

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

“Expresión de Receptores de Hormonas Esteroides: Subtipos e Isoformas, en la Enfermedad Quística Ovárica Bovina”

Lic. Natalia Soledad Alfaro

Director de Tesis: Dr. Hugo H. Ortega

Laboratorio de Biología Celular y Molecular
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Litoral

-2012-

Dedicada: ...

*...a mis Padres, que me incentivaron a perseguir mis sueños y
nunca dejaron de apoyarme...*

...a mis hermanas, por acompañarme en todo momento...

...a toda mi familia...

*...a Germán, por cuidar, alimentar, contener mi inquieta alma
con la dulzura de su amor.*

AGRADECIMIENTOS

- A mi Director Dr. Hugo Ortega por brindarme la posibilidad de realizar mi trabajo de investigación y por estar comprometido en su tarea en cuanto a mi formación profesional.
- A la Dra. Celina Baravalle por guiarme, por brindarme sus experiencias y conocimientos, por su colaboración desinteresada y por sobre todas las cosas por su amistad.
- A mis queridos amigos y compañeros de trabajo... Ayelén Amweg, Fernanda Rodríguez, Carolina Panzani, Valentina Matiller, Elizabet Pereyra, Sol Renna, Melisa Velázquez, Carolina Andreotti, Belkis Marelli, Eugenia Baravalle, Luciana Fullana, Carolina Gaggiamo, Silvina Pujato, Mónica Cadoche, Magali Colombero, Natalia Gareis, Matías Stangaferro, Pablo Díaz, Adrián Perri, Leandro Neme, Marcelo Zayas y Germán Benítez por ayudarme en las tareas del laboratorio, por estar siempre dispuestos a colaborar y por regalarme su alegría durante todos estos años.
- A las Dras. Florencia Rey y Bibiana Dallard por su buena predisposición a contestar todas mis dudas relacionadas con el doctorado y por los gratos momentos compartidos.
- A la Dra. Natalia Salvetti, por brindarme sus conocimientos en cuanto a tareas experimentales y por aportarte críticas interesantes en las correcciones de manuscritos.
- A Rocío Marini por su calidez humana.
- A Raquel Pastor por escucharme y aconsejarme.
- A Perla por tantos momentos compartidos y por sus consejos.
- A Adela por su ejemplo de mujer luchadora.
- A Pepe Delgado por cederme gentilmente su espacio físico para la redacción de mi trabajo de Tesis.
- A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y al Doctorado en Ciencias Biológicas por dar el marco académico para el desarrollo de la presente Tesis.
- A la Facultad de Ciencias Veterinarias, por darme un lugar en su casa de estudios para que pudiera crecer como profesional.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la Beca que me permitió finalizar los estudios de posgrado en la carrera del doctorado en Ciencias Biológicas.
- A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por otorgarme la beca y los subsidios necesarios para el desarrollo de este trabajo de Tesis.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS UTILIZADAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	ix
SUMMARY	xiii
1- INTRODUCCIÓN	1
1.1- Ovarios	2
1.1.1- Estructura del ovario	2
1.1.2- Ovogénesis	3
1.1.3- Desarrollo folicular	4
<i>1.1.3.1- Fases del desarrollo folicular</i>	5
1.1.4- Ovulación	8
1.1.5- Cuerpo lúteo	9
1.1.6- Atresia folicular	10
1.1.7- Ciclo estral	11
<i>1.1.7.1- Fases del ciclo estral</i>	11
<i>1.1.7.2- Regulación del ciclo estral</i>	13
<i>1.1.7.3- Dinámica folicular durante el ciclo estral</i>	16
<i>1.1.7.3.1- Reclutamiento cíclico</i>	17
<i>1.1.7.3.2- Selección y dominancia folicular</i>	18
1.2- Hormonas gonadotróficas y sus receptores	19
1.3- Hormonas esteroides y sus receptores	22
1.3.1- Características generales	22
1.3.2- Progesterona	25
1.3.3- Andrógenos	26
1.3.4- Estrógenos	28
1.4- Proteínas Correguladoras	31
1.4.1- Proteínas coactivadoras	32
<i>1.4.1.1- Familia SRC/p160</i>	32
1.4.2- Proteínas correpresoras	33
<i>1.4.2.1- REA</i>	34
<i>1.4.2.2- SMRT</i>	35
<i>1.4.2.3- LCoR</i>	36

1.5- Enfermedad Quística Bovina	36
1.5.1- Definición	36
1.5.2- Incidencia y prevalencia	37
1.5.3- Factores predisponentes en la formación de quistes ováricos	37
<i>1.5.3.1- Factores Generales</i>	<i>37</i>
<i>1.5.3.2- Factores Específicos</i>	<i>38</i>
1.5.4- Patogenia	40
<i>1.5.4.1- Disfunción Hipotálamo-Hipofisaria</i>	<i>40</i>
<i>1.5.4.2- Disfunción Ovárica</i>	<i>42</i>
2- OBJETIVOS	46
2.1- General	47
2.2- Específicos	47
3- MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1- Modelo experimental	50
3.1.1- Selección del modelo	50
3.1.2- Animales	50
3.1.3- Grupos experimentales	51
3.1.4- Ultrasonografía	52
3.2- Identificación y obtención de muestras de ovarios de animales con COD espontánea obtenidos a campo	52
3.3- Toma de muestras	53
3.3.1- Muestras provenientes del modelo experimental	53
3.3.2- Muestras provenientes de casos de COD espontánea obtenidas a campo	54
3.3.3- Muestras de quistes espontáneos provenientes de frigorífico	54
3.4- Procesamiento de las muestras	55
3.4.1- Muestras	55
<i>3.4.1.1- Muestras de pared folicular</i>	<i>55</i>
<i>3.4.1.2- Muestras de células de la granulosa</i>	<i>55</i>
<i>3.4.1.3- Muestras de células de la teca</i>	<i>55</i>
<i>3.4.1.4- Muestras de líquido folicular</i>	<i>56</i>
<i>3.4.1.5- Muestras de ovarios normales y quísticos para procesamiento histológico ..</i>	<i>56</i>
3.4.2- Procesamiento de las muestras destinadas a Inmunohistoquímica	56
3.4.3- Procesamiento de las muestras destinadas a Western Blot	57

3.4.4- Procesamiento de las muestras destinadas a las técnicas de Biología molecular	57
3.4.4.1- Extracción de ARN total	57
3.4.4.2- Lectura espectrofotométrica de ácidos nucleicos	58
3.4.4.3- Eliminación del ADN genómico	58
3.5- Clasificación de las estructuras foliculares	58
3.6- Localización y Cuantificación de la expresión proteica por Inmunohistoquímica sobre muestras de tejido ovárico	59
3.6.1- Técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) indirecta	59
3.6.2- Análisis digital de imágenes	61
3.7- Determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados en IHQ mediante Western Blot	62
3.7.1- Corrida electroforética	62
3.7.2- Electrotransferencia	62
3.7.3- Inmunodetección de las proteínas analizadas en IHQ sobre muestras de tejido ovárico	63
3.8- Evaluación de la expresión del ARNm mediante RT-PCR	64
3.8.1- Caracterización de muestras de células de la granulosa y de la teca	64
3.8.2- Diseño y selección de oligonucleótidos para receptores hormonales y proteínas correguladoras	64
3.8.3- Control interno	67
3.8.4- Procedimiento general de la técnica de la transcriptasa reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	67
3.8.4.1- Transcripción Reversa	67
3.8.4.2- Técnica de PCR	68
3.8.5- Electroforesis en geles de agarosa	68
3.8.6- Análisis de imágenes	69
3.8.7- Secuenciación de los productos de amplificación	69
3.9- Análisis estadístico	69
3.10- Normas éticas y de bioseguridad	70
4- RESULTADOS	71
4.1- Caracterización de la inducción de la COD	72
4.2- Caracterización de muestras de células de la granulosa y de la teca	74
4.3- Análisis de la expresión del gen normalizador	74
4.4- Evaluación de los patrones de expresión de los receptores hormonales en estructuras foliculares	75

4.4.1- Receptores de hormonas gonadotróficas	75
4.4.1.1- Receptor de FSH	75
4.4.1.1.1- <i>Expresión del ARNm del RFSH por PCR de punto final</i>	75
4.4.1.2- Receptor de LH	76
4.4.1.2.1- <i>Expresión del ARNm del RLH por PCR de punto final</i>	76
4.4.2- Receptores de hormonas esteroides	78
4.4.2.1- Receptor de andrógenos	78
4.4.2.1.1- <i>Localización y cuantificación de la expresión del RA por Inmunohistoquímica</i>	78
4.4.2.1.2- <i>Determinación de la especificidad del anticuerpo anti-RA</i>	80
4.4.2.1.3- <i>Expresión del ARNm del RA por PCR de punto final</i>	81
4.4.2.2- Receptores de estrógenos α y β	83
4.4.2.2.1- <i>Expresión del ARNm de las isoformas del RE por PCR de punto final .</i>	83
4.4.2.3- Receptor de progesterona y sus isoformas	86
4.4.2.3.1- <i>Expresión del ARNm de las isoformas del RP por PCR de punto final .</i>	86
4.5- Evaluación de los patrones de expresión de las proteínas correguladoras en estructuras foliculares	90
4.5.1- Proteínas coactivadoras	90
4.5.1.1- Proteína SRC-1	91
4.5.1.1.1- <i>Expresión del ARNm de SRC-1 por PCR de punto final</i>	91
4.5.1.2- Proteína SRC-2	92
4.5.1.2.1- <i>Expresión del ARNm de SRC-2 por PCR de punto final</i>	92
4.5.1.3- Proteína SRC-3	93
4.5.1.3.1- <i>Localización y cuantificación del la expresión de SRC-3 por Inmunohistoquímica</i>	93
4.5.1.3.2- <i>Determinación de la especificidad del anticuerpo anti-SRC-3 por Western Blot</i>	96
4.5.1.3.3- <i>Expresión del ARNm de SRC-3 por PCR de punto final</i>	96
4.5.2- Proteínas correpressoras	98
4.5.2.1- Proteínas REA y SMRT	98
4.5.2.1.1- <i>Localización y cuantificación del la expresión de REA y SMRT por Inmunohistoquímica</i>	98
4.5.2.1.1.1- <i>Inmunomarcación para REA</i>	98
4.5.2.1.1.2- <i>Inmunomarcación para SMRT</i>	100
4.5.2.1.2- <i>Determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados para detectar proteínas correpressoras mediante Western Blot</i>	102

4.5.2.2- <i>Proteína LCoR</i>	103
4.5.2.2.1- <i>Expresión del ARNm de LCoR por PCR de punto final</i>	103
4.6- Evaluación de la enfermedad quística ovárica en muestras de ovarios de animales con COD espontánea obtenidos a campo	104
4.6.1- Características observadas en las vacas con COD diagnosticada a campo	104
4.6.2- Expresión de receptores hormonas esteroides y de enzimas esteroidogénicas en “muestras de casos a campo”	107
5- DISCUSIÓN	110
5.1- Inducción de la enfermedad quística ovárica en bovinos	111
5.2- Expresión de los receptores de hormonas gonadotróficas	112
5.3- Expresión de los receptores de hormonas esteroides	115
5.4- Expresión de las proteínas correguladoras	124
5.5- Evaluación de la expresión de receptores de hormonas esteroides y de enzimas esteroidogénicas en muestras diagnosticadas a campo	130
6- CONCLUSIONES	136
7- BIBLIOGRAFÍA	141
8- PUBLICACIONES	168
9- ANEXO I	172
10- ANEXO II	179

ABREVIATURAS UTILIZADAS

µg	Microgramo
µm	Micrómetro
3β-HSD	Enzima 3β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa
A₄	Androstenodiona
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ADNsc	Ácido desoxirribonucleico simple cadena
AMH	Hormona anti-mulleriana
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
COD	Enfermedad quística ovárica
CRH	Hormona liberadora de corticotrofina
CyP17	Enzima citocromo P450 17α-hidroxilasa/17,20 liasa
CyP19	Enzima aromatasa
DBD	Dominio de unión al ADN
DAB	Diaminobencidina
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DHT	Dihidrotestosterona
dNTPs	Desoxiribonucleótidos trifosfato
DOI	Densidad óptica integrada
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FG	Folículo grande
FM	Folículo mediano
FP	Folículo pequeño
FSH	Hormona foliculoestimulante
FQ	Folículo quístico
G	Granulosa
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HDAC	Desacetilasas de histonas
HRE	Elemento de respuesta a hormona
HSP	Proteínas de golpe de calor
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IHQ	Inmunohistoquímica
kDa	Kilodaltons
Kg	Kilogramo
KO	Knock Out
LBD	Dominio de unión al ligando
LCoR	<i>del inglés: ligand-dependent nuclear-receptor corepressor</i>
LH	Hormona luteinizante
MCRs	Receptores de melanocortinas

mg	Miligramo
MgCl	Cloruro de magnesio
MHz	Megahertz
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de Mercurio
MMLV	<i>del inglés: Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase</i>
MMP	Metaloproteinasas de matriz
OMI	Factor inhibidor de la meiosis
ON	Toda la noche
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
pb	pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCOS	Síndrome Poliquístico Ovárico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PG	Prostaglandina
PM	Peso molecular
POMC	Proopiomelanocortina
RA	Receptor de andrógeno
RE	Receptor de Estrógenos
REA	<i>del inglés: Repressor of oestrogen receptor activity</i>
RFSH	Receptor de FSH
RIP140	<i>del inglés: Receptor-interacting protein-140</i>
RLH	Receptor de LH
RP	Receptor de progesterona
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a la Reacción en cadena de la polimerasa
SEM	Error Estándar de la Media
SMRT	<i>del inglés: Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors</i>
SNC	Suero normal de cabra
SRC	Coactivadores de receptores esteroides
SWI/SNF	<i>del inglés: SWItch/Sucrose Non Fermentable</i>
T	Testosterona
TBS	Tris buffer salino
TBS-T	Tris buffer salino con el agregado de Tween
TGFβ	Factor transformador de crecimiento β
TE	Teca externa
TI	Teca interna
UA	Unidades arbitrarias
UI	Unidad internacional
WB	Western Blot

