Physiology*. Benjamin Cummings. Pearson Education Inc. [Http://www.lamission.edu/lifesciences/lecturenote/Aliphysio1/Reproduction.pdf](http://www.lamission.edu/lifesciences/lecturenote/Aliphysio1/Reproduction.pdf)
- Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, Gal M, Zylber-Haran E, Margalioth EJ. 2005. Dynamic assays of inhibin B, anti-Müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod.* 20: 3178-3183.
- Elgindy EA, El-Haieg DO, El-Sebaey A. 2008. Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril.* 89: 1670-1676.
- El-Sheikh Ali H, Kitahara G, Nibe K, Yamaguchi R, Horii Y, Zaabel S, Osawa T. 2013. Plasma anti-Müllerian hormone as a biomarker for bovine granulosa-theca cell tumors: comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations. *Theriogenology.* 80: 940-949.
- Eppig JJ. 1985. Oocyte-somatic cell interactions during oocyte growth and maturation in the mammal. *Dev Biol.* 1: 313-347.
- Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction.* 122: 829-838.
- Erb RE, Monk EL, Callahan CJ, Mollet TA. 1973. Endocrinology of induced ovarian follicular cysts. *J Anim Sci.* 37:310
- Erickson BH. 1966a. Development and radio respons of the prenatal bovine ovary. *J Reprod Fertil.* 11: 91-105.
- Erickson BH. 1966b. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci.* 25: 800-805.
- Erickson GF, Shimasaki S. 2001. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril.* 76: 943–949.

- Erickson GF, Shimasaki S. 2003. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol.* 1: 1-20.
- Espey LL. 1980. Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. *Biol Reprod.* 22: 73-106.
- Evans ACO, 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.
- Fallat ME, Siow Y, Marra M, Cook C, Carrillo A. 1997. Mullerian-inhibiting substance in follicular fluid and serum: a comparison of patients with tubal factor infertility, polycystic ovary syndrome, and endometriosis. *Fertil Steril.* 67: 962-965.
- Farnworth PG. 1995. Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotroph?. *J Endocrinol.* 145: 387-395.
- Farnworth PG, Stanton PG, Wang Y, Escalona R, Findlay JK, Ooi GT. 2006. Inhibins differentially antagonize activin and bone morphogenetic protein action in a mouse adrenocortical cell line. *Endocrinology* 147: 3462–3471.
- Fatehi AN, van den Hurk R, Colenbrander B, Daemen AJ, van Tol HT, Monteiro RM, Roelen BA, Bevers MM. 2005. Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology.* 63: 872-889.
- 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.
- Field SL, Dasgupta T, Cummings M, Orsi NM. 2014. Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. *Mol Reprod Dev.* 81:284-314.
- Findlay JK, Drummond AE. 1999. Regulation of the FSH Receptor in the Ovary. *Trends Endocrinol Metab.* 10: 183-188.

- Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. 2002. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Cell Endocrinol.* 191: 35-43.
- Folman Y, Rosenberg M, Herz Z, Davidson M. 1973. The relationship between plasma progesterone concentrations and conception in postpartum dairy cows maintained on two levels of nutrition. *J Reprod Fertil.* 34: 267-278.
- 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.
- Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans ACO, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O'Gaora P, Lonergan P, Roche JF. 2009. Progesterone regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol Reprod.* 81: 784-794.
- Fortune JE. 1986. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol Reprod.* 35: 292-299.
- Fortune JE. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 50: 225-232.
- Fortune JE, Quirk SM. 1988. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J Anim Sci.* 66: 1-8.
- Fortune JE, Yang MY, Muruvi W. 2011. In vitro and in vivo regulation of follicular formation and activation in cattle. *Reprod Fertil Dev.* 23:15-22.
- Frandsen R, Wilke WL, Fails AD. 2003. The Ovary and Estrous Cycles. En: Frandsen R, *Anatomy and physiology of farm animals.* p 481. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore.
- Frank S, Stark J, Hardy K. 2008. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 14: 367-378.
- Frota IMA, Leitão CCF, Costa JJN, van den Hurk R, Brito IR, Saraiva MVA, Figueiredo JR, Silva JRV. 2011. Effects of BMP-7 and FSH on the development of goat preantral follicles and levels of mRNA for FSH-R, BMP-7 and BMP receptors after in-vitro culture. *Anim Reprod.* 8: 25-31.

- Frota IM, Leitão CC, Costa JJ, van den Hurk R, Saraiva MVA, Figueiredo JR, Silva JR. 2013. Levels of BMP-6 mRNA in goat ovarian follicles and in vitro effects of BMP-6 on secondary follicle development. *Zygote*. 21:270–278.
- Garnero O, Perusia O. 2002. Círugía de cabeza, cuello y torax. Aparato reproductor de la hembra. En: Garnero O, Perusia O, Manual de anestésias y cirugías del bovino. 3^{ra} edición. P 31, 59-76. Ed. Imprenta San Cayetano, Santa Fe.
- Garverick HA. 1997. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci*. 80: 995-1004.
- Garverick HA, Smith MF, Elmore RG, Morehouse GL, Agudo LS, Zahler WL. 1985. Changes and interrelationships among luteal LH receptors, adenylate cyclase activity and phosphodiesterase activity during the bovine estrous cycle. *J Anim Sci*. 61: 216-223.
- Geneser F. 2005. Órganos de la reproducción, órganos reproductores femeninos. En: Geneser F, Histología. 3ra edición. p 615-626. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. 2008. Oocytesecreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*. 14: 159-177.
- Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci*. 78: 239-257.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K. 2002. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. *Reproduction*. 124: 475-482.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. 2000a. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol Reprod*. 63: 383-389.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. 2000b. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biol Reprod*. 62: 920-927.
- Glister C, Kemp CF, Knight PG. 2004. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction*. 127: 239-254.

- Glister C, Richards SL, Knight PG. 2005. Bone morphogenetic proteins (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling? *Endocrinology*. 146: 1883-1892.
- Glister C, Satchell L, Bathgate RA, Wade JD, Dai Y, Ivell R, Anand-Ivell R, Rodgers RJ, Knight PG. 2013. Functional link between bone morphogenetic proteins and insulin-like peptide 3 signaling in modulating ovarian androgen production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110: 1426-1435.
- Glister C, Satchell L, Knight PG. 2010. Changes in expression of bone morphogenetic proteins (BMPs), their receptors and inhibin co-receptor betaglycan during bovine antral follicle development: inhibin can antagonize the suppressive effect of BMPs on thecal androgen production. *Reproduction*. 140:699-712.
- Glister C, Satchell L, Knight PG. 2011. Granulosal and thecal expression of bone morphogenetic protein- and activin-binding protein mRNA transcripts during bovine follicle development and factors modulating their expression in vitro. *Reproduction*. 142: 581-591.
- Gougeon A, Lefevre B. 1983. Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. *J Reprod Fertil*. 69: 497:502.
- Greenwald GS, Roy SK. 1994. Follicular development and its control. En: Knobil E, Neill JD, *The Physiology of Reproduction*. 2nd Ed. p 629–724. Ed. Raven Press Ltd, New York.
- 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.
- 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.
- Gumienny T, Padgett RW. 2002. The other side of TGF-beta superfamily signal regulation: thinking outside the cell. *Trends Endocrinol Metab*. 13:295-299.

- Hafez ESE, Hafez B. 2002. Anatomía del aparato reproductor de la hembra. En: Hafez ESE, Hafez B, Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. p 13-29. Ed: McGraw-Hill Interamericana, México DF.
- 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.
- Hampton JH, Salfen BE, Bader JF, Keisler DH, Garverick HA. 2003. Ovarian follicular responses to high doses of pulsatile luteinizing hormone in lactating dairy cattle. *J Dairy Sci.* 86: 1963-1969.
- Hansel W. 1966. Luteotrophic and luteolytic mechanisms in bovine corpora lutea. *J Reprod Fertil.* 1: 33-48.
- Hansel W, Convey EM. 1983. Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci.* 57: 404-424.
- Hasegawa Y, Miyamoto K, Abe Y, Nakamura T, Sugino H, Eto Y, Shibai H, Igarashi M. 1988 .Induction of follicle stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 156: 668-674.
- Hatler TB, Hayes SH, Anderson LH, Silvia WJ. 2006. Effect of a single injection of progesterone on ovarian follicular cysts in lactating dairy cows. *Vet J.* 172: 329-333.
- 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.
- Hatler TB, Hayes SH, Ray DL, Reames PS, Silvia WJ. 2008. Effect of subluteal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows. *Vet J.* 177: 360-368.
- Hein GJ, Panzani CG, Rodríguez FM, Salvetti NR, Díaz PU, Gareis NC, Benítez GA, Ortega HH, Rey F. 2015. Impaired insulin signaling pathway in ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci.* 156: 64-74.
- Henricks DM, Hill JR, Dickey JF. 1973. Plasma ovarian hormone levels and fertility in beef heifers treated with melengestrol acetate (MGA). *J Anim Sci.* 37: 1169-1175.
- Herrera B, Dooley S, Breitkopf-Heinlein K. 2014. Potential roles of bone morphogenetic protein (BMP)-9 in human liver diseases. *Int J Mol Sci.* 15: 5199-5220.

- Herrera B, van Dinther M, Ten Dijke P, Inman GJ. 2009. Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 69: 9254-9262.
- Hill JR, Lamond DR, Henricks DM, Dickey JF, Niswender GD. 1971. The effect of melengestrol acetate (MGA) on ovarian function and fertilization in beef heifers. *Biol Reprod.* 4: 16-22.
- 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, Yong EL, Illingworth PJ, Baird DT, Schwall RH, Mason AJ. 1991. Effect of recombinant activin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 72: 1206-1211.
- Hirshfield AN. 1985. Comparison of granulosa cell proliferation in small follicles of hypophysectomized, prepubertal, and mature rats. *Biol Reprod.* 32: 979-987.
- 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.* 84: 286-291.
- Hooijer GA, Van Oijen MA, Frankena K, Noordhuizen JP. 2003. Milk production parameters in early lactation: potential risk factors of cystic ovarian disease in Dutch dairy cows. *Livest Prod Sci.* 81: 25-33.
- Hooijer GA, Van Oijen MA, Frankena K, Noordhuizen JP. 2005. Influence of negative energy balance on the reproductive performance after treatment of cystic ovarian disease with gonadotrophin-releasing hormone in dairy cows. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 52: 298-304.
- Hosoe M, Kaneyama K, Ushizawa K, Hayashi KG, Takahashi T. 2011. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. *Reprod Biol Endocrinol.* 9: 33.

- Hosoya T, Otsuka F, Nakamura E, Terasaka T, Inagaki K, Tsukamoto-Yamauchi N, Hara T, Toma K, Komatsubara M, Makino H. 2015. Regulatory role of BMP-9 in steroidogenesis by rat ovarian granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 147: 85-91.
- Hsieh M, Zamah AM, Conti M. 2009. Epidermal growth factor-like growth factors in the follicular fluid: role in oocyte development and maturation. *Semin Reprod Med.* 27: 52-61.
- Huet C, Monget P, Pisselet C, Hennequet C, Locatelli A, Monniaux D. 1998. Chronology of events accompanying follicular atresia in hypophysectomized ewes. Changes in levels of steroidogenic enzymes, connexin 43, insulin-like growth factor II/mannose 6 phosphate receptor, extracellular matrix components, and matrix metalloproteinases. *Biol Reprod.* 58:175-185.
- Huet C, Monget P, Pisselet C, Monniaux D. 1997. Changes in extracellular matrix components and steroidogenic enzymes during growth and atresia of antral ovarian follicles in the sheep. *Biol Reprod.* 56: 1025-1034.
- Hutt KJ, Albertini DF. 2007. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod Biomed Online.* 14: 758-764.
- Ireland JJ. 1987. Control of follicular growth and development. *J Reprod Fertil.* 34: 39-54.
- Ireland, JJ, Roche JF. 1982. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology.* 111: 2077-2086.
- Ireland JJ, Roche JF. 1983. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology.* 112: 150-156.
- Ireland JL, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen AP, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans AC, Ireland JJ. 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod.* 79:1219-1225.
- Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Mossa F, Lonergan P, Evans AC. 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod Fertil Dev.* 23:1-14.

- Irving-Rodgers HF, van Wezel IL, Mussard ML, Kinder JE, Rodgers RJ. 2001. Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. *Reproduction*. 122: 761-775.
- 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.
- Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA, Wozney JM. 1996. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors*. 13:291-300.
- Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Yen HW, Bogusiewicz M, Magoffin DA. 2002. Estrogen receptor alpha and beta expression in theca and granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 87: 5532-5538.
- Jimenez-Krassel F, Folger J, Ireland JH, Smith GW, Hou X, Davis JS, Lonergan P, Evans AC, Ireland JJ. 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during reproductive cycles of single-ovulating species. *Biol Reprod*. 80:1272-1281.
- Jimenez-Krassel F, Scheetz DM, Neuder LM, Ireland JL, Pursley JR, Smith GW, Tempelman RJ, Ferris T, Roudebush WE, Mossa F, Lonergan P, Evans AC, Ireland JJ. 2015. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *J Dairy Sci*. 8:3036-3045.
- Jöchle W. 1993. Forty years of control of the oestrous cycle in ruminants: progress made, unresolved problems and the potential impact of sperm encapsulation technology. *Reprod Fertil Dev*. 5: 587-594.
- Josso N, di Clemente N, Gouedard L. 2001. Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol*. 179: 25-32.
- Juengel JL, Hudson NL, Berg M, Hamel K, Smith P, Lawrence SB, Whiting L, McNatty KP. 2009. Effects of active immunization against growth differentiation factor 9 and/or bone morphogenetic protein 15 on ovarian function in cattle. *Reproduction*. 138:107-114.
- Juengel JL, McNatty KP. 2005. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update*. 11: 143-160.