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Pág.
Figura 1: Estructura del ovario	2
Figura 2: Anatomía del Ovario	3
Figura 3: Desarrollo folicular	8
Figura 4: Etapas del ciclo estral bovino	13
Figura 5: Regulación del ciclo estral	15
Figura 6: Representación esquemática de la dinámica folicular en bovinos	17
Figura 7: Expresión de los receptores de las hormonas gonadotróficas hipofisarias	20
Figura 8: Esquema de la síntesis de hormonas esteroides sexuales	23
Figura 9: Dominios funcionales de un receptor nuclear de hormonas esteroides	25
Figura 10: Estructura de los receptores de hormonas esteroides	30
Figura 11: Complejos de coactivadores y correpresores requeridos para la regulación transcripcional mediada por los receptores nucleares	31
Figura 12: Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes ováricos foliculares mediante administración de ACTH	51
Figura 13: Diagrama de los dominios funcionales del RP bovino y sus variantes	66
Figura 14: Ultrasonografía de un animal con un quiste folicular de 31,03 x 21,66 mm en el ovario derecho	73
Figura 15: Quiste folicular de más de 30 mm de diámetro obtenido luego de la castración .	73
Figura 16: Detalle de la pared folicular de un quiste de un animal con COD inducida	73
Figura 17: Detalle de la pared folicular de un quiste de un animal con COD espontánea ...	73
Figura 18: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR de GAPDH	75
Figura 19: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR del RFSH	76
Figura 20: Semicuantificación del ARNm del RFSH en estructuras foliculares bovinas	76
Figura 21: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR del RLH	77
Figura 22: Semicuantificación del ARNm del RLH en estructuras foliculares bovinas	78
Figura 23: Detección del RA en estructuras foliculares bovinas	79
Figura 24: Inmunomarcación del RA en estructuras foliculares bovinas	80
Figura 25: Especificidad del anticuerpo anti-RA en estructuras foliculares bovinas	81
Figura 26: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR del RA	82
Figura 27: Semicuantificación del ARNm del RA en la pared folicular de ovarios bovinos	82
Figura 28: Semicuantificación del ARNm del RA en estructuras foliculares bovinas	83
Figura 29: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR de las isoformas del RE	84
Figura 30: Semicuantificación del ARNm de las isoformas del RE en la pared folicular de ovarios bovinos	85

Figura 31: Semicuantificación del ARNm de las isoformas del RE en estructuras foliculares bovinas	86
Figura 32: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados del RP en la pared folicular de ovarios bovinos	87
Figura 33: Semicuantificación del ARNm del RP en la pared folicular de ovarios bovinos .	87
Figura 34: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR de las isoformas del RP en estructuras foliculares bovinas	88
Figura 35: Semicuantificación del ARNm de las isoformas del RP en estructuras foliculares bovinas	90
Figura 36: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR de SRC-1	91
Figura 37: Semicuantificación de ARNm de SRC-1 en estructuras foliculares bovinas	92
Figura 38: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR de SRC-2	93
Figura 39: Semicuantificación del ARNm de SRC-2 en estructuras foliculares bovinas	93
Figura 40: Detección de SRC-3 en estructuras foliculares bovinas	94
Figura 41: Inmunomarcación de SRC-3 en estructuras foliculares bovinas	95
Figura 42: Especificidad del anticuerpo anti-SRC-3 en estructuras foliculares bovinas	96
Figura 43: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR de SRC-3	97
Figura 44: Semicuantificación del ARNm de SRC-3 en estructuras foliculares bovinas	97
Figura 45: Detección de REA en estructuras foliculares bovinas	99
Figura 46: Inmunomarcación de REA en estructuras foliculares bovinas	100
Figura 47: Detección de SMRT en estructuras foliculares bovinas	101
Figura 48: Inmunomarcación de SMRT en estructuras foliculares bovinas	102
Figura 49: Especificidad de los anticuerpos para las proteínas correpressoras en estructuras foliculares bovinas	103
Figura 50: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR de LCoR	103
Figura 51: Semicuantificación del ARNm de LCoR en estructuras foliculares bovinas	104
Figura 52: Características ecogénicas de los quistes foliculares	106
Figura 53: Identificación de los transcritos de los receptores de hormonas esteroides en muestras de células obtenidas mediante la técnica de aspirado folicular	109

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas	Pág.
Tabla 1: Clasificación de las estructuras foliculares utilizadas	59
Tabla 2: Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunohistoquímica. Diluciones de uso, tipo de recuperación antigénica empleada, modo de incubación del anticuerpo primario y procedencia del mismo	61
Tabla 3: Estándares de PM para SDS-PAGE, amplio espectro. Kaleidoscope Prestained Standards 161-0324. Bio-Rad	62
Tabla 4: Anticuerpos utilizados en la técnica de Western Blot	63
Tabla 5: Secuencia de oligonucleótidos, posición del fragmento utilizado y condiciones usadas en la técnica de PCR punto final	65
Tabla 6: Condiciones utilizadas para PCR en termociclador	68
Tabla 7: Características observadas en las vacas quísticas estudiadas, que ponen de manifiesto la gran variabilidad existente en los quistes ováricos	105

RESUMEN

La etiopatogenia de la enfermedad quística ovárica (COD *del inglés: Cystic Ovarian Disease*) en el ganado bovino lechero es un proceso complejo que involucra disfunción en la foliculogénesis y en la ovulación, y en el que intervienen muchos factores tales como el estrés, manejo e infecciones. Aunque se sabe que el desarrollo de esta enfermedad está principalmente asociado con una disfunción neuroendócrina a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, en la persistencia folicular también intervienen factores intraováricos. Muchos investigadores han estudiado los cambios hormonales que ocurren en estos animales y a partir de estos trabajos puede afirmarse que las vacas destinadas a la formación de quistes tienen una mayor concentración plasmática de hormona luteinizante (LH) y de estrógenos que las vacas que ciclan normalmente. Estos folículos continúan secretando alto niveles de estrógenos por al menos 4 días después de que alcanzan el tamaño preovulatorio. Una alteración en la secreción de las hormonas gonadotróficas afecta directamente la descarga de las hormonas esteroides, la expresión de los receptores de hormonas esteroides y de los receptores de gonadotrofinas. Las hormonas esteroides ováricas, por mecanismos de acción endocrinos, cumplen una gran cantidad de funciones relacionadas con el desarrollo y la fertilidad actuando también en forma autocrina y paracrina sobre las mismas células que las secretaron. Los efectos genómicos de estas hormonas son mediados a través de su interacción con receptores específicos intracelulares, que son miembros de la superfamilia de receptores nucleares. Además, han sido identificadas proteínas correguladoras, que están implicadas en la modulación de la actividad transcripcional de los esteroides. Las proteínas correguladoras pueden ser subdivididas en coactivadoras y correpresoras. La acción tripartita de los receptores de hormonas esteroides, que involucra la participación del receptor, sus ligandos y proteínas correguladoras, permite la regulación precisa de los efectos biológicos de estas hormonas en la expresión génica. El objetivo de la presente Tesis fue examinar la localización y expresión de receptores de las hormonas gonadotróficas, de los receptores de hormonas esteroides y de las proteínas correguladoras en las estructuras foliculares del ovario de vacas con COD en comparación con las estructuras de los ovarios de las vacas controles. Se utilizaron muestras de ovarios de distintas procedencias: muestras obtenidas en la playa de faena de los frigoríficos de la zona, animales en producción con desarrollo espontáneo de la enfermedad y animales sometidos a un modelo experimental de inducción de COD por medio de la administración de ACTH sintética. Los quistes foliculares fueron

diagnosticados cuando los folículos tenían más de 20 mm de diámetro y ausencia de cuerpo lúteo funcional. Las muestras obtenidas fueron procesadas de acuerdo a las distintas técnicas y a los fines de ser utilizadas para la evaluación de la expresión proteica del receptor de andrógeno (RA) y de las proteínas correguladoras: SRC-3 (*del inglés: Steroid Receptor Coactivator-3*), REA (*del inglés: repressor of estrogen receptor activity*) y SMRT (*del inglés: Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors*) mediante inmunohistoquímica; y para la evaluación de la expresión del ARNm de los receptores de hormonas gonadotróficas: RLH y RFSH; de los receptores de hormonas esteroides: estrógenos α (RE α), estrógenos β (RE β), progesterona (RP) y RA; y de las proteínas correguladoras: SRC-1, SRC-2, SRC-3 y LCoR (*del inglés: ligand-dependent nuclear-receptor corepressor*) mediante RT-PCR de punto final. Los hallazgos en este trabajo proporcionan evidencia de que los ovarios de los animales con COD inducida y espontánea mostraron una expresión alterada de los receptores de gonadotropinas y de los receptores de esteroides en comparación con los animales controles, así como cambios en la expresión de las proteínas correguladoras. Los resultados presentados en esta Tesis nos permiten llegar a las siguientes conclusiones: 1- Los folículos quísticos espontáneos presentaron una baja expresión de los receptores de las hormonas gonadotróficas en las células de la granulosa, similar observación se halló en la expresión del ARNm de los RLH en las células de la teca; 2- La inmunomarción del RA mostró variaciones durante el desarrollo folicular normal, hallándose patrones diferentes entre los folículos ováricos de animales con enfermedad quística ovárica en relación a los controles. En cuanto a su ARNm, los folículos quísticos espontáneos evidenciaron un aumento significativo en las células de la granulosa; 3- Los quistes foliculares provenientes de frigorífico mostraron una mayor expresión del ARNm del RE α y una menor expresión del RE β en las células de la granulosa y de la teca; 4- En los animales con COD espontánea se observó un aumento significativo en la expresión de los transcritos que abarca las tres isoformas del RP en las células de la teca y de la isoforma B del en las células de la granulosa; 5- Sabiendo que el ciclo estral normal es un proceso estrictamente regulado por el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y que las hormonas esteroides y gonadotróficas son esenciales para la función ovárica de diversas especies, regulando el desarrollo, la diferenciación celular y la esteroidogénesis cualquier cambio y/o alteración en los mecanismos de transcripción y/o regulación de los receptores de hormonas esteroides y gonadotróficas podrían ser cruciales

en la patogenia de esta enfermedad; 6- La expresión proteica y del ARNm de las proteínas correguladoras fue observada en las células de la granulosa y de la teca de todas las categorías foliculares. La inmunomarcación de REA, SMRT y SRC-3 mostraron diferencias entre animales controles y animales con COD espontánea e inducida. Un patrón diferencial del ARNm de SRC-1, SRC-2 y SRC-3 fue demostrado en los folículos quísticos espontáneos comparados con los folículos antrales normales. No se evidenciaron diferencias significativas en la expresión del ARNm de LCoR entre grupos controles y con COD espontánea; 7- Las diferencias halladas en la expresión de las proteínas correguladoras entre las estructuras foliculares normales y quísticas, considerando que regulan la actividad transcripcional de los receptores esteroides, podrían provocar importantes alteraciones en la dinámica folicular. En este sentido, podrían intervenir en el desbalance proliferación/apoptosis, así como también en otras alteraciones observadas en los ovarios de los animales con la enfermedad; 8- La falta de información sobre la historia reproductiva y de la duración de la enfermedad en los animales de los que se obtienen las muestras de quistes en playa de faena resaltan la necesidad de la utilización de modelos experimentales apropiados que reproduzcan adecuadamente la manera en que los quistes se forman. Las diferencias encontradas entre el modelo utilizado y los casos espontáneos de quistes obtenidos en frigorífico probablemente se deban a la gran cantidad de variables que intervienen en estos últimos. Este problema podría subsanarse a través del estudio de casos de la enfermedad espontánea que ocurre en animales diagnosticados en los rodeos de la zona, de los cuales se puede conocer la historia reproductiva además de otras variables tales como la alimentación, tratamientos, manejo general, enfermedades concomitantes, etc. Además la utilización de técnicas poco invasivas, como por ejemplo el aspirado folicular guiado por ecografía, permitiría la obtención de muestras para el estudio de la gran cantidad de componentes que intervienen en la etiopatogenia de esta enfermedad.

SUMMARY

The etiopathogenia of cystic ovarian disease (COD) in dairy cattle is a complex process that involves dysfunctions in folliculogenesis and ovulation, and many factors such as stress, management and infections. Although it is known that the development of cysts is primary associated with a neuroendocrine dysfunction at the level of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, the development of follicular cysts is also related to intraovarian factors. Many researchers have studied the hormonal changes that occur in these animals, and from that work can be said that the cows destined to form cysts have higher plasmatic concentrations of luteinizing hormone (LH) and estradiol than cows that will ovulate normally, particularly during the last several days of follicular maturation. These follicles continue secreting a high level of estradiol for at least 4 days after they reach preovulatory size. An alteration in the secretion of follicle stimulating hormone (FSH) and LH directly affects the discharge of steroid hormones, the expression of steroid hormone and gonadotrophic hormone receptors. The ovarian steroid hormones, by endocrine mechanisms of action, play a lot of functions related to development and fertility; steroids also act as autocrine and paracrine agents on the same cells that secreted. In addition to acting as hormones on structures remote from the ovary, the steroids produced by the follicle or corpora lutea cells also act locally within the follicles or corpora lutea as paracrine/autocrine agents, acting on or within the cells in which they are produced. The genomic effects of steroid hormones mediate through interaction with specific intracellular receptors that are members of the nuclear receptor superfamily. Also, several coregulatory proteins have been identified, which are implicated in modulation of transcriptional activity by steroids. These coregulators can be broadly subdivided into coactivators and corepressors. The tripartite action of steroid hormone receptors, involving the receptor, its ligands and coregulatory proteins, allows for the precise regulation of the biological effects of these hormones on gene expression. The aim of the present study was to examine the localization and expression of steroid hormone receptors, gonadotrophic hormone receptor, and transcription factors that module steroid hormone receptor in ovarian follicular structures from cows with COD compared with ovarian structures from control group. Samples of cows were used and assigned to following groups: samples from slaughterhouses; samples from cattle with spontaneous COD; and animals subjected to an experimental model of induction of COD by synthetic ACTH administration. Follicular cysts were diagnosed when the follicles were more than 20 mm in diameter, in absence of