- Juengel JL, Reader KL, Bibby AH, Lun S, Ross I, Haydon LJ, McNatty KP. 2006. The role of bone morphogenetic proteins 2, 4, 6 and 7 during ovarian follicular development in sheep: contrast to rat. *Reproduction*. 131: 501-513.
- Kaipia A, Hsueh AJ. 1997. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol*. 59: 349-363.
- Kakar SS, Rahe CH, Neill JD. 1993. Molecular cloning, sequencing, and characterizing the bovine receptor for gonadotropin releasing hormone (GnRH). *Domest Anim Endocrinol*. 10: 335-342.
- Kameda T, Koike C, Saitoh K, Kuroiwa A, Iba H. 1999. Developmental patterning in chondrocytic cultures by morphogenic gradients: BMP induces expression of Indian hedgehog and noggin. *Genes Cells*. 4: 175-184.
- Kawate N, Inaba T, Mori J. 1990. A quantitative comparison in the bovine of steroids and gonadotropin receptors in normally developing follicles and in follicular and luteinized cysts. *Anim Reprod Sci*. 23: 273-281.
- Kawate N, Inaba T, Mori J. 1996. Changes in plasma concentrations of gonadotropins and steroid hormones during the formation of bovine follicular cysts induced by the administration of ACTH. *J Vet Med Sci*. 58: 141-144.
- Kayamori T, Kosaka N, Miyamoto A, Shimizu T. 2009. The differential pathways of bone morphogenetic protein (BMP)-4 and -7 in the suppression of the bovine granulosa cell apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 323: 161-168.
- Kayani AR, Glister C, Knight PG. 2009. Evidence for an inhibitory role of bone morphogenetic protein(s) in the follicular–luteal transition in cattle. *Reproduction*. 137: 67-78.
- Kedem A, Fisch B, Garor R, Ben-Zaken A, Gizunterman T, Felz C, Ben-Haroush A, Kravarusic D, Abir R. 2011. Growth differentiating factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 both activate development of human primordial follicles in vitro, with seemingly more beneficial effects of GDF9. *J Clin Endocrinol Metab*. 96: 1246-1254.
- Kesler DJ, Garverick HA. 1982. Ovarian cysts in dairy cattle: a review. *J Anim Sci*. 55: 1147-1159.

- 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.
- Kesner JS, Padmanabhan V, Convey EM. 1982. Estradiol induces and progesterone inhibits the preovulatory surges of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in heifers. *Biol Reprod.* 26: 571-578.
- Khalaf M, Morera J, Bourret A, Reznik Y, Denoual C, Herlicoviez M, Mittre H, Benhaim A. 2013. BMP system expression in GCs from polycystic ovary syndrome women and the in vitro effects of BMP4, BMP6, and BMP7 on GC steroidogenesis. *Eur J Endocrinol.* 168: 437-444.
- Kim S, Kengaku K, Tanaka T, Kamomae H. 2004. The therapeutic effects of a progesterone-releasing intravaginal device (PRID) with attached estradiol capsule on ovarian quiescence and cystic ovarian disease in postpartum dairy cows. *J Reprod Dev* 50: 341-348.
- Kimmins S, MacLaren LA. 2001. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 22: 742-748.
- Kindahl H, Edqvist LE, Granstrom E, Bane A. 1976. The release of prostaglandin F2alpha as reflected by 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin F2alpha in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers. *Prostaglandins.* 11: 871-878.
- Kindahl H, Lindell JO, Edqvist LE. 1979. On the control of prostaglandin release during the bovine estrous cycle. Effects of progesterone implants. *Prostaglandins.* 18: 813-820.
- Kitahara G, Nambo Y, El-Sheikh Ali H, Kajisa M, Tani M, Nibe K, Kamimura S. 2012. Anti-Müllerian hormone profiles as a novel biomarker to diagnose granulosa-theca cell tumors in cattle. *J Reprod Dev.* 58: 98-104.
- Kittok RJ, Britt JH, Edgerton LA. 1974. Serum steroids after gonadotropin treatment in cows with ovarian follicular cysts. *Am J Vet Res.* 35:1575-1576.
- Knight PG, Glister C. 2003. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci.* 78. 165-183.
- Knight PG, Glister C. 2006. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 132: 191-206.

- Kojima FN, Bergfeld EG, Wehrman ME, Cupp AS, Fike KE, Mariscal-Aguayo DV, Sanchez-Torres T, Garcia-Winder M, Clopton DT, Roberts AJ, Kinder JE. 2003. Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. *Anim Reprod Sci.* 77:187-211.
- Kojima N, Stumpf TT, Cupp AS, Werth LA, Roberson MS, Wolfe MW, Kittok RJ, Kinder JE. 1992. Exogenous progesterone and progestins as used in estrous synchrony regimens do not mimic the corpus luteum in regulation of luteinizing hormone and 17 beta-estradiol in circulation of cows. *Biol Reprod.* 47:1009-1017.
- Kol S, Ben-Shlomo I, Payne DW, Ando M, Rohan RM, Adashi EY. 1998. Glucocorticoids suppress basal (but not interleukin-1-supported) ovarian phospholipase A2 activity: evidence for glucocorticoid receptor-mediated regulation. *Mol Cell Endocrinol.* 137:117-125.
- 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.
- Krozowski Z, Li KX, Koyama K, Smith RE, Obeyesekere VR, Steinoakley A, Sasano H, Coulter C, Cole T, Sheppard KE. 1999. The type I and type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *J Steroid Biochem.* 69: 391-401.
- Kulick LJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology.* 52: 913-921.
- Kumanov P, Nandipati KC, Tomova A, Robeva R, Agarwal A. 2005. Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications. *Reprod Biomed Online.* 10: 786-812.
- La Marca A, Volpe A. 2006. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool?. *Clin Endocrinol (Oxf).* 64:603-610.
- Lacau-Mengido IM, Mejía ME, Díaz-Torga GS, Gonzalez Iglesias A, Formía N, Libertun C, Becú-Villalobos D. 2000 Endocrine studies in ivermectin-treated heifers from birth to puberty. *J Anim Sci.* 78: 817-824.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.

- Lagaly DV, Aad PY, Grado-Ahuir JA, Hulsey LB, Spicer LJ. 2008. Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Mol Cell Endocrinol*. 284: 38-45.
- Lamothe P, Bousquet D, Guay P. 1977. Cyclic variation of F prostaglandins in the uterine fluids of the cow. *J Reprod Fertil*. 50: 381-382.
- Lamplot JD, Qin J, Nan G, Wang J, Liu X, Yin L, Tomal J, Li R, Shui W, Zhang H, Kim SH, Zhang W, Zhang J, Kong Y, Denduluri S, Rogers MR, Pratt A, Haydon RC, Luu HH, Angeles J, Shi LL, He TC. 2013. BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis. *Am J Stem Cells*. 2: 1-21.
- Laporte HM, Hogeveen H, Schukken YH, Noordhuizen JPTM. 1994. Cystic ovarian disease in Dutch dairy cattle I. Incidence, risk factors and consequences. *Livest Prod Sci*. 38: 191-197.
- Laven JS, Mulders AG, Visser JA, Themmen AP, De Jong FH, Fauser BC. 2004. Anti-Mullerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab*. 89: 318-323.
- Lee CN, Cook DL, Parfet JR, Smith CA, Youngquist RS, Garverick HA. 1988. Induction of persistent ovarian follicular structures following administration of progesterone near the onset of estrus in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 71:3505-3508.
- Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. 2001. Effect of bonemorphogenetic protein-7 on folliculogénesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod*. 65: 994-999.
- Lee WS, Yoon SJ, Yoon TK, Cha KY, Lee SK, Shimasaki S, Lee S, Lee KA. 2004. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Mol Reprod Dev*. 69: 159-163.
- Leroy JLMR, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IGF, Bols PEJ. 2008. Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part I. The Importance of Negative Energy Balance and Altered Corpus Luteum Function to the Reduction of Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows. *Reprod Dom Anim*. 43: 612-622.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, De Wulf J, De Kruif A. 2004. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*. 62: 1131-1143.

- Liefers SC, Veerkamp RF, Te Pas MFW, Delavaud C, Chilliard Y, Van Der Lende T. 2003. Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight, and estrus in dairy cows. *J D Sc.* 86: 799-807.
- Lima IMT, Brito IR, Rossetto R, Duarte ABG, Rodrigues GQ, Saraivan MVA, Costa JJ, Donato MA, Peixoto CA, Silva JR, Figueiredo JR, Rodrigues AP. 2012. BMPRII mRNA expression levels in goat ovarian follicles and the in vitro effects of BMP-15 on preantral follicle development. *Cell Tissue Res.* 348: 225-238.
- Lin PC, Bhatnagar KP, Nettleton GS, Nakajima ST. 2002. Female genital anomalies affecting reproduction. *Fertil Steril* 78: 899-915.
- 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.
- Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J. 1995. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol.* 15: 3479-3486.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods.* 25: 402-408.
- Lopez-Díaz MC, Bosu WT. 1992. A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. *Theriogenology.* 37: 1163-1183.
- López-Gatius F, Santolaria P, Yañiz J, Fenech M, López-Béjar M. 2002. Risk factors for postpartum ovarian cysts and their spontaneous recovery or persistence in lactating dairy cows. *Theriogenology.* 58: 1623-1632.
- Lucy MC. 2003. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reprod Suppl.* 61: 415-427.
- Lucy MC. 2007. The bovine dominant ovarian follicle. *J Anim Sci.* 85: 89-99.
- Lucy MC, Thatcher WW, Macmillan KL. 1990. Ultrasonic identification of follicular populations and return to estrus in early postpartum dairy cattle given intravaginal progesterone for 15 days. *Theriogenology.* 34:325-340.
- Macmillan KL, Taufa VK, Barnes DR, Day AM. 1991. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. *Anim Reprod Sci.* 26, 25-40.

- Malven PV. 1986. Inhibition of pituitary LH release resulting from endogenous opioid peptides. *Domest Anim Endocrinol.* 3: 135-144.
- Manuck TA, Lai Y, Meis PJ, Dombrowski MP, Sibai B, Spong CY, Rouse DJ, Durnwald CP, Caritis SN, Wapner RJ, Mercer BM, Ramin SM. 2011. Progesterone receptor polymorphisms and clinical response to 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate. *Am J Obstet Gynecol.* 205: 135.e1-9.
- Marelli BE, Díaz PU, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. 2014. mRNA expression pattern of gonadotropin receptors in bovine follicular cysts. *Reprod Biol.* 14: 276-281
- Massague J, Wotton D. 2000. Transcriptional control by the TGFbeta/Smad signaling system. *EMBO J.* 19: 1745-1754.
- Matiller V, Stangaferro ML, Díaz PU, Ortega HH, Rey F, Huber E, Salvetti NR. 2014. Altered expression of transforming growth factor-beta isoforms in bovine cystic ovarian disease. *Reprod Domest Anim.* 49: 813-823.
- McCartney CR, Bellows AB, Gingrich MB, Hu Y, Evans WS, Marshall JC, Veldhuis JD. 2004. Exaggerated 17-hydroxyprogesterone response to intravenous infusions of recombinant human LH in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286: 902-908.
- McIlveen M, Skull JD, Ledger WL. 2007. Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Hum Reprod.* 22: 778-785.
- McIntosh CJ, Lawrence S, Smith P, Juengel JL, McNatty KP. 2012. Active immunization against the proregions of GDF9 or BMP15 alters ovulation rate and litter size in mice. *Reproduction.* 143: 195-201.
- McLaughlin EA, McIver SC. 2009. Awakening the oocyte: Controlling primordial follicle development. *Reproduction* 137: 1-11.
- McNatty KP, Smith P, Moore LG, Reader K, Lun S, Hanrahan JP, Groome NP, Laitinen M, Ritvos O, Juengel JL. 2005. Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. *Mol Cell Endocrinol.* 234: 57-66.

- McNeilly AS, Crow W, Campbell BK. 1991. Effect of follicular fluid and inhibin immunoneutralization on FSH-induced preovulatory follicle growth in the ewe. *J Endocrinol.* 131: 401-409.
- Meisterling EM, Dailey RA. 1987. Use of concentrations of progesterone and estradiol-17 beta in milk in monitoring postpartum ovarian function in dairy cows. *J Dairy Sci.* 70: 2154-2161.
- Michael A, Thurston LM, Rae MT. 2003. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction.* 126: 425-441.
- Mihm M, Austin EJ, Good TE, Ireland JL, Knight PG, Roche JF, Ireland JJ. 2000. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod.* 63: 811-819.
- Mihm M, Baguisi A, Boland MP, Roche JF. 1994. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J Reprod Fertil.* 102: 123-130.
- Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem.* 147: 35-51.
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T. 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 251–263.
- Miyoshi T, Otsuka F, Inagaki K, Otani H, Takeda M, Suzuki J, Goto J, Ogura T, Makino H. 2007. Differential regulation of steroidogenesis by bone morphogenetic proteins in granulosa cells: involvement of extracellularly regulated kinase signaling and oocyte actions in follicle-stimulating hormone-induced estrogen production. *Endocrinology.* 148: 337-345.
- Miyoshi T, Otsuka F, Suzuki J, Takeda M, Inagaki K, Kano Y, Otani H, Mimura Y, Ogura T, Makino H. 2006. Mutual regulation of follicle-stimulating hormone signaling and bone morphogenetic protein system in human granulosa cells. *Biol Reprod.* 74: 1073-1082.
- Moberg GP. 1991. How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *J Dairy Sci.* 74: 304-311.