a functional *corpus luteum*. The samples were processed according to different techniques and for the purpose of being used to evaluate the protein expression of androgen receptor (AR) and coregulatory proteins: Steroid Receptor Coactivator-3 (SRC-3), Repressor of Estrogen receptor Activity (REA) and Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors (SMRT) by immunohistochemistry, and for evaluating the mRNA expression of gonadotrophic hormone receptor: LHR and FSHR; steroid hormone receptor: estrogen α (ER α), estrogen β (ER β), progesterone (PR) and AR; and coregulatory proteins: SRC-1, SRC-2, SRC-3, and Ligand-dependent nuclear-receptor CoRepressor (LCoR) by conventional RT-PCR. The findings of the current study provide evidence that ovaries from animals with induced and spontaneous COD exhibited altered steroid receptor and gonadotrophic hormone receptor expression compared with normal animals, as well as changes in the expression of coregulatory proteins. On the results presented in this thesis we can conclude: 1- The cystic follicles from slaughterhouse had low expression of both gonadotrophic hormone receptors (RFSH and RLH) in granulosa cells and low genic expression in RLH in theca cells; 2- The immunoexpression of AR showed variations during the normal follicular development, finding different patterns between the ovarian follicles of animals with cystic ovarian disease in relation to controls. Regarding its mRNA, cystic follicles from slaughterhouse showed a significant increase in the granulosa cells; 3- The cystic follicles from slaughterhouse showed a higher estrogen receptor α (ER α) mRNA expression in the theca and granulosa cells and a lower estrogen receptor β (ER β) mRNA expression; 4- In animals with spontaneous COD was observed a significant increase in expression of transcripts encompassing the three isoforms of the PR in the theca cells and the B isoform in granulosa cells; 5- Taking into account that normal estrous cycle in cattle is a complex process strictly regulated by the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, and that gonadotrophic and steroid hormones are essential for ovarian function in various species (which act to regulate development, cell differentiation and steroidogenesis); it could be postulated that small changes and/or alteration in the mechanisms of transcription and/or regulation of steroid hormone receptors and gonadotrophic hormone receptors could play a fundamental role in the pathogenesis of this disease; 6- The protein and mRNA expression of coregulatory proteins were observed in granulosa and theca of all follicles categories. The protein expression of REA, SMRT, and SRC-3 showed differences between normal animals compared to animals with spontaneous and induced COD. A

different pattern of SRC-1, SRC-2, and SRC-3 mRNA expression was demonstrated in the cystic follicles compared to normal antral follicles. No differences of mRNA expression were evidenced in LCoR, between control and spontaneous COD groups; 7- The differences found in the expression of coregulatory proteins between normal and cystic follicles, considering that they regulate the transcriptional activity of steroid receptors, could be produce important alterations in follicular dynamics. In this sense, they might be involved in the imbalance of proliferation/apoptosis, as well as another alterations observed in the ovaries of animals with COD; 8- The lack of information on reproductive history and lenght of the disease in animals with cystic follicles (samples obtained in slaughterhouse) highlight the need to use appropriate experimental models that reproduce adequately the pathogenia. The differences found between the experimental model and cysts obtained in slaughterhouse are probably due to the large number of variables involved in these latter samples. This problem could be addressed through the study of spontaneous cases of the disease, which can be known reproductive history and other variables such as diet, treatments, general management, concomitant diseases, etc. Besides the use of minimally invasive techniques, such as ultrasound-guided follicular aspiration, allow sampling for the study of the many components involved in the pathogenesis of this disease.

1- INTRODUCCIÓN

1.1- Ovarios

1.1.1- Estructura del ovario

Los ovarios son órganos pares situados en la cavidad abdominal y su forma varía en las distintas especies, de acuerdo con la edad y las etapas del ciclo estral (Sisson, 1982; Urroz, 2010). También existen características que dependen, de si la especie es politoca (multípara) o monotoca (unípara). En general, en las hembras politocas como la cerda, perra, gata, etc., tienen el aspecto de un racimo de uvas debido a la presencia de varios folículos maduros y cuerpos lúteos. En cambio en las hembras monotocas como la vaca, oveja, cabra, etc, su forma es ovoide y su superficie cambia de forma por la presencia del folículo maduro o de un cuerpo lúteo (Dyce y col., 1991; Labadía Mazuecos, 1995). En la Figura 1 se muestra las distintas morfologías que presentan los ovarios según la especie.

Los ovarios constituyen los órganos esenciales en la reproducción de la hembra y cumplen una doble función: ovogénica (productora de óvulos) y esteroidogénica (secretora de hormonas sexuales). Esta dualidad funcional es complementaria, puesto que la ovogénesis requiere de ciertos cambios en el aparato genital (oviductos, útero y vagina) que están asociados a las hormonas sexuales (Labadía Mazuecos, 1995; Urroz, 2010).



Ovario Bovino



Ovario Porcino

Figura 1: Estructura del ovario. En las hembras monotocas, como la vaca, el ovario tiene forma ovoide (izquierda, Fernández Sánchez, 2008a). En las hembras politocas, como la cerda, el ovario presenta un aspecto de racimo de uvas (derecha, Martinat-Botté y col., 2005).

Cada ovario está formado por una corteza externa y una médula central sin una delimitación clara entre ambas. La médula contiene tejido conectivo, vasos sanguíneos y

linfáticos, nervios y tejido intersticial. En la corteza, situados periféricamente alrededor de la médula, se encuentran folículos en diferentes fases de desarrollo, cuerpos lúteos, glándulas intersticiales (en algunas especies) y células del estroma (Figura 2). La corteza se encuentra rodeada de una capa de tejido conectivo llamada *túnica albugínea* que a su vez está recubierta por un epitelio superficial llamado *epitelio germinal* (Labadía Mazuecos, 1995). La ubicación y presencia de estos componentes depende del estadio del ciclo y además es propia de cada especie (Dellmann y Eurell, 1998). El ovario de los mamíferos es, por lo tanto, un órgano heterogéneo en cuanto a la población celular presente en un momento dado, y también lo es en el tiempo, a lo largo de la vida del individuo (Geneser, 2005).

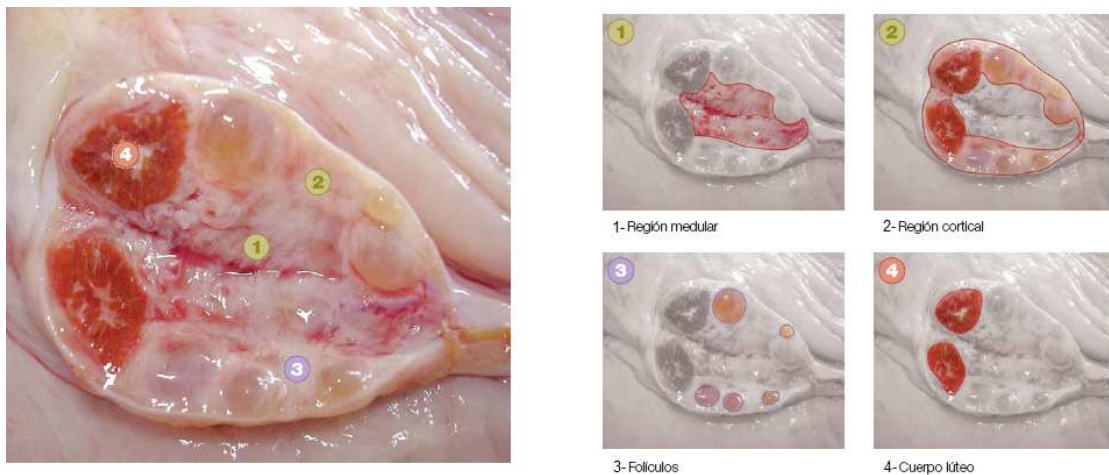


Figura 2: Anatomía del Ovario. El ovario se compone de dos zonas: región medular (1) (abarca la región central del ovario, contiene tejido conectivo, vasos y fibras nerviosas) y la región cortical (2) (contiene folículos (3) en diferentes estadios, cuerpos lúteos (4) y el estroma del ovario) (Modificado de Fernández Sánchez, 2008a).

1.1.2- Ovogénesis

Durante los primeros estadios de la gestación las células germinales primordiales abandonan el saco vitelino para ir a poblar las crestas gonadales de las que derivan los ovarios. Estas células se diferencian en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, las que a su vez se transforman en ovocitos cuando inician el proceso de reducción del número

de cromosomas a estado haploide mediante la primera división meiótica. Sin embargo, este proceso se detiene en la profase de la meiosis por la influencia de un factor secretado por las propias células foliculares en desarrollo. Este factor recibe el nombre de Factor Inhibidor de la Meiosis (OMI). En esta fase de inmovilización, los ovocitos (ovocitos primarios) se encuentran rodeados de una sola capa de células epiteliales formando los folículos primordiales (Labadía Mazuecos, 1995; Barioglio, 2001).

El número de ovocitos formados durante el desarrollo fetal constituye el número máximo disponible a lo largo de toda la vida reproductiva de la hembra (Labadía Mazuecos, 1995). Sin embargo, Johnson y col. (2004) han demostrado que dicha reserva puede ser mantenida por la posibilidad de proliferar que aún presentan, luego del nacimiento, las células germinales en algunos mamíferos.

1.1.3- Desarrollo folicular

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

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

1.1.3.1- Fases del desarrollo folicular

De acuerdo a lo establecido por la Nomina Histológica (1994) los folículos se clasifican en: folículos primordiales, primarios, secundarios, terciarios y preovulatorios (Figura 3).

Folículos primordiales: Constituyen la reserva de folículos en reposo, los cuales serán progresivamente reclutados para desarrollarse o atresarse durante la vida reproductiva de las hembras. Los folículos primordiales están compuestos por un ovocito, arrestado en el estadio de diploteno de la primera profase meiótica, rodeado por una capa de células planas epiteliales llamadas células foliculares. En esta fase, la superficie del ovocito está en estrecho contacto con la de las células foliculares y carece de células de la teca. La capa de células foliculares se encuentra inmediatamente por debajo de la túnica albugínea, en la periferia de la corteza (Dellmann y Eurell, 1998; Nilsson y Skinner, 2001; Espinaza-Villavicencio, 2007).

Folículos primarios: Los folículos primordiales continuamente abandonan el reservorio para convertirse en folículos primarios. Esta transición implica ciertas modificaciones citológicas en el ovocito, en las células foliculares y en el tejido conjuntivo adyacente. A medida que el ovocito aumenta de tamaño, la capa de células foliculares aplanadas se convierte en una capa de células cúbicas o cilíndricas pero continúa siendo una capa simple. Los ovocitos primarios continúan en estado de diploteno de la primera profase meiótica en donde permanecerán hasta el momento de la ovulación en la mayoría de las especies (Dellmann y Eurell, 1998; Aerts y Bols, 2008a).

Folículos secundarios: La transformación del folículo primario a secundario (también definido junto con los folículos primarios como folículos preantrales) implica diversos cambios en las células foliculares que rodean al ovocito entre las que se destacan la intensa división mitótica y consiguiente estratificación paulatina del epitelio que originalmente era simple. En este momento las células pasan a denominarse granulosa. Alrededor de estas células aparece la lámina basal, que se origina por secreción de las propias células de la granulosa. Además, en esta etapa se completa la maduración de la zona pelúcida. La

adquisición de la zona pelúcida es una característica del folículo secundario. Simultáneamente las células de la granulosa comienzan a desarrollar procesos citoplasmáticos, que atraviesan la zona pelúcida formando zonas de contacto físico con la membrana plasmática del ovocito, manteniendo de esta forma un contacto directo con el ovocito para poder proporcionarle los nutrientes necesarios. Coincidiendo con la proliferación de la capa de células de la granulosa, las células del estroma ovárico comienzan a organizarse alrededor de la lámina basal del folículo originando las células precursoras de la teca (Labadía Mazuecos, 1995; Aerts y Bols, 2008a).

A medida que los folículos aumentan de tamaño, van desplazándose gradualmente hacia el interior de la corteza. Al final de esta fase de desarrollo folicular, el ovocito detiene su crecimiento y se vuelve competente para recomenzar la meiosis. A medida que el desarrollo del folículo continúa, se forman pequeñas vesículas llenas de líquido entre las células de la granulosa. Este líquido llamado *líquido folicular* aumenta a medida que crece el folículo y los espacios que se forman entre las células de la granulosa confluyen formando amplias lagunas (Dellmann y Eurell, 1998).

Este estadio folicular constituye el máximo grado de desarrollo alcanzado en el ovario de las hembras prepúberes, el cual se caracteriza porque no participarían las gonadotrofinas hipofisarias.

Folículos terciarios: La evolución de los folículos secundarios a terciarios (o folículos antrales) constituye un proceso lento que se inicia cuando el animal alcanza la pubertad, ya que en esta etapa de crecimiento folicular participan las gonadotrofinas hipofisarias (hormona foliculoestimulante: FSH y hormona luteinizante: LH), así como las hormonas esteroideas producidas por el folículo en respuesta a la secreción hipofisaria de estas gonadotrofinas. Durante esta fase, las células de la capa de la granulosa proliferan aumentando el número de capas. Al mismo tiempo, las células precursoras de la teca aparecen completamente diferenciadas formando dos capas concéntricas. La interna, formada por células epiteloides, que serán transformadas en células cuboides secretoras de hormonas esteroideas, recibe el nombre de *teca interna*. Rodeando la teca interna aparece la *teca externa* formada principalmente por tejido conectivo. Ambas capas de la teca reciben una abundante vascularización, que se concentra fundamentalmente en la teca interna, además de vasos linfáticos y terminaciones nerviosas. Los vasos sanguíneos no atraviesan

la lámina basal que rodea las células de la granulosa. Este hecho determina que tanto las células de la granulosa como el ovocito reciban los nutrientes procedentes de la sangre por difusión a través de la lámina basal, como consecuencia del desarrollo de los procesos citoplasmáticos que permiten la comunicación de las células de la granulosa entre sí, así como entre estas y el ovocito.

La coalescencia de las lagunas llenas de líquido folicular que se encuentran entre las células de la granulosa, formadas durante el desarrollo de folículos secundarios, lleva a la formación de una cavidad denominado *antro* y su aparición caracteriza al folículo terciario. Al ir incrementándose la producción de líquido folicular, el antro aumenta de tamaño y el ovocito en el interior del folículo va siendo desplazado hacia una posición excéntrica rodeado por dos a tres capas de células de la granulosa formando el *cumulus oophorus* (Labadía Mazuecos, 1995; Aerts y Bols, 2008a). En los folículos terciarios grandes, las células de la granulosa que rodean íntimamente al ovocito se vuelven cilíndricas y se disponen radialmente formando la *corona radiada* que lo nutre. Estas células permanecen en la mayoría de las especies junto al ovocito incluso después de la ovulación. En los rumiantes la corona radiada se disgrega en el momento de la ovulación (Dellmann y Eurell, 1998).

Folículos preovulatorios: Aquellos folículos terciarios que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración y han adquirido la habilidad para ovular frente a niveles adecuados de LH se denominan folículos preovulatorios. El ovocito responde al estímulo de LH reiniciando la meiosis transformándose en ovocito secundario (Gigli y col., 2006). Las células de la granulosa se agrandan y adquieren inclusiones lipídicas, mientras que en las células de la teca aparecen vacuolas y aumenta la vascularización. Estos folículos se caracterizan por una baja tasa mitótica de las células foliculares y una alta relación estrógenos:andrógenos y estrógenos:progesterona en el líquido folicular. Además, las células de la granulosa presentan receptores de LH (RLH), alta producción de inhibina y alto flujo sanguíneo (Dellmann y Eurell, 1998).

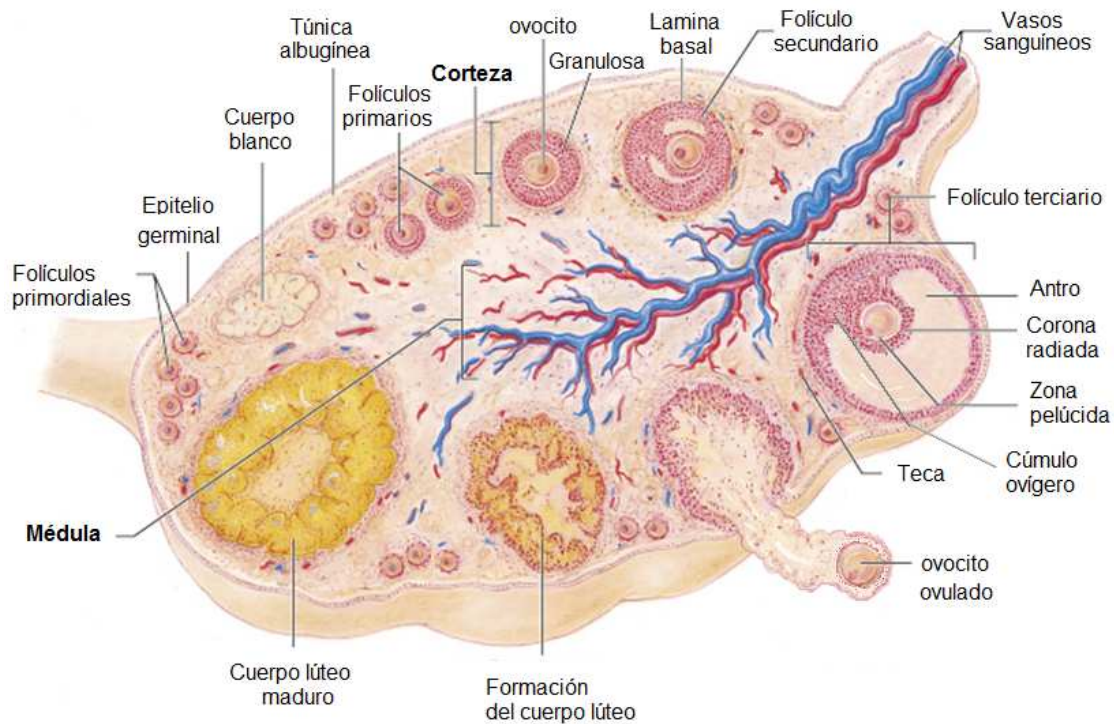


Figura 3: Desarrollo folicular. Esquema de un corte longitudinal de ovario adulto en el cual se observan las distintas categorías de folículos en crecimiento, la ovulación, cuerpo lúteo y cuerpo blanco (Modificado de Enciclopedia Británica, 2007).

1.1.4- Ovulación

Se define como ovulación la culminación de una serie de mecanismos complejos desencadenados por una secreción masiva de LH, conocida como “pico de LH”, que como resultado produce la expulsión del ovocito secundario del folículo preovulatorio (Rahe y col., 1980). Los sucesos de ovulación abarcan cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos. El aumento preovulatorio de LH incrementa la expresión de las enzimas proteolíticas y sus factores inhibitorios permitiendo que la ovulación sea un proceso controlado. Por un lado, la plasmina aumenta a través de la activación del plasminógeno. La procolagenasa se activa en colagenasa degradando el colágeno de la teca externa y disminuyendo la tensión de la pared folicular. La plasmina aumenta tanto en las células de la granulosa como en las células tecales por estímulo de LH, pero la regulación en uno y otro tipo celular es diferente, sirviendo como control en la degradación del folículo. A

medida que se suceden los cambios de degradación del tejido conectivo se produce la formación del *estigma* en el ápice folicular. El estigma es la zona más delgada de la pared folicular por donde se liberará el ovocito en el momento de la ovulación (Gigli y col., 2006).

Por otro lado, las prostaglandinas (PG) y los tromboxanos, ácidos grasos derivados del ácido araquidónico, intervienen en el proceso de la ovulación de diferente forma. La PGF2 α y PGE2 intervienen en la ruptura de la pared folicular a través de la liberación de las enzimas contenidas en los lisosomas y en cambios vasculares (Tsai y Wiltbank, 1998). Los tromboxanos aumentan su expresión en los folículos preovulatorios. Su acción es antagónica al efecto producido por las PG a nivel vascular, logrando que la ovulación sea un proceso autocontrolado.

Los cambios vasculares comprenden un aumento en el flujo sanguíneo como respuesta al aumento de las PG y la activación del sistema renina-angiotensina y una disminución en la resistencia vascular, por las bradiquininas y radicales libres de oxígeno, llevando a una hiperemia localizada (Tsafiriri y Chun, 1996).

La ovulación, por lo tanto, es un proceso dinámico donde se produce ruptura de la pared folicular por la activación de enzimas proteolíticas y cambios vasculares. Los cambios en el aumento de la irrigación y en la producción del edema han llevado a comparar el proceso de la ovulación con un proceso inflamatorio (Espey y Lipner, 1994; Richards y col., 2008).

1.1.5- Cuerpo lúteo

Inmediatamente después de haberse producido la ovulación, las capas foliculares se reorganizan para convertirse en *cuerpo hemorrágico* en un principio y luego en *cuerpo lúteo*. El cuerpo lúteo es una glándula endocrina transitoria formada por las células foliculares remanentes del folículo que ha ovulado. Su principal función es la de secretar progesterona (Dellmann y Eurell, 1998). Si el ovocito es fecundado, el cuerpo lúteo se mantiene durante toda la gestación. Cuando no se produce fecundación y posterior gestación, hay una degeneración de las células foliculares remanentes del folículo que ovuló (llamadas *células luteínicas*) y proliferación del tejido conectivo, con acumulación

del material hialino intracelular, transformándose el cuerpo lúteo en *cuerpo blanco*, denominado así porque toma el aspecto de una cicatriz blanca. La degeneración física de esta glándula tiene lugar lentamente durante dos o tres semanas (Koning, 1994).

1.1.6- Atresia folicular

Las terneras al nacimiento poseen una dotación de folículos primordiales, que varía entre 42.000 y 325.000. Sin embargo, a los 10-15 años este número se reduce a 1000-5000, por lo que la mayoría de los folículos sufren cambios degenerativos como parte del funcionamiento del ovario (Gigli y col., 2006). El proceso degenerativo por el cual los folículos son eliminados antes de llegar a la ovulación se denomina *atresia* y todos los folículos pueden atresarse independientemente del momento del desarrollo en que se encuentren (Hsueh y col., 1994; Quirk y col., 2004). Cuando la atresia afecta a un folículo primordial o primario, el contorno del ovocito se hace irregular y las células foliculares disminuyen de volumen separándose unas de otras. El ovocito y las células granulosas entran en autólisis y son reemplazadas gradualmente por tejido conjuntivo.

En los folículos secundarios y terciarios el proceso es similar, observándose una mayor resistencia a la degeneración en la zona pelúcida y de este modo, las células que componen la pared folicular son degradadas antes de que el ovocito desaparezca por completo (Hsueh y col., 1994). En los folículos más desarrollados la gran cantidad de material en degeneración lleva a la aparición de macrófagos que van a fagocitar gran parte de los restos celulares. Las células del tejido conjuntivo invaden la zona y comienzan a producir matriz del tejido conectivo que va a reemplazar completamente al folículo en degeneración. Las células de la teca interna en algunas especies (roedores, caninos, humanos) se hipertrofian y pasan a formar parte del parénquima ovárico como glándulas intersticiales capaces de secretar hormonas esteroideas, principalmente andrógenos (Quirk y col., 2004), sin embargo no ocurre esto en los rumiantes.

1.1.7- Ciclo estral

Constituye un complejo proceso que se caracteriza por la repetición de períodos de receptividad sexual, a partir de la pubertad y durante la vida reproductiva de las hembras, regulados por el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Álvarez Díaz y col., 2009).

La duración del ciclo estral difiere notablemente de una especie a otra y suele ser constante dentro de cada especie y raza, aunque con oscilaciones entre cada individuo (Hafez, 1989). En la hembra bovina el ciclo estral tiene una duración entre 17 y 25 días (Senger, 2003).

1.1.7.1- Fases del ciclo estral

En el ciclo estral se distinguen dos fases, una *fase folicular o estrogénica* y una *fase luteínica*, que constituye dos tercios de la duración total del ciclo estral. La fase folicular consta a su vez de dos fases: *proestro* y *estro*; y la fase luteínica de otras dos: *metaestro* y *diestro* (Caravaca Rodríguez y col., 2003). Las distintas fases del ciclo estral se representan en la Figura 4.

Proestro: Constituye la etapa inicial de la fase folicular, comienza con la regresión estructural y funcional del cuerpo lúteo y finaliza con la manifestación del celo. A medida que el cuerpo lúteo involuciona y la concentración circulante de progesterona disminuye, se produce un aumento en la concentración de estradiol que juega un papel en el aumento del tono uterino (Bonafos y col., 1995) y la secreción de moco claro y acuoso de la vulva (Jainudeen y Hafez, 2000).

La dinámica folicular durante el proestro implica una regresión continua del folículo dominante de la onda anovulatoria previa que se superpone con el crecimiento del folículo dominante de la onda ovulatoria.

Estro: Constituye el último estadio de la fase folicular que comienza con la receptividad e involucra todos los cambios que permiten la ovulación del folículo dominante de la onda ovulatoria y el comienzo de la formación del cuerpo lúteo. Las vacas presentan descarga

vaginal de mucus con mínima viscosidad, edema de vulva y aumento del tono uterino, detectado fácilmente por palpación rectal (Bo, 1998).

Durante esta etapa, la concentración de estradiol alcanza su pico máximo en concordancia con el inicio de la receptividad sexual. El crecimiento final y la maduración del folículo preovulatorio se produce en asociación con una disminución en las concentraciones de estradiol y la onda preovulatoria de gonadotrofinas que involucra principalmente a LH y en una menor medida a FSH, entre las 24 y 30 horas antes de la ovulación (Senger, 2003).

Luego de 12 a 24 horas de comenzado el celo, el sistema nervioso de la vaca se torna refractario al estradiol y cesan todas las manifestaciones del mismo.

Metaestro: Es el período inmediato a la finalización del estro o es la etapa inicial de la fase lútea, que se inicia con la ovulación y termina con el diestro. En este período ocurre la ovulación en la vaca, a diferencia de las otras especies que lo hacen durante el celo (Bo, 1998). A nivel ovárico, el metaestro consiste en la luteinización de las células foliculares del folículo dominante luego de la ovulación (Peter y col., 2009). La luteinización es un proceso complejo que implica la remodelación del tejido estromal y vascular y la transformación celular y bioquímica de las células foliculares productoras de estrógenos (granulosa) y de andrógenos (teca) a células luteales productoras de progesterona (Niswender y col., 2000).

Diestro: Representa generalmente el estadio más largo del ciclo y se corresponde con el período de actividad del cuerpo lúteo. Esta fase comienza después de metaestro y termina al comienzo de la regresión del cuerpo lúteo. A lo largo del diestro, el cuerpo lúteo maduro mantiene concentraciones máximas de progesterona durante la emergencia de la segunda y tercera onda folicular en los ciclos estrales de dos o tres ondas, respectivamente.

En ausencia de fecundación del óvulo, se produce la regresión funcional y estructural del cuerpo lúteo pasando a convertirse en cuerpo blanco al comienzo del proestro del ciclo siguiente (Caravaca Rodríguez y col., 2003; Peter y col., 2009).

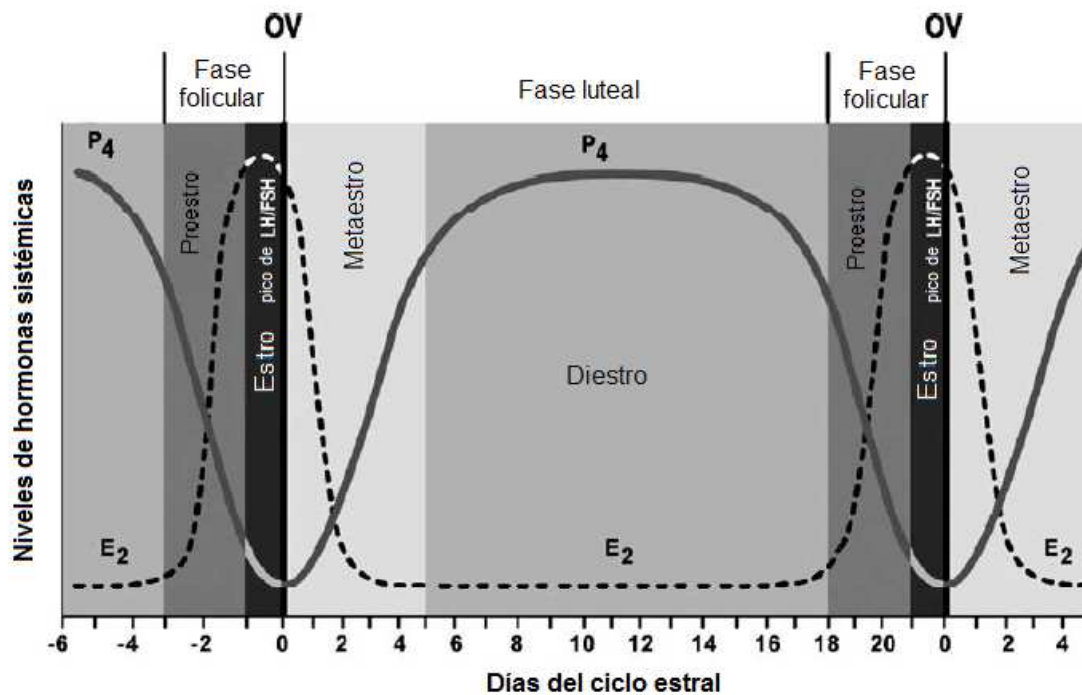


Figura 4: Etapas del ciclo estral bovino. El esquema muestra las etapas de la fase folicular y lútea en asociación con los respectivos cambios de las concentraciones circulantes de estradiol (E₂), progesterona (P₄) y la onda preovulatoria de gonadotropinas durante el ciclo estral bovino (Adaptado de Peter y col., 2009).