- Moenter SM, Brand RC, Karsch FJ. 1992. Dynamics of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology*. 130: 2978-2984.
- Molter-Gérard C, Caraty A, Guérin S, Fontaine J, Taragnat C. 2000. Dynamic changes in the gonadotrope cell subpopulations during an estradiol-induced surge in the ewe. *Biol Reprod*. 63:1084-1091.
- Monniaux D, di Clemente N, Touze J-L, Belville C, Rico C, Bontoux M, Picard JY, Fabre S. 2008. Intrafollicular steroids and anti-Müllerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol Reprod*. 79: 387-396.
- Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S. 2003. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem*. 278: 304-310.
- Mori T. 1975. Steroid hormone formation in bovine ovarian follicles. *Endocrinol Jpn*. 22: 361-366.
- Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ, Evans AC. 2012. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*. 95: 2355-2361.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R. 1996. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*. 392:49-53.
- Mulders AG, Laven JS, Eijkemans MJ, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. 2004. Changes in anti-Müllerian hormone serum concentrations over time suggest delayed ovarian ageing in normogonadotrophic anovulatory infertility. *Hum Reprod*. 19: 2036-2042.
- Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. 2005. Antral follicle count, anti-müllerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology?. *BJOG*. 112: 1384-1390.
- Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M. 2004. Inhibin B and anti-Müllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients?. *BJOG*. 111: 1248-1253.
- Na KY, Kim HS, Lee SK, Jung WW, Sung JY, Kim YW, Park YK. 2013. Papillary thyroid carcinoma with bone formation. *Pathol Res Pract*. 209: 14-18.

- Nadaraja R, Hansel W. 1976. Hormonal changes associated with experimentally produced cystic ovaries in the cow. *J Reprod Fertil.* 47: 203-208.
- Nakama S. 1976. Enzyme-histochemical studies on normal and cystic ovaries in the cow and sow. *Bull Univ Osaka Prefect.* 1976. 28: 19-98.
- Nakao T, Grünert E. 1990. Effects of dystocia on postpartum adrenocortical function in dairy cows. *J Dairy Sci.* 73: 2801-2806.
- Nelson ST, Martin AD, Osteras O. 2010. Risk factors associated with cystic ovarian disease in Norwegian dairy cattle. *Acta Vet Scand.* 52:60.
- Nett TM, Staigmiller RB, Akbar AM, Diekman MA, Ellinwood WE, Niswender GD. 1976. Secretion of prostaglandin F₂α in cycling and pregnant ewes. *J Anim Sci.* 42: 876-880.
- Nilsson EE, Doraiswamy V, Skinner MK. 2003. Transforming growth factor-beta isoform expression during bovine ovarian antral follicle development. *Mol Reprod Dev.* 66: 237-246.
- Nilsson EE, Skinner MK. 2003. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod.* 69: 1265-1272.
- Niswender GD. 1981. Mechanisms controlling luteolysis. En: Schwartz NB, Hunzicker-Dunn M, Dynamics of ovarian function. p 153. Ed. Raven Press, New York.
- Noble KM, Tebble JE, Harvey D, Dobson H. 2000. Ultrasonography and hormone profiles of persistent ovarian follicles (cysts) induced with low doses of progesterone in cattle. *J Reprod Fertil.* 120: 361–366.
- Noden DM, de Lahunta A. 1985. Derivates of the intermédiaire mesoderm: reproductive organs. En: Noden D, de Lahunta A, Embryology of Domestic Animals. p 322-327. Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, London.
- Nohno T, Ishikawa T, Saito T, Hosokawa K, Noji S, Wolsing DH, Rosenbaum JS. 1995. Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem.* 270: 22522–22526.

- Oktay K, Karlikaya G, Akman O, Ojakian GK, Oktay M. 2000. Interaction of extracellular matrix and activin-A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. *Biol Reprod.* 63: 457-461.
- Oktem O, Oktay K. 2008. Stem cells: a perspective on oocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1127: 20-26.
- Orsi NM. 2008. Cytokine networks in the establishment and maintenance of pregnancy. *Hum Fertil.* 11: 222-230.
- Orsi NM, Tribe RM. 2008. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J Neuroendocrinol.* 20: 462-469.
- Ortega HH, Althaus R, Taboada A, Gallardo M. 1997. Niveles de urea y amonio en sangre y leche de bovinos y su influencia sobre la reproducción. *Revista F.A.V.E.* 10: 33-39.
- Ortega HH, Lorente JA, Mira GA, Baravalle C, Salvetti NR. 2004. Constant light exposure causes dissociation in gonadotrophin secretion and inhibits partially neuroendocrine differentiation of Leydig cells in adult rats. *Reprod Domest Anim.* 39: 417-423.
- Ortega HH, Maciel M, Gallardo M, Taboada A. 1995. Influencia de la Ingestion de Proteínas Sobre la Reproducción. *Therios.* 24: 306-314.
- Ortega HH, Marelli BE, Rey F, Amweg AN, Díaz PU, Stangaferro ML, Salvetti NR. 2015. Molecular aspects of bovine cystic ovarian disease pathogenesis. *Reproduction.* 149: 251-264.
- Ortega HH, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2008. Insulin-like growth factor I in ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous and induced cystic ovarian disease. *Res Vet Sci.* 84: 419-427.
- Ortega HH, Salvetti NR, Müller LA, Amable P, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2007. Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with cystic ovarian disease. *J Comp Pathol.* 136: 222-230.
- Ortega HH, Salvetti NR, Padmanabhan V. 2009. Developmental programming: prenatal androgen excess disrupts ovarian steroid receptor balance. *Reproduction.* 137: 865-877.
- Otsuka F. 2010. Multiple endocrine regulation by bone morphogenetic protein system. *Endocr J.* 57: 3-14.