1.1.7.2- Regulación del ciclo estral

La reproducción en las hembras constituye un proceso cíclico estrictamente regulado por la interacción del hipotálamo, la hipófisis y los ovarios. El hipotálamo es el centro donde se integra y procesa la información procedente tanto del propio sistema nervioso central (sistemas de neurotransmisores y péptidos opioides endógenos), como del exterior (luz, estímulos olfatorios, etc.) y del ovario (hormonas ováricas). El resultado de esta integración es la regulación de la secreción de la *hormona liberadora de gonadotropinas* (GnRH). La GnRH es sintetizada en núcleos de neuronas localizadas en dos zonas del hipotálamo: región preóptica anterior (núcleo preóptico y supraquiasmático) y región arqueada (núcleo arqueado y ventromedial). Desde estas neuronas, la GnRH es transportada a través de sus axones terminales a la eminencia media hipotalámica, para pasar a la circulación portal y ser liberada en la parte anterior de la hipófisis

(*adenohipófisis*). La GnRH se une a los receptores de las células gonadotrofas hipofisarias regulando la secreción de las gonadotrofinas FSH y LH (Labadía Mazuecos, 1995). Es indispensable que su secreción se dé en forma pulsátil, para la secreción normal de gonadotrofinas hipofisarias (Hillier, 2001). Sin embargo, los pulsos secretores de gonadotrofinas varían durante el ciclo estral aumentando en la fase folicular y disminuyendo en la fase lútea del ciclo. Estas variaciones demuestran el efecto estimulador (*retroalimentación positiva*) e inhibidor (*retroalimentación negativa*) que ejercen las hormonas ováricas sobre el eje hipotálamo-hipofisario originando como consecuencia los ciclos reproductivos.

La acción de las hormonas ováricas en el hipotálamo determina dos tipos de secreción de las gonadotrofinas: “*tónica*” (región arqueada), manteniendo niveles basales, y “*cíclica*” (región preóptica anterior), que es la secreción en forma de “*pico*” de LH y en menor medida de FSH. La Figura 5 muestra las interacciones que se producen entre el hipotálamo, la hipófisis y el ovario durante el ciclo estral. Al comienzo de la fase folicular, los folículos inmaduros secretan pequeñas cantidades de estrógenos que inducen un efecto de retroalimentación negativa en el hipotálamo e hipófisis, provocando la secreción tónica de FSH y LH (Hafez, 1987). Cuando uno de los folículos alcanza la fase de folículo preovulatorio, el aumento sostenido de los niveles circundantes de estrógenos estimula el centro cíclico (retroalimentación positiva) produciéndose la secreción del “pico de LH”. Este pico desencadena la maduración final, ovulación y la luteinización de la estructura folicular remanente, con la consecuente formación del cuerpo lúteo. Además, los folículos en crecimiento secretan grandes cantidades de inhibina, que actúa en la hipófisis inhibiendo la secreción de FSH, sin alterar la secreción de LH, produciéndose la atresia de los restantes folículos (Bo y Caccia, 2003). La razón por la cual el folículo dominante puede crecer con niveles bajos de FSH mientras que los subordinados se atresian, puede estar relacionado con la síntesis de RLH en las células de la granulosa del folículo dominante (Ginther y col., 1996). Todos los folículos poseen RLH en las células de la teca y de receptores de FSH (RFSH) en las células de la granulosa (Ireland y Richards, 1978) pero únicamente el folículo dominante adquiere RLH en las células de la granulosa. La LH se unirá a los receptores de las células de la granulosa estimulando una mayor producción de estrógenos que le permitirá al folículo seguir creciendo aunque disminuyan los niveles de FSH circulante.

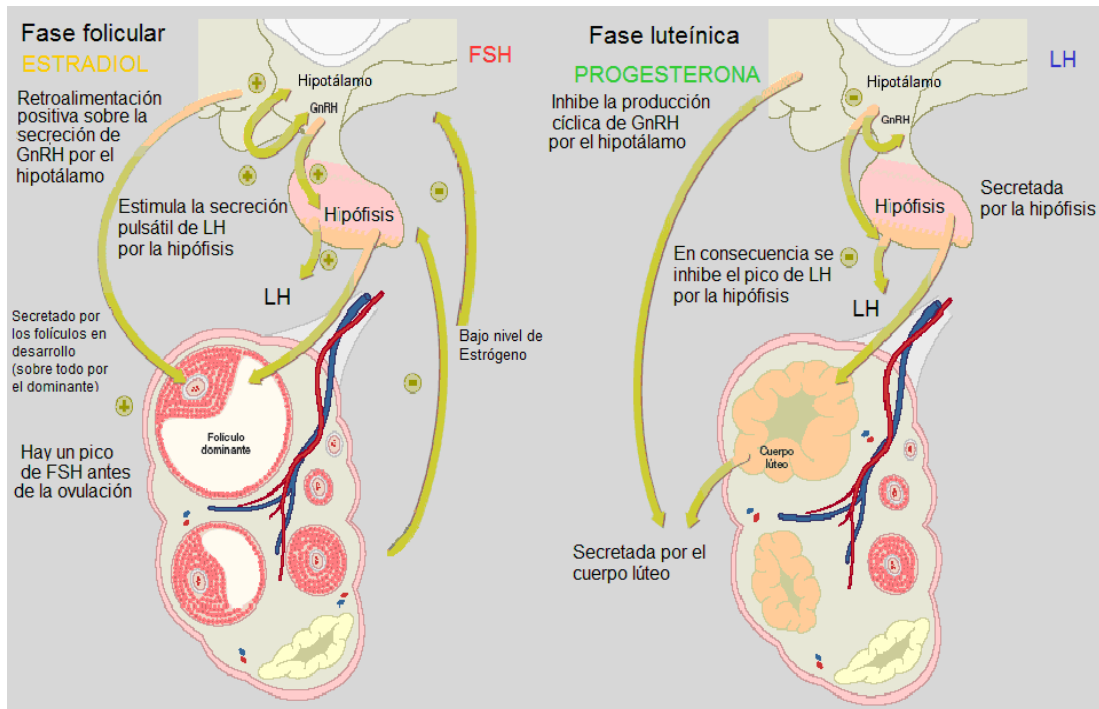


Figura 5: Regulación del ciclo estral. Esquema que ilustra en forma general, las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Modificado de Fernández Sánchez, 2008b).

La ovulación determina el final de la fase folicular y el comienzo de la fase lútea del ciclo. En esta fase del ciclo, la elevada concentración de progesterona, producida por el cuerpo lúteo, junto con la baja concentración de estrógenos, originan nuevamente la retroalimentación negativa de forma que las gonadotrofinas disminuyen a los niveles basales.

Finalmente, la luteólisis o regresión del cuerpo lúteo se produce por la secreción de PG, concretamente de $\text{PGF2}\alpha$ por el endometrio uterino no gestante, provocando la disminución en los niveles sanguíneos de progesterona al mismo tiempo que se inicia un nuevo ciclo (Pederson, 1970; Labadía Mazuecos, 1995; Richards y col., 2000).

1.1.7.3- Dinámica folicular durante el ciclo estral

El proceso de crecimiento continuo y regresión de folículos antrales que conduce al desarrollo del folículo preovulatorio se conoce como dinámica folicular y se refiere al crecimiento de dichas estructuras en oleadas u ondas. Durante un ciclo estral pueden ocurrir una o más ondas (Lucy y col., 1992). En cada onda folicular un grupo de folículos es reclutado para abandonar el estado de quiescencia e iniciar el proceso de crecimiento. De este conjunto, uno es seleccionado y finalmente se convierte en folículo dominante, mientras que el resto de los folículos (folículos subordinados) sufren atresia. Por lo tanto el folículo dominante de la última onda folicular en un ciclo estral está destinado a ovular (Savio y col., 1990).

En el bovino, el desarrollo folicular durante el ciclo estral ocurre con mayor frecuencia en un patrón de dos o tres ondas (Knopf y col., 1989). El número de ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral está determinado por la longitud de la fase luteal; si la progesterona declina mientras el folículo dominante de la segunda onda está en la fase de crecimiento posdesviación o en su fase estática temprana (3-4 días después de su desarrollo máximo) este folículo ovulará; sino sufrirá atresia y se originará una nueva onda (Taylor y Rajamahendran, 1991; Lucy y col., 1992; Lucy, 2007). En los ciclos estrales de dos o tres ondas, la emergencia de la primera onda folicular, ocurre generalmente alrededor del día de la ovulación. La emergencia de la segunda onda ocurre en el día 9-10 para los ciclos de dos ondas y el día 8-9 para los de tres ondas. En los ciclos de tres ondas, la tercera onda emerge en el día 15-16 (Figura 6).

Si bien aún no se han dilucidado todos los factores que afectan el desarrollo folicular, factores como el nivel nutricional, estrés calórico y estacionalidad pueden modificar el patrón de ondas foliculares (Murphy y col., 1991; Adams y Pierson, 1995; Zeitoun y col., 1996).

Independientemente de la especie y del número, cada onda folicular tiene tres fases (Armstrong y Webb, 1997):

1) Reclutamiento cíclico: en la que un grupo de folículos antrales adquiere la habilidad para responder a las gonadotrofinas y empieza a crecer rápidamente;

2) **Selección:** en la que un grupo de folículos es escogido para escapar del proceso de atresia y continuar creciendo;

3) **Dominancia:** en la que un folículo se desarrolla de forma más rápida que el resto, suprimiendo el crecimiento de los subordinados e impidiendo el reclutamiento de un nuevo grupo de estructuras foliculares.

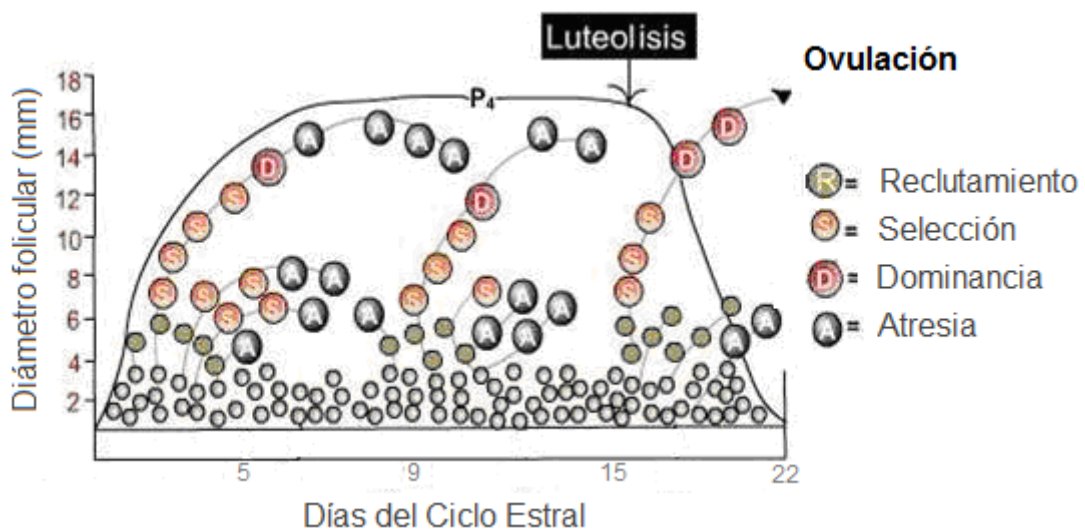


Figura 6: Representación esquemática de la dinámica folicular en bovinos. Durante el ciclo estral de la vaca regularmente ocurren 2 o 3 ondas foliculares. En cada onda, un grupo de folículos es reclutado para que inicien el proceso de crecimiento. De este conjunto, uno o varios son seleccionados y finalmente uno de ellos se convierte en dominante, el resto sufre atresia, en tanto que el folículo dominante de la última oleada está destinado a ovular (Espinoza-Villavicencio y col., 2007).

1.1.7.3.1- Reclutamiento cíclico

El reclutamiento cíclico tiene inicio después de la llegada a la pubertad como resultado de un aumento en los niveles de FSH circulante durante cada ciclo estral en el que un grupo de folículos antrales es rescatado del proceso de atresia (Adams y col., 1992). En este momento, los folículos han completado su crecimiento, adquirido la zona pelúcida y se encuentran competentes para reanudar la meiosis. De este modo, durante el reclutamiento cíclico, solo un número limitado de folículos sobrevivirá, mientras que el

resto entrará en atresia (Handel y Eppig, 1997; Trounson y col., 1998; McGee y Hsueh, 2000).

1.1.7.3.2- Selección y dominancia folicular

La selección folicular ocurre al final de la fase común de crecimiento del grupo de folículos reclutados en cada onda folicular. El folículo dominante seleccionado crece a una tasa constante y el resto de los folículos subordinados sufren atresia o temporalmente crecen a una velocidad menor y posteriormente dejan de hacerlo. A este fenómeno se lo ha denominado desviación (Ginther y col., 1997).