- Otsuka F, Moore RK, Iemura S, Ueno N, Shimasaki S. 2001. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem Biophys Res Commun*. 289: 961–966.
- Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. 2000. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem*. 275: 39523-39528.
- Padhy N, Sathya ML, Varma TR. 2009. Antral follicle size in the downregulated cycle and its relation to in vitro fertilization outcome. *J Hum Reprod Sci*. 2: 68-71.
- Pansky B. 1982. Review of Medical Embryology. En: Pansky B, The genital or reproductive system. Development of the female genital system: ovarian differentiation. p 104. Ed. Macmillan. New York.
- Park SS, Park MJ, Joo BS, Joo JK, Son JB, Lee KS. 2012. Improvement of ovarian response and oocyte quality of aged female by administration of bone morphogenetic protein-6 in a mouse model. *Reprod Biol Endocrinol*. 10: 117.
- Parrott JA, Skinner MK. 1998. Developmental and Hormonal Regulation of Keratinocyte Growth Factor Expression and Action in the Ovarian Follicle. *Endocrinology*. 139: 228-235.
- Pasquali R, Patton L, Pocognoli P, Cognigni GE, Gambineri A. 2007. 17-hydroxyprogesterone responses to gonadotropin-releasing hormone disclose distinct phenotypes of functional ovarian hyperandrogenism and polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 92: 4208-4217.
- Passos MJ, Vasconcelos GL, Silva AW, Brito IR, Saraiva MV, Magalhães DM, Costa JJ, Donato MA, Ribeiro RP, Cunha EV, Peixoto CA, Campello CC, Figueiredo JR, van den Hurk R, Silva JR. 2013. Accelerated growth of bovine preantral follicles in vitro after stimulation with both FSH and BMP-15 is accompanied by ultrastructural changes and increased atresia. *Theriogenology*. 79: 1269-1277.
- Pellatt L, Hanna L, Brincat M, Galea R, Brain H, Whitehead S, Mason H. 2007. Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 92: 240-245.
- Penarrubia J, Fabregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R, Carmona F, Vanrell JA, Balasch J. 2005. Basal and stimulation day 5 anti-Müllerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive

- technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist: gonadotropin treatment. *Hum Reprod.* 20: 915-922.
- Pereira RC, Rydziel S, Canalis E. 2000. Bone morphogenetic protein-4 regulates its own expression in cultured osteoblasts. *J Cell Physiol.* 182: 239-246.
- Peter AT, Levine H, Drost M, Bergfelt DR. 2009. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology.* 71: 1343-1357.
- Peter AT. 2004. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod Domest Anim.* 39:1-7.
- Peter AT, Liptrap RM. 1985. Plasma gonadotrophin levels in sows with experimental cystic ovarian follicles. *Br Vet J.* 141: 288-296.
- Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. 1997. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol.* 11: 1486-1496.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 45.
- Pfeiffer KE, Jury LJ, Larson JE. 2014. Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. *Domest Anim Endocrinol.* 46: 58-64.
- Phillips DJ, de Kretser DM. 1998. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol.* 19: 287:322.
- Pierre A, Pisselet C, Dupont J, Bontoux M, Monget P. 2005. Bone morphogenetic protein 5 expression in the rat ovary: biological effects on granulosa cell proliferation and steroidogenesis. *Biol Reprod.* 73: 1102-1108.
- Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. 2006. Serum anti-Müllerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 91: 941-945.
- Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. 2003. Elevated serum level of anti-müllerian hormone in patients with polycystic ovary

- syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 5957-5962.
- Polat IM, Alçığır E, Pekcan M, Vural SA, Özenç E, Canatan HE, Küplülü Ş, Dal GE, Yazlık MO, Baklaci C, Vural MR. 2015. Characterization of transforming growth factor beta superfamily, growth factors, transcriptional factors, and lipopolysaccharide in bovine cystic ovarian follicles. *Theriogenology.* 84: 1043-1052.
- Price CA, Silva JM. 1999. Intracellular regulation of P450 aromatase by FSH and insulin in bovine granulosa cells. *J Reprod Fertil.* 23: 5.
- Probo M, Comin A, Mollo A, Cairoli F, Stradaioli G, Veronesi MC. 2011. Reproductive performance of dairy cows with luteal or follicular ovarian cysts after treatment with buserelin. *Anim Reprod Sci.* 127:135-139.
- Pursley JR, Martins JP. 2011. Impact of circulating concentrations of progesterone and antral age of the ovulatory follicle on fertility of high-producing lactating dairy cows. *Reprod Fertil Dev.* 24: 267-271.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂alpha and GnRH. *Theriogenology.* 44: 915-923.
- Qiao J, Feng HL. 2011. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Reprod Update.* 17: 17-33.
- Rahe CH, Owens RE, Fleeger JL, Newton HJ, Harms PG. 1980. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology.* 107: 498-503.
- Rajakoski E. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinol.* 34: 1-68.
- Reece WO, Erickson HH, Goff JP, Uemura EE. 2015. Female Reproduction in Mammals. En: Reece WO, Dukes' Physiology of Domestic Animals. p 673. Ed. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey.
- Refsal KR, Jarvin-Maldano 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 gonadotrofins in dairy cows with naturally occurring ovarian cysts. *Theriogenology*. 30: 679-693
- Revah I, Butler WR. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil*. 106: 39-47.
- 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.
- Richards JS. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev*. 5: 725-751.
- Richards JS, Hedin L. 1988. Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Annu Rev Physiol* 50: 441-463.
- Richards JS, Jahnsen T, Hedin L, Lifka J, Ratoosh S, Durica JM, Goldring NB. 1987. Ovarian follicular development: From physiology to molecular biology. *Recent Prog Horm Res*. 43: 231-276.
- Richards JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M, Alliston TN. 1998. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol Cell Endocrinol*. 145: 47-54.
- Rico C, Drouilhet L, Salvetti P, Dalbiès-Tran R, Jarrier P, Touzé JL, Pillet E, Ponsart C, Fabre S, Monniaux D. 2012. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reprod Fertil Dev*. 24: 932-944.
- Rico C, Fabre S, Me´digue C, di Clemente N, Cle´ment F, Bontoux M, Touze´ JL, Dupont M, Briant E, Re´my B, Beckers JF, Monniaux D. 2009. Antimüllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropinresponsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol Reprod*. 80: 50-59.

- Rico C, Médigue C, Fabre S, Jarrier P, Bontoux M, Clément F, Monniaux D. 2011. Regulation of anti-Müllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Biol Reprod.* 84: 560-571.
- Rippe CA. 2009. El ciclo estral. Dairy Cattle Reproduction Council. Dairy Cattle Reproduction Conference. Minneapolis, Minnesota y Boise, Idaho. p 111-115.
- Rivera GM, Fortune JE. 2003. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology* 144: 2977-2987.
- Roberson MS, Wolfe MW, Stumpf TT, Kittok R J, Kinder J E. 1989. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol Reprod.* 41: 997-1003.
- Robinson T, Sutherland A, Sutherland J. 2007. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. *Vet Immunol Immunopathol.* 115: 160-165.
- Roche JF. 1996. Control and regulation of folliculogenesis- a symposium in perspective. *Rev Reprod.* 1: 19-27.
- Roche JF. 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci.* 96: 282-296.
- Roche JF, Ireland JJ. 1981. Effect of exogenous progesterone on time of occurrence of the LH surge in heifers. *J Anim Sci.* 52:580-586.
- Rodríguez FM, Colombero M, Amweg AN, Huber E, Gareis NC, Salvetti NR, Ortega HH, Rey F. 2015. Involvement of PAPP-A and IGFR1 in Cystic Ovarian Disease in Cattle. *Reprod Domest Anim.* 50: 659-668.
- 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.
- Rodríguez FM, Salvetti NR, Panzani CG, Barbeito CG, Ortega HH, Rey F. 2011. Influence of insulin-like growth factor-binding proteins-2 and -3 in the pathogenesis of cystic ovarian disease in cattle. *Anim Reprod Sci.* 128: 1-10.