Por muchos años se consideró que el mecanismo de selección folicular estaba regulado únicamente por factores endocrinos, hoy se sabe que antes que los cambios en las concentraciones hormonales se hagan evidentes y mucho antes de que los cambios de tamaño sean visibles a través de la exploración ultrasonográfica, el mecanismo de selección está determinado por mecanismos intraováricos. Algunos eventos bioquímicos en el interior del folículo aseguran la futura dominancia de la estructura seleccionada (Beg y Ginther, 2006). Es posible que la LH esté involucrada en el proceso de selección, ya que los sucesos de desviación de tamaño y aumento de LH ocurren simultáneamente (Adams y col., 2008). Además el folículo dominante expresa más receptores para LH que los subordinados. El folículo dominante a comparación de los subordinados, presenta concentraciones mayores de estradiol en el líquido folicular (Ginther y col., 1997; Adams y col., 2008), del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) libre (debido a la disminución de las proteínas ligadoras de IGF) (Armstrong y Webb, 1997; Beg y col., 2002), activina-A e inhibina-A (Campbell y Baird, 2001; Knight y Glister, 2001), factores angiogénicos y otros factores intrafoliculares (Ireland y col., 2004) antes del desvío folicular, es decir, antes que la dominancia se haga evidente ecográficamente. En cambio, la concentración de progesterona intrafolicular recién es mayor en el dominante luego de producido el desvío folicular, deduciéndose que la progesterona no participa en el proceso de desviación folicular ya que es similar en subordinados y dominantes en el momento en que los folículos divergen. Por otro lado, Donadeu y Ginther (2002) demostraron que la concentración de androstenediona (A_4) es similar en los subordinados y en el dominante, lo

que lleva a suponer que la disminución de estrógenos en los folículos subordinados no es por falta de andrógenos. La mayor concentración de 17β -estradiol que se observa en el folículo dominante podría deberse a un mecanismo intrafolicular que amplifica el estímulo de FSH regulado por IGF (Rivera y Fortune, 2003). El folículo dominante tiene a su vez un sistema de retroalimentación positivo de auto-amplificación establecido por un mecanismo compuesto por el 17β -estradiol y el factor transformador de crecimiento β (TGF β) (sintetizado por la teca interna) que interactúa con FSH, para aumentar el número de células de la granulosa y acrecentar la actividad de la enzima aromatasas (CYP19) (Gigli y col., 2006). Por otra parte, la alta producción de inhibina producida por el folículo dominante actúa localmente (acción paracrina) inhibiendo el desarrollo de los folículos subordinados y en forma endocrina, por un mecanismo de retroalimentación negativo inhibiendo la liberación de FSH a nivel de la hipófisis (Gigli y col., 2006). Esta disminución de FSH no afecta al folículo dominante por poseer el sistema de amplificación mencionado previamente. Además, el folículo dominante es más eficiente en la obtención de nutrientes y factores de crecimiento por contar con mayor desarrollo de vasos sanguíneos (Redmer y Reynolds, 1996; Aerts y Bols, 2008b).

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

1.2- Hormonas gonadotróficas y sus receptores

Las hormonas FSH y LH sintetizadas por la adenohipófisis cumplen un papel relevante en el control neuroendocrino del ciclo estral. La FSH es la responsable del proceso de esteroidogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular, y la LH interviene en el proceso de esteroidogénesis ovárica, ovulación, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. Las acciones biológicas de las hormonas gonadotróficas

sobre las células del ovario son mediadas a través de su unión a receptores específicos localizados en la membrana plasmática (Kawate, 2004).

Las células de la granulosa en los folículos primarios y secundarios que están en las primeras fases del desarrollo, antes de la formación del antro, expresan principalmente RFSH. En estos folículos preantrales la unión de LH a su receptor específico está confinada a las células de la teca (Xu y col., 1995; Kronenberg y col., 2009). Además, se ha demostrado que el ARNm codificante para el RFSH se encuentra presente en células de la granulosa de los folículos terciarios de ovarios bovinos, mientras que la expresión del RLH en las células de la granulosa solo se observa en los folículos preovulatorios (Xu y col., 1995; Bao y Garverick, 1998; Luo y Wiltbank, 2006). En la Figura 7 se muestra de manera esquemática la expresión de los receptores de las hormonas gonadotróficas hipofisarias durante el ciclo estral.

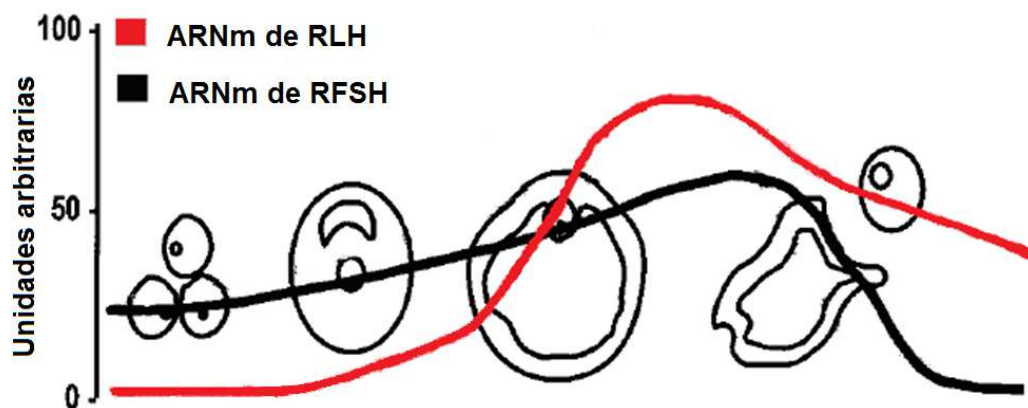


Figura 7: Expresión de los receptores de las hormonas gonadotróficas hipofisarias: FSH y LH durante el ciclo estral. La maduración folicular se indica mediante el desarrollo del folículo primario a folículo preovulatorio. El esquema representa el nivel de expresión del receptor de FSH y de LH en ratas. Escala arbitraria 0-100 U (Modificado de Simoni y col., 1997).

La expresión de RLH y su ARNm en células de la granulosa es inducida por la acción conjunta de los estrógenos y de la FSH (Xu y col., 1995). Estudios previos sugirieron que la regulación del ARNm del RFSH estaba gobernada por los niveles de estrógenos y FSH, sin embargo estudios recientes proporcionan una fuerte evidencia que el

receptor de andrógenos activado por su ligando causa un aumento en la expresión de RFSH en células de la granulosa (Luo y Wiltbank, 2006).

Los RFSH y RLH son miembros de la superfamilia de los receptores acoplados a la proteína G, mostrando una homología en sus dominios de transmembrana e intracelular (Griswold y col., 1995; Kronenberg y col., 2009). Sin embargo, a diferencia de la mayoría de los miembros de esta gran familia presentan un dominio extracelular inusualmente largo responsable de la unión a ligando (Tsai-Morris y col., 1990; Xie y col., 1990; Braun y col., 1991).

En cuanto a la secuencia genómica de los receptores de gonadotrofinas presentan complejas estructuras intron-exon y es de gran longitud, a diferencia de la mayoría de los genes de los receptores acoplados a la proteína G que presentan pequeños intrones (Segaloff y col., 1990; Simoni y col., 1997; Tena-Sempere y col., 1999). En ratones el gen RLH está compuesto por 11 exones y 10 intrones, mientras que el gen RFSH contiene 10 exones y 9 intrones. El dominio extracelular está codificado en su mayoría por los exones 1 al 10 en el RLH y por los exones 1 al 9 en el RFSH, mientras que en ambos genes, el último exón codifica para las regiones de transmembrana e intracelulares, como así también para una pequeña porción del dominio extracelular contigua a la membrana plasmática. Una organización genómica tan compleja favorece el procesamiento de los transcritos primarios mediante mecanismos moleculares alternativos. En efecto, a pesar de la presencia de conformaciones únicas de receptores funcionales en las células diana, se ha demostrado la presencia de múltiples transcritos de ARNm de los receptores de gonadotrofinas en todas las especies, incluyendo los bovinos (Segaloff y col., 1990; Simoni y col., 1997; Tena-Sempere y col., 1999). La acción biológica de los diversos transcritos de ARNm aún no está completamente caracterizada. Sin embargo, estudios recientes señalan la importancia de la expresión simultánea de múltiples isoformas de los receptores con la capacidad de modular la función del holoreceptor (Vu-Hai y col., 1992; Sairam y col., 1996; Simoni y col., 1997; Tena-Sempere y col., 1999). Los mecanismos moleculares que llevan a la generación de diferentes transcritos pueden deberse a distintos lugares de inicio de la transcripción, diferentes sitios de poliadenilación o por procesos de *splincing* alternativo (Simoni y col., 1997). En general, cambios en la expresión de varios transcritos durante la regulación negativa (*down-regulation*) y la regulación positiva (*up-regulation*) de RLH y de RFSH siguen un patrón similar en varios modelos

experimentales. Sin embargo, queda por determinar si los diversos transcritos son regulados de manera diferente durante el desarrollo folicular (Xu y col., 1995).

Las alteraciones del gen de RFSH han sido incluidas en la búsqueda de causas de infertilidad (Whitney y col., 1995; Simoni y col., 2002; Jun y col., 2006). Aittomäki y col. (1995) reportaron una mutación inactivante localizada en el dominio extracelular del RFSH que ocasionó el síndrome de resistencia caracterizado por gónadas no funcionales y amenorrea primaria en humanos. Esto evidencia que una mutación puede inactivar parcialmente el RFSH causando regresión del folículo antral o de estadios posteriores de crecimiento folicular (Perez Mayorga y col., 2000; Gerasimova y col., 2010). Múltiples mutaciones constitutivas que causan enfermedad en humanos se han encontrado en la porción extracelular del RLH (Dufau, 1998).

1.3- Hormonas esteroides y sus receptores

1.3.1- Características generales

Los esteroides sexuales juegan un rol importante en el crecimiento y la diferenciación de los tejidos reproductivos y en el mantenimiento de la fertilidad. El precursor común de todas las hormonas esteroideas es el colesterol, el cual es transformado en las distintas hormonas mediante una serie de pasos enzimáticos altamente regulados (Drummond, 2006). La síntesis de hormonas esteroides se muestra esquemáticamente en la Figura 8.

Además de actuar de manera endocrina sobre estructuras distantes del ovario, los esteroides producidos por células foliculares o por células del cuerpo lúteo también actúan a nivel local dentro de los folículos o del cuerpo lúteo como agentes paracrinós/autocrinós (Berisha y col., 2002).

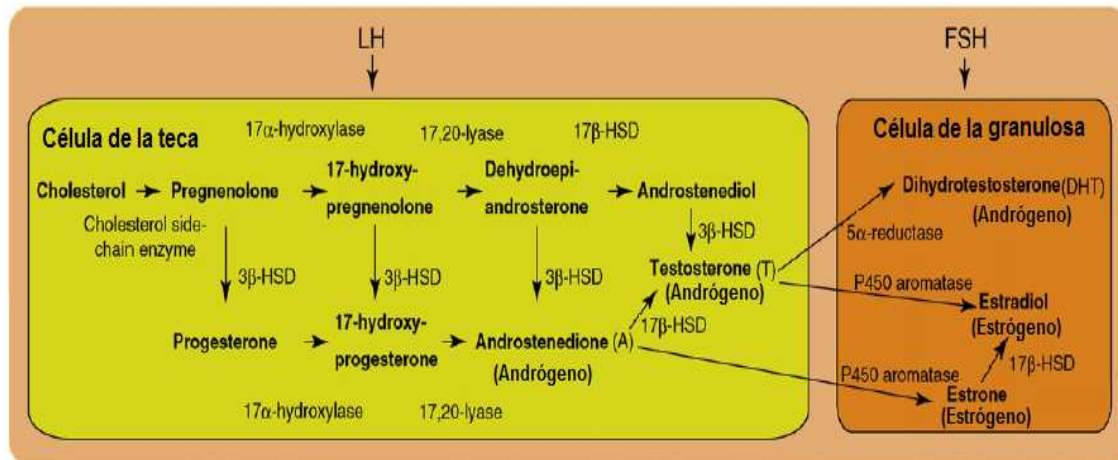


Figura 8: Esquema de la síntesis de hormonas esteroides sexuales. La LH, a través de su receptor en la superficie de las células tecales, estimula la síntesis de andrógenos (androstenediona) en el folículo en crecimiento. Esto requiere la conversión inicial de la enzima que cliva la cadena lateral del colesterol (Cholesterol side-chain enzyme). Dentro de las células tecales, la pregnenolona es convertida a progesterona y luego a androstenediona mediante la actividad de las enzimas 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) y 17α-hidroxilasa (P450_{17α}). Las células de la granulosa carecen de la enzima P450_{17α} requeridas para producir andrógenos, por lo que dependen del pasaje de los andrógenos derivados de la teca a través de la membrana basal. En esta cooperación celular se sustenta el modelo de "dos células, dos gonadotropinas". La FSH actúa sobre las células de la granulosa para estimular la conversión enzimática de androstenediona y testosterona a estrona y 17β-estradiol, mediante la P450 aromatasa (P450arom) y la 17 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD), respectivamente. Con la ovulación, las cantidades relativas y las actividades de las enzimas esteroidogénicas se vuelven a modificar y cambian hacia la síntesis de progesterona (Adaptado de Kimura y col., 2007).

Las hormonas esteroides llevan a cabo sus funciones biológicas a través de su interacción con receptores específicos intracelulares, los cuales son miembros de la superfamilia de factores de transcripción regulados por ligando (Conneely, 2001). Estos receptores presentan una estructura modular y están formados por diferentes regiones que corresponden con dominios funcionales autónomos (Figura 9). Un receptor esteroide típico contiene (Aranda y Pascual, 2001):

- 1. Región A/B:** Situada en el extremo NH₂-terminal, es la región más hipervariable, tanto en tamaño como en secuencia de aminoácidos como consecuencia del empalme alternativo (*del inglés: alternative splicing*) y del uso de promotores diferenciales. En muchos casos, esta región cuenta también con un dominio de transactivación denominado AF-1 cuya acción es independiente de la presencia de ligando.

2. Región C o Dominio de unión al ADN (del inglés: DNA binding domain: DBD):

Es una zona altamente conservada formada por un motivo estructural denominado “dedos de Zinc” que interacciona con secuencias de ADN específicas identificadas como elemento de respuesta a hormonas (del inglés: *Hormone Response Elements: HRE*). En esta misma región se encuentra una zona de dimerización del receptor.

3. Región D: Es una región variable denominada bisagra que se encuentra entre el DBD y el LBD permitiendo a los receptores nucleares adoptar diferentes conformaciones. En muchos casos, mutaciones de varios residuos en el dominio D inhiben la interacción con proteínas correpressoras.