- Rossi RO, Costa JJ, Silva AW, Saraiva MV, Van den Hurk R, Silva JR. 2015. The bone morphogenetic protein system and the regulation of ovarian follicle development in mammals. *Zygote*. 23: 1-17.
- 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.
- Rukkwamsuk T, Green MJ, Kruip TA, Wensing T. 2000. Interrelation of fatty acid composition in adipose tissue, serum, and liver of dairy cows during the development of fatty liver postpartum. *J Dairy Sci*. 83: 52-59.
- Rüsse I, Sinowatz F. 1991. Gametogenese & harn- und geschlechtsorgane. En. Rüsse I, Sinowatz F, *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. p 51, 70 y 314. Ed. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.
- Ryan KJ, Smith OW. Biogenesis of estrogens by the human ovary. I. 1961. Conversion of acetate-1-C-14 to estrone and estradiol. *J Biol Chem*. 236: 705-709.
- Saitou M, Yamaji M. 2010. Germ cell specification in mice: Signaling, transcription regulation, and epigenetic consequences. *Reproduction*. 139: 931-942.
- Salvetti NR, Acosta JC, Gimeno EJ, Müller LA, Mazzini RA, Taboada AF, Ortega HH. 2007b. Estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptors in normal bovine ovarian follicles and cystic ovarian disease. *Vet Pathol*. 44: 373-378.
- Salvetti NS, Alfaro NA, Velazquez MML, Amweg A, 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.
- Salvetti NR, Gimeno EJ, Lorente JA, Ortega HH. 2004. Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. *Cells Tissues Organs*. 178: 117-125.
- Salvetti NR, Panzani CG, Gimeno EJ, Neme LG, Alfaro NS, Ortega HH. 2009. An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats. *Reprod Biol Endocrinol*. 7: 68.
- Salvetti NR, Rey F, Ortega H H. 2007a. Enfermedad quística ovárica bovina. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias*. 6: 72-87.

- 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.
- 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.
- Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil.* 83: 663-671.
- Savio JD, Thatcher WW, Morris GR, Entwistle K, Drost M, Mattiacci MR. 1993. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing device on follicular turnover and fertility in cattle. *J Reprod Fertil.* 98: 77-84.
- Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RM, Debeljuk L, White WF. 1971. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science.* 173: 1036-1038.
- Schams D, Berisha B. 2002. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol.* 23: 53-65.
- Schams D, Kohlenberg S, Amselgruber W, Berisha B, Pfaffl MW, Sinowatz F. 2003. Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J Endocrinol.* 177:305-317.
- Selvaraju S, Folger JK, Gupta PS, Ireland JJ, Smith GW. 2013. Stage-specific expression and effect of bone morphogenetic protein 2 on bovine granulosa cell estradiol production: regulation by cocaine and amphetamine regulated transcript. *Domest Anim Endocrinol.* 44: 115-120.
- Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Andrade ER, Binelli M, Oliveira JA, Nascimento AB. 2003. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasoundguided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology.* 59: 1435-1440.

- Senger PL. 2004. Pathways to pregnancy and parturition. p 373. Ed. Current Conceptions, Washington.
- Shaham-Albalancy A, Rosenberg M, Folman Y, Graber Y, Meidan R, Wolfenson D. 2000. Two methods of inducing low plasma progesterone concentrations have different effects on dominant follicles in cows. *J Dairy Sci.* 83: 2771-2778.
- Sheldon IM, Dobson H. 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci.* 8283: 295-306.
- Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yano T, Nishii O, Taketani Y. 2009. Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin beta subunits, and anti-Müllerian hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 92: 1794-1798.
- Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Nishii O, Yano T, Taketani Y. 2010. Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) increases the expression of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 93: 1273–1279.
- Shimasaki S, Moore RK, Erickson GF, Otsuka F. 2003. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reprod Suppl.* 61: 323-337.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev.* 25: 72-101.
- Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, Erickson GF. 1999. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci.* 96: 7282-7287.
- Shimizu T, Kayamori T, Murayama C, Miyamoto A. 2012a. Bone morphogenetic protein (BMP)-4 and BMP-7 suppress granulosa cell apoptosis via different pathways: BMP-4 via PI3K/PDK-1/Akt and BMP-7 via PI3K/PDK-1/PKC. *Biochem Biophys Res Commun.* 417: 869-873.
- Shimizu T, Magata F, Abe Y, Miyamoto A. 2012b. Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) and BMP-7 induce vascular endothelial growth factor expression in bovine granulosa cells. *Anim Sci J.* 83:663-667.
- Shimizu T, Yokoo M, Miyake Y, Sasada H, Sato E. 2004. Differential expression of bone morphogenetic protein 4–6 (BMP-4, -5, and -6) and growth differentiation factor- 9

- (GDF-9) during ovarian development in neonatal pigs. *Domest Anim Endocrinol.* 27: 397-405.
- Shushan A, Peretz T, Uziely B, Lewin A, Mor-Yosef S. 1996. Ovarian cysts in premenopausal and postmenopausal tamoxifen-treated women with breast cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 174: 141-144.
- Silva JRV, van den Hurk R, van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR. 2005. Expression of growth differentiation factor-9 (GDF-9), bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol Reprod Dev.* 70: 11-19.
- Silva JRV, van den Hurk R, van Tol HT, Roelen BA, Figueiredo JR. 2006. The Kit ligand/c-Kit receptor system in goat ovaries: gene expression and protein localization. *Zygote.* 14: 317-328.
- 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.
- Sirois J, Fortune JE. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod.* 39: 308-317.
- Sirois J, Fortune JE. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology.* 127: 916-925.
- Sisco B, Pfeffer PL. 2007. Expression of activin pathway genes in granulosa cells of dominant and subordinate bovine follicles. *Theriogenology.* 68: 29-37.
- Skinner MK. 2005. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update.* 11: 461-471.
- Smitz JE, Cortvrindt RG. 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction.* 123: 185-202.
- Song K, Krause C, Shi S, Patterson M, Suto R, Grgurevic L, Vukicevic S, van Dinther M, Falb D, Ten Dijke P, Alaoui-Ismaili MH. 2010. Identification of a key residue mediating bone morphogenetic protein (BMP)-6 resistance to noggin inhibition allows for engineered BMPs with superior agonist activity. *J Biol Chem.* 285: 12169-12180.

- Souza CJ, Campbell BK, McNeilly AS, Baird DT. 2002. Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction*. 123: 363–369.
- Spicer L, Echtenkamp S. 1995. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Dom Anim Endocrinol*. 12: 223-245.
- Stangaferro ML, Matiller V, Díaz PU, Ortega HH, Rey F, Rodríguez FM, Silva MA, Salvetti NR. 2014. Role of activin, inhibin, and follistatin in the pathogenesis of bovine cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci*. 148: 97-108.
- Staples GR, Burke JM, Thatcher WW. 1998. Influence of supplemental fats on reproductive tissue and performance of lacting cows. *J Anim Sci*. 81: 856-871.
- Stock AE, Fortune JE. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*. 132: 1108-1114
- Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ. 2008. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*. 135: 111-121.
- Sugino H, Sugino K, Nakamura T. 1994. The activin-binding protein. En: Burger H, Findlay J, Robertson D, de Kretser D, Petraglia F, *Frontiers in Endocrinology Volume 3: Inhibin and Inhibin-related Proteins*. p 69-80. Ed. Ares-Serono Symposia, Rome.
- Sun J, Zhuang FF, Mullersman JE, Chen H, Robertson EJ, Warburton D, Liu YH, Shi W. 2006. BMP4 activation and secretion are negatively regulated by an intracellular gremlin-BMP4 interaction. *J Biol Chem*. 281:29349-29356.
- Sunak N, Green DF, Abeydeera LR, Thurston LM, Michael AE. 2007. Implication of cortisol and 11beta-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.

- Taft R, Ahmad N, Inskeep EK. 1996. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *J Anim Sci.* 74: 2985-2991.
- Takahashi M, Hayashi M, Manganaro TF, Donahoe PK. 1986. The ontogeny of Mullerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod.* 35: 447-453.
- Takebayashi K, Takakura K, Wang H, Kimura F, Kasahara K, Noda Y. 2000. Mutation analysis of the growth differentiation factor-9 and -9B genes in patients with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 74: 976-979.
- Teixeira Filho FL, Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang RJ, Shimasaki S, Erickson GF. 2002. Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 1337-1344.
- ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K. 1994. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem.* 269: 16985-16988.
- 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: 445-852.
- Trimberger GW, Hansel W. 1955. Conception rate and ovarian functions following estrus control by progesterone injections in dairy cattle. *J Anim Sci.* 14: 224-232.
- Urist MR. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 150: 893-899.
- van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, Fauser BJ, Themmen AP, te Velde ER. 2005. Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril.* 83: 979-987.
- Vanholder T, Leroy JL, Dewulf J, Duchateau L, Coryn M, de Kruif A, Opsomer G. 2005. Hormonal and metabolic profiles of high-yielding dairy cows prior to ovarian cyst formation or first ovulation post partum. *Reprod Domest Anim.* 40: 460-467.
- 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.

- Velázquez MM, Alfaro NS, Salvetti NR, Stangaferro ML, Rey F, Panzani CG, Ortega HH. 2011. Levels of heat shock protein transcripts in normal follicles and ovarian follicular cysts. *Reprod Biol.* 11: 276-283.
- Velázquez MM, Salvetti NR, Amweg AN, Díaz PU, Matiller V, Ortega HH. 2013. Changes in the expression of Heat Shock Proteins in ovaries from bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Res Vet Sci.* 95: 1059-1067
- Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. 1984. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology.* 114: 1315-1320.
- Visser JA, Themmen AP. 2005. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 234: 81-86.
- Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 123: 127-138.
- Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel D, Hewick RM, Kerns KM, Lapan P, Luxenberg DP, McQuaid D, Moutsatsos IK, Nove J, Wozney JM. 1990. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci.* 87: 2220-2224.
- Webb R, Garnsworthy PC, Campbell BK, Hunter MG. 2007. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology.* 2007. 68: 22-29.
- Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci.* 82:63-74.
- Weck J, Fallest PC, Pitt LK, Shupnik MA. 1998. Differential gonadotropin-releasing hormone stimulation of rat luteinizing hormone subunit gene transcription by calcium influx and mitogenactivated protein kinase-signaling pathways. *Mol Endocrinol.* 12: 451-457.
- Wehrman ME, Roberson MS, Cupp AS, Kojima FN, Stumpf TT, Werth LA, Wolfe MW, Kittok RJ, Kinder JE. 1993. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 β -estradiol and increases conception in cows. *Biol Reprod.* 49: 214-220.

- West FD, Roche-Rios MI, Abraham S, Rao RR, Natrajan MS, Bacanamwo M, Stice SL. 2010. KIT ligand and bone morphogenetic protein signaling enhances human embryonic stem cell to germlike cell differentiation. *Hum Reprod.* 25: 168-178.
- Wiater E, Vale W. 2003. Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem.* 278: 7934-7941.
- Wigglesworth K, Lee KB, O'Brien MJ, Peng J, Matzuk MM, Eppig JJ. 2013. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110: 3723-3729.
- Wiltbank JN. 1966. Modification of ovarian activity in the bovine following injection of oestrogen and gonadotrophin. *Reprod Fert.* 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-17b. *J Anim Sci.* 63:361 (abstract)
- Wishart DF. 1977. Synchronization of oestrous in heifers using steroid (SC 5914, SC 9880, and SC 21009) treatment for 21 days: 2. The effect of treatment on the ovum collection and fertilisation rate and the development of the early embryo. *Theriogenology.* 8: 249-269.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. 1988. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science.* 242: 1528-1534.
- Wu YT, Tang L, Cai J, Lu XE, Xu J, Zhu XM, Luo Q, Huang HF. 2007. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Hum Reprod.* 22: 1526-1531.
- Xiao S, Robertson DM, Findlay JK. 1992. Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 131: 1009-1016.
- Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod.* 53: 951-957.

- Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH, Miyazono K. 1995. Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol.* 130: 217-226.
- Yang MY, Fortune JE. 2008. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol Reprod.* 78: 1153-1161.
- Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ. 2000. Requirement of BMP8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol.* 14: 1053-1063.
- Ying Y, Zhao GQ. 2001. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol.* 232: 484-492.
- Yoshioka K, Iwamura S, Kamomae H. 1996. Ultrasonic observations on the turnover of ovarian follicular cysts and associated changes of plasma LH, FSH, progesterone and oestradiol-17 β in cows. *Res Vet Sci.* 61: 240-244.
- Zaied AA, Garverick HA, Kesler DJ, Bierschwal CJ, Elmore RJ, Younquist RS. 1981. Luteinizing hormone response to estradiol benzoate in cows with ovarian cyst. *Theriogenology.* 16: 349-358.
- Zulu VC, Sawamukai Y, Nakada K, Kida K, Moriyoshi M. 2002. Relationship among insulin-like growth factor-I, blood metabolites and post partum ovarian function in dairy cows. *J Vet Med Sc.* 64: 879-885.