4. Región E o Dominio de unión a ligando (del inglés: ligand-binding domain: LBD): Se encuentra ubicada en la región COOH-terminal. El LBD contiene una región de localización nuclear, regiones de homo y heterodimerización, sitios de unión para las chaperonas y un dominio de transactivación dependiente de ligando denominado AF-2. Las regiones AF-1 y AF-2 pueden activar la transcripción de manera independiente o sinérgica dependiendo del contexto celular y del promotor.

5. Región F: Situada en la región COOH-terminal del dominio LBD en muchos de los receptores nucleares. Esta región no está bien conservada y su función no es clara. Sin embargo, hay indicios de que la región F podría ayudar al reclutamiento de coactivadores a la región E.

En ausencia de hormona, los receptores esteroides se encuentran secuestrados en heterocomplejos que contienen proteínas de choque térmico (del inglés: *Heat Shock Proteins: HSP*) como HSP90, HSP56, HSP70, inmunofilinas y otras chaperonas (Brosens, 2004). Una vez unido a su ligando, los receptores experimentan una serie de eventos, incluyendo cambios conformacionales, disociación del complejo de proteínas de choque térmico, dimerización, fosforilación, y translocación nuclear, lo que permite unirse a HRE en las regiones promotoras de genes diana. La unión del receptor de esteroides a su HRE es seguida por el reclutamiento de proteínas correguladoras y del aparato general de transcripción (Gao y col, 2002). Dependiendo del tipo de célula y del contexto del

promotor, el receptor unido al ADN en el promotor de genes diana modula la tasa de transcripción de los respectivos genes, lo que da como resultado la elaboración de la respuesta fisiológica de la célula blanco (Gao y col., 2002; Brosens, 2004). En ausencia de ligando, los receptores se ubican en el núcleo y/o citoplasma y la cantidad presente en el citoplasma depende del tipo de receptor (DeFranco, 2002).

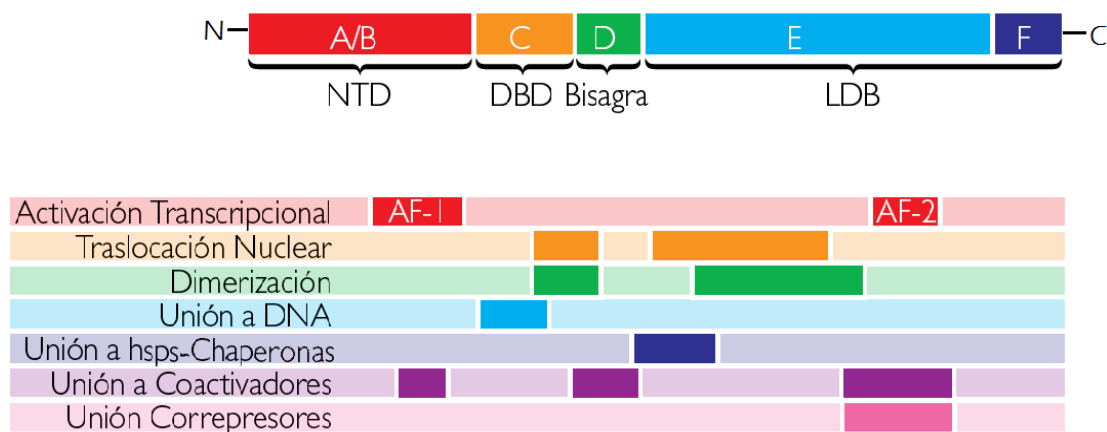


Figura 9: Dominios funcionales de un receptor nuclear de hormonas esteroides. Se destacan los dominios que componen las proteínas (Modificado de Noriega Reyes y Langley McCarron, 2008).

1.3.2- Progesterona

La progesterona, mediante sus receptores, juega un rol crucial en la ovulación, implantación y mantenimiento de la preñez (Graham y Clark, 1997; Ogle y col., 1998). Los receptores de progesterona (RP) comprenden al menos tres isoformas que se originan del mismo gen (Figura 10). La isoforma RP-A es una forma truncada de RP-B originada de un sitio de comienzo de transcripción diferente, a la cual le faltan 164 aminoácidos de la región de transactivación NH₂-terminal de RP-B (Kastner y col., 1990). En general, RP-B es un potente transactivador y RP-A es un inhibidor dominante de RP-B y de otros receptores nucleares (Tung y col., 1993; Vegeto y col., 1993). Por otro lado la isoforma RP-C es otro producto NH₂-terminal truncado, pero es mucho más pequeño que RP-A (Wei y Miner, 1994). En particular esta isoforma, presenta un sitio de unión a la hormona pero solo posee el segundo dedo de zinc del dominio de unión al ADN, y por lo tanto no

interactúa directamente con el ADN. De este modo RP-C puede actuar como un supresor selectivo de la acción de la progesterona mediante la unión de la hormona en la fracción citosólica reduciendo la unión de esta a los receptores activos (Wei y Miner, 1994).

La expresión de las distintas isoformas está conservada en roedores y humanos, y se superpone espacial y temporalmente en los órganos reproductivos de la hembra (Conneely, 2001; Gava y col., 2004). Sin embargo, la relación de las isoformas individuales varía en estos órganos como consecuencia del desarrollo, de los niveles hormonales y durante la carcinogénesis (Conneely y col., 2002; Jo y col., 2002; Van den Broeck y col., 2002a). La expresión de los RP es inducida por los estrógenos en la mayoría de los tejidos blanco y declinan en respuesta a la progesterona. En los folículos preovulatorios maduros, la LH induce la expresión de RP en las células de la granulosa. La importancia de los RP en la fertilidad de la hembra esta subrayada por la infertilidad en los ratones *Knock Out* (KO) para RP (Lydon y col., 1995). Si bien los ratones muestran histológicamente ovarios normales, estos fallan en ovular aún luego de una estimulación exógena, como lo indica la presencia de folículos preovulatorios intactos en el ovario y la ausencia de ovocitos en el oviducto y cuernos uterinos (Lydon y col., 1995; Gava y col., 2004).

1.3.3- Andrógenos

Los andrógenos también juegan un rol esencial en el desarrollo y función normal de los tejidos reproductivos femeninos (Gao y col., 2002). Los andrógenos ováricos, incluyendo testosterona (T), dihidrotestosterona (DHT) y A₄ son producidos por células de la teca y ejercen su acción a través de su interacción con los receptores de andrógenos (RA) localizados en células de la granulosa, células estromales y ovocitos (Orisaka y col., 2009). Hasta el momento se han descrito dos isoformas: RA-A, de 87 kDa, y RA-B, de 110 kDa (Figura 10), que son sintetizadas a partir del mismo gen. Estos subtipos de receptores resultan de sitios alternativos en el inicio de la traducción a partir de un mismo ARNm (Conneely, 2001) o a partir de la transcripción alternativa desde dos promotores distintos (Wilson y McPhaul, 1994; Takeo y Yamashita, 1999; Brinkmann, 2001). La diferencia entre ambas isoformas es que el RA-A es una forma truncada del RA-B, es decir, la proteína RA-B contiene una secuencia adicional de aminoácidos en la región

NH₂-terminal (Gao y col, 2002). Estudios realizados en ratones KO para el gen RA mostraron individuos con ciclos estrales normales pero más largos y que presentaban reducida fertilidad (Zhou, 2010). Estos mismos ratones exhibieron ovarios con una marcada reducción en el número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios, indicando que la foliculogénesis normal requiere de la acción de andrógenos a través de su unión con los RA (Hu y col., 2004; Walters y col., 2008).

La expresión de RA es mayor en células de la granulosa de folículos pequeños, preantrales y antrales tempranos, planteando la posibilidad que los andrógenos son importantes reguladores paracrinos del crecimiento folicular durante la transición de folículos preantrales a folículos antrales tempranos. A pesar que los andrógenos han sido implicados como inhibidores del desarrollo folicular antral (Orisaka y col., 2009), se ha comprobado que los andrógenos aumentan la expresión de los RFSH y potencian los efectos estimulantes de FSH sobre el crecimiento folicular, la proliferación de las células de la granulosa y la actividad de la enzima CyP19. El aumento de los niveles de andrógenos, así como una mayor relación andrógenos:estrógenos en el líquido folicular en los folículos antrales atrésicos en relación a folículos antrales sanos, puede reflejar una disminución de la capacidad de aromatización cuando las células de la granulosa degeneran. Westergaard y col. (1986) han reportado que altos niveles de andrógenos en el líquido folicular humano no es por si solo un marcador de atresia folicular, sino que refleja el estado de desarrollo folicular. Además, estos autores demostraron que en folículos antrales tardíos (>6mm de diámetro), el medio hormonal intrafolicular fue predominantemente androgénico cuando los folículos estaban atrésicos. Contrariamente, en los folículos sanos predominan los estrógenos, mientras que en folículos antrales tempranos (sanos y atrésicos) prevalecieron siempre altos niveles de andrógenos. Por otro lado, estudios *in vitro* con células de la granulosa evidenciaron que el modo de modulación androgénica sobre la acción de FSH cambió de estimular a inhibir en estados avanzados de desarrollo folicular. Por lo tanto, los efectos de los andrógenos sobre el desarrollo de los folículos antrales es muy compleja y depende del momento del desarrollo, a diferencia de los claros efectos estimulatorios sobre los folículos preantrales (Yang y Fortune, 2006).

Por otro lado, la expresión de RA es influenciada por factores secretados por el ovocito en estados avanzados de desarrollo folicular, mostrando variaciones incluso dentro de las diferentes zonas de la capa de células de la granulosa habiéndose encontrado una

disminución en la inmunomarcación de RA en las células de la granulosa contiguas al anro folicular, mientras que en las del cúmulo ovígero se observó una intensa marcación. Esto implica que dentro del ovario la expresión de RA puede jugar un importante rol en los mecanismos de control local durante el desarrollo folicular (Wilson y McPhaul, 1994).

Resumiendo, los cambios espaciales y temporales del patrón de expresión de RA, el estado del desarrollo folicular y posiblemente la concentración de andrógenos durante el crecimiento folicular juegan roles importante en la regulación de los mecanismos intra y extraováricos determinando en última instancia el destino folicular (Walters y col., 2008).

1.3.4- Estrógenos

Los estrógenos son hormonas esteroides que regulan el desarrollo, diferenciación y función en una gran variedad de tejidos. El tipo de estrógeno presente varía de acuerdo a las especies siendo generalmente el 17β -estradiol el dominante. Sus efectos biológicos están mediados por los receptores de estrógenos (RE) α y β (Nilsson y Skinner, 2001; Björnström y Sjöberg, 2005). Ambos subtipos del RE (Figura 10) se unen al 17β -estradiol con alta afinidad y especificidad. Si bien el RE β comparte muchas características funcionales con el RE α , los mecanismos moleculares que regulan su actividad transcripcional y la localización tisular son distintos para ambos (Kuiper y col., 1996; Wang y col., 2000a). Es sabido que RE α juega un papel crucial en los procesos fisiológicos del aparato genital de la hembra. Se ha demostrado que el patrón de expresión de ambos subtipos en los distintos compartimientos uterinos son similares, sin embargo los niveles tanto del ARNm como de la proteína del RE β son mucho menores que los del RE α (Saunders y col., 1997; Matsuzaki y col., 1999; Wang y col., 1999, 2000a).

En los mamíferos, la expresión del subtipo RE α en particular en el ovario es casi exclusivo de las células de la teca interna, glándulas intersticiales, epitelio germinal y células del estroma; habiendo diferencias importantes entre los autores con respecto a su expresión en las células de la granulosa, en las diferentes especies e inclusive dentro de la misma especie (Wang y col., 1999, 2000a; Pelletier y col., 2000; Rosenfeld y col., 2001; Van Den Broeck y col., 2002b).

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

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

En respuesta al advenimiento del pico preovulatorio de LH se ha observado que la expresión del RE α aumenta y la del RE β disminuye (Fitzpatrick y col., 1999; Sharma y col., 1999). Fitzpatrick y col. (1999) también documentaron que la expresión de RE β disminuyó marcadamente luego de la administración de gonadotrofina coriónica humana (hCG).

Los patrones temporales de expresión para ambos receptores durante el ciclo estral con relación a los niveles de estrógenos y progesterona sugieren que los esteroides ováricos tienen un rol regulador dominante sobre su expresión con respecto a las gonadotrofinas hipofisarias (Roy y Kole, 1995). Al menos parte de la expresión del RE inducida por FSH podría estar mediada por los estrógenos; sin embargo, la progesterona influiría negativamente sobre la expresión de estos receptores. El efecto inhibitorio de la progesterona sobre la expresión del RE puede verse por los bajos niveles de ambos receptores en el momento en que la progesterona incrementa significativamente sus niveles (Roy y Kole, 1995). A la luz de los efectos inhibitorios de la progesterona sobre la expresión proteica y del ARNm del RE, las diferencias entre la expresión del RE β y del RE α pueden explicarse por una mayor sensibilidad del gen que codifica para el RE α a la presencia de progesterona debido a que el gen RE α no comienza a expresarse en tanto los niveles de esta hormona no bajan hasta niveles basales (Roy y Kole, 1995). Por el contrario, el gen RE α puede ser menos sensible a los efectos estimulantes de los estrógenos, ya que no se inicia la transcripción hasta que los niveles de esta hormona son

elevados. Por otro lado, el gen que codifica para el RE β es más sensible a los efectos de los estrógenos ya que los efectos de la progesterona son revertidos ni bien comienzan a aumentar los niveles de estrógenos.

Si bien ambos receptores tienen aparentemente la misma afinidad por los estrógenos, considerando los patrones de expresión espacio-temporales diferentes de los dos subtipos en las células foliculares y no foliculares, es probable que haya una regulación diferencial de los estrógenos sobre la función celular (Enmark y col., 1997; D'Haeseleer y col., 2006).

Además, RE α y RE β pueden formar heterodímeros en las células blanco. La transcripción génica mediada por RE envuelve la unión del homodímero receptor-ligando con el HRE, sin embargo, los RE también median la transcripción a través del elemento mejorador de respuesta AP1 que depende de la unión con un ligando, así como también de factores de transactivación de AP1, tales como Fos y Jun (Gaub y col., 1990; Umayahara y col., 1994). Paech y col. (1997) han demostrado que si bien la unión del complejo estrógenos-RE α tanto al sitio HRE como al sitio AP1 estimula la transcripción, la unión del complejo estrógenos-RE β solo estimula la transcripción al unirse al sitio HRE mientras que la unión del complejo estrógenos-RE β al sitio AP1 inhibe la transcripción.

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

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

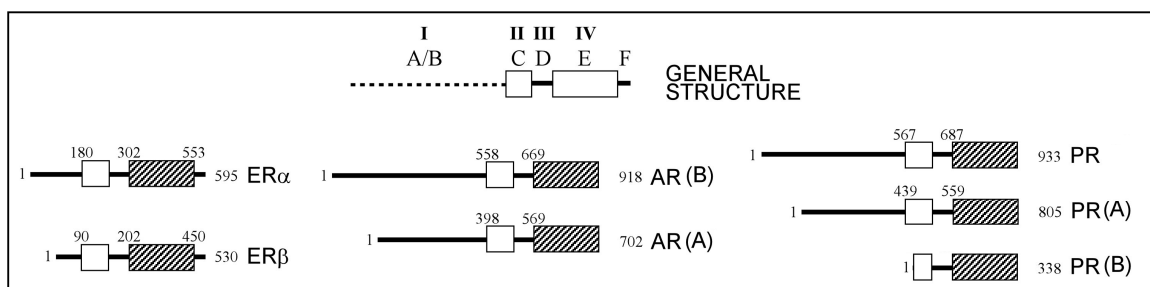


Figura 10: Estructura de los receptores de hormonas esteroides. Modificado de Oursler y col, 1996.

1.4- Proteínas Correguladoras

Los receptores de hormonas esteroideas llevan a cabo sus múltiples funciones transcripcionales mediante el reclutamiento de una serie de proteínas reguladoras positivas y negativas, conocidas como coactivadoras o correpresoras, respectivamente (Figura 11). En este sentido, se define coactivadores como moléculas que interactúan con los receptores nucleares en una manera dependiente de ligando (Gao y col., 2002) y activan la transcripción génica. Análogamente, los correpresores de receptores nucleares se denominan a aquellos factores que interactúan con los receptores nucleares regulando negativamente la tasa de transcripción en sus genes diana (McKenna y col., 1999). Estos cofactores reguladores no son exclusivos de los receptores nucleares, sino que son utilizados, de una manera similar, por muchos otros factores de transcripción de unión al ADN (Perissi y Rosenfeld, 2005; Wu y col., 2005).

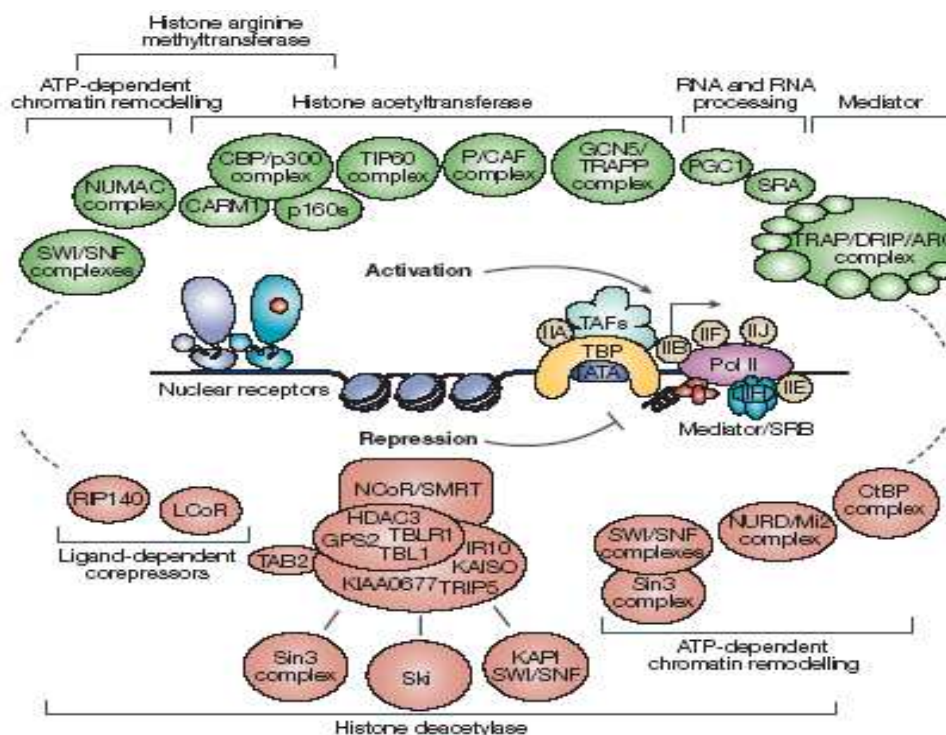


Figura 11: Complejos de coactivadores y correpresores requeridos para la regulación transcripcional mediada por los receptores nucleares. La regulación de la maquinaria general de transcripción requiere de un gran número de proteínas correguladoras que presentan varias funciones y actividades enzimáticas. En verde, complejo coactivador. En rojo, complejo correpresor. Este tipo de esquema es útil para destacar los numerosos complejos que participan en la regulación mediada por los receptores nucleares (Perissi y Rosenfeld, 2005).

1.4.1- Proteínas coactivadoras

Los coactivadores, por definición, no interactúan directamente con el ADN pero lo hacen de manera indirecta a través de su asociación con factores de transcripción. Los coactivadores usualmente se presentan en complejos multiprotéicos que al interactuar con los factores de transcripción modifican la cromatina para facilitar la transcripción, a través de mecanismos de remodelación de cromatina, acetilación y metilación de histonas. Tanto la acetilación como la metilación de histonas producen descondensación de la cromatina permitiendo la accesibilidad de factores a los promotores y la activación de la transcripción (Aranda y Pascual, 2001; Noma y col., 2001; Qi y col., 2002; Perissi y Rosenfeld, 2005). Los receptores nucleares también reclutan factores remodeladores de cromatina dependientes de ATP. Estos complejos utilizan la energía que se produce en la hidrólisis de ATP para producir un cambio conformacional en la cromatina lo que facilita la interacción de factores a sitios de unión en la cadena del ADN que no estaban expuestos en un ambiente heterocromático (represivo de transcripción) promoviendo así el inicio de la transcripción (Aranda y Pascual, 2001). Adicionalmente, los coactivadores facilitan el reclutamiento de la maquinaria general de la transcripción y están involucrados en la activación de RNA polimerasa II (Pol II).

En años recientes se ha encontrado cada vez más proteínas que modulan positivamente la actividad de factores transcripcionales mediante otros mecanismos que incluyen la estabilización de los complejos sobre el ADN y la estabilización del ARNm, así como regulación del recambio de complejos proteicos sobre los promotores (Noriega Reyes y Langley McCarron, 2008).

1.4.1.1- Familia SRC/p160 (del inglés: Steroid Receptor Coactivator)

Esta familia está compuesta por tres miembros estructural y funcionalmente relacionados que se denominan SRC-1 (NcoA-1), SRC-2 (GRIP1/NcoA-2/TIF2) y SRC-3 (p/CIP/ACTR/AIB1/RAC3/TRAM-1) (McKenna y col., 1999). El SRC-1 fue el primer coactivador de la superfamilia de receptores de esteroides que fue clonado y caracterizado (Onate y col., 1995; Xu y Li, 2003). SRC-1 es un mediador de la transcripción común para

los receptores nucleares, que funciona a través de su actividad acetiltransferasa de histonas y sus múltiples interacciones con los receptores unidos al ligando. Este coactivador presenta una amplia gama de especificidad en la regulación de la activación de los receptores nucleares hormono-dependiente, incluyendo la de los RP, RE, RA, receptores de Glucocorticoides (RG) y receptores de hormonas tiroideas (RT). La eliminación selectiva del gen SRC-1 en ratones mostró que este es necesario para la acción eficiente de las hormonas esteroides, para la acción de los estrógenos y la progesterona en el útero y la glándula mamaria, y para la acción de andrógenos en la próstata y los testículos (Xu y col., 1998). La sobreexpresión de SRC-1 y SRC-2 confiere al RA una sensibilidad incrementada a los efectos estimulantes del crecimiento de los andrógenos, incluso en bajos niveles, lo que contribuiría a la recurrencia en el cáncer de próstata luego de la terapia de privación de andrógenos. El SRC-3 es el más disímil entre los integrantes de esta familia ya que no solo activa a los receptores nucleares sino también a otros factores de transcripción no relacionados entre los cuales se encuentran las vías del AMPc y de las citoquinas. Comparado con el amplio rango de expresión que presentan los SRC-1 y SRC-2, el SRC-3 está restringido en su expresión a pocos tejidos entre los que se encuentran útero, ovario, glándula mamaria y testículo (Suen y col., 1998, Hussein-Fikret y Fuller, 2005). En ratones KO para el gen SRC-3 se producen severos defectos en el desarrollo y fallas reproductivas (Xu y col., 2000). Este mismo corregulador ha sido relacionado con el desarrollo de cáncer en tejidos hormono-dependientes tales como ovario y glándula mamaria. Los transcriptos de los tres integrantes de esta familia fueron detectados en ovario y útero de especies domésticas incluyendo el bovino (Hlaing y col., 2001).

1.4.2- Proteínas correpresoras

Los correpresores forman parte de complejos multiprotéicos y reclutan desacetilasas de histonas (HDAC) lo que causa la compactación de la cromatina evitando el acceso a factores de transcripción críticos sobre la región promotora de la cadena del ADN, y así se ve reprimida la transcripción. Además, pueden translocarse del citoplasma al núcleo y viceversa, lo que hace suponer que pueden controlar una amplia gama de

procesos en el desarrollo fisiológico y metabólico (Noriega Reyes y Langley McCarron, 2008).

En general, los receptores nucleares en ausencia de ligando interactúan preferentemente con proteínas correpressoras reprimiendo la transcripción. Sin embargo, algunas excepciones se han identificado, donde correpresores como LCoR (*del inglés: ligand-dependent nuclear-receptor corepressor*), RIP140 (*del inglés: receptor-interacting protein-140*) y REA (*del inglés: repressor of estrogen receptor activity*) se unen a los receptores nucleares en una manera ligando dependiente compitiendo y desplazando a los coactivadores (Perissi y Rosenfeld, 2005; Gurevich y col., 2007). Estos hallazgos indican la existencia de mecanismos de regulación específicos que usan procesos similares, pero a la inversa, para atenuar la función de los receptores unidos a ligando. Además, se han descubierto factores correguladores, tales como el complejo de proteínas SWI/SNF (*del inglés: SWItch/Sucrose Non Fermentable*) que regulan tanto la activación como la represión génica (Perissi y Rosenfeld, 2005).

Existen otros represores que inhiben la actividad transcripcional de los receptores nucleares mediante diferentes mecanismos. Estos incluyen interrumpir la unión al ADN o la translocación al núcleo del receptor, inhibir las interacciones entre los receptores y sus coactivadores o interrumpir el reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción (Noriega Reyes y Langley McCarron, 2008).

1.4.2.1- REA

La proteína REA es un correpresor que interacciona específicamente con los RE suprimiendo selectivamente su actividad transcripcional, pero sin modificar la de los otros receptores nucleares (Montano y col., 1999; Delage-Mourroux y col., 2000). Este correpresor reprime la actividad de los RE por el reclutamiento de HDAC evitando de esta manera el acceso a factores críticos sobre la región promotora de genes diana (Noriega Reyes y Langley McCarron, 2008). Además, REA compite por los mismos sitios de unión al RE con el SRC-1 actuando de este modo de manera anti-coactivador y correpresor (Montano y col., 1999; Delage-Mourroux y col., 2000). Estudios realizados en ratones KO para el gen REA mostraron individuos no viables, sugiriendo un rol crucial de REA en

etapas tempranas del desarrollo. El uso de KO condicionados a ciertos órganos (gen ausente solo en los órganos específicos para su estudio) mostraron que este correpresor también tiene una acción importante en la regulación del RE α en los órganos reproductivos de la hembra (Park y col., 2005).

1.4.2.2- SMRT

La proteína SMRT (*del inglés: Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors*) originalmente ha sido identificada por su habilidad de asociarse y reprimir la actividad transcripcional de los receptores nucleares, demostrándose posteriormente su habilidad de interactuar con diferentes clases de factores de transcripción. Esta proteína se encuentra relacionada con HDAC en grandes complejos proteicos causando compactación de la cromatina y la represión de la transcripción (Jepsen y Rosenfeld, 2002). Este correpresor interactúa con los receptores aún en ausencia de agonistas (en el caso de RT y Receptores de ácido retinoico) o en presencia de antagonistas (en el caso de los receptores esteroides) (Li y Shang, 2007). La naturaleza de interacción con los receptores esteroides es desconocida, ya que se ha demostrado que al unirse a un ligando antagonista (por ejemplo, tamoxifeno) adopta una conformación tridimensional única. El ligando antagonista puede actuar como parcialmente agonista/antagonista o como antagonista, cuya actividad predominante es determinada por los factores específicos de la célula y del promotor (Edwards, 2000). En determinadas circunstancias donde el antagonista exhibe una actividad parcial agonista/antagonista, la sobreexpresión de SMRT inhibe la actividad parcial agonista. Por lo tanto, la alteración en la expresión de este correpresor cambia el balance de los correpresores a coactivadores que están unidos a los complejos de transcripción a través de los receptores esteroides ocupados por antagonistas. Esto podría determinar si el desenlace es inhibitorio o estimulador y de este modo determinar la ocurrencia o no de resistencia a algunos antagonistas tales como el tamoxifeno (Edwards, 2000; Gao y col., 2002). La expresión de SMRT se detectó tanto en ovarios normales como en tumores ováricos de diferentes clases (Hussein-Fikret y Fuller, 2005).

1.4.2.3- LCoR

La proteína LCoR es probablemente uno de los correpresores más conocidos que interactúan con los receptores nucleares unidos a ligando para mediar su represión de la transcripción (Gurevich y col., 2007). LCoR fue inicialmente caracterizada como un correpresor de RE α y posteriormente se demostró que interactúa con una amplia variedad de receptores nucleares (Fernández y col., 2003; Gurevich y col., 2007). Los datos de western blot sobre tejido humano revelaron la expresión de LCoR en una amplia variedad de órganos adultos y fetales (Gurevich y col., 2007).

1.5- Enfermedad Quística Bovina

1.5.1- Definición

La enfermedad quística ovárica (*del inglés: Cystic Ovarian Disease: COD*) bovina se caracteriza por la presencia de estructuras foliculares de un diámetro mayor al ovulatorio, que permanecen en el tiempo ocasionando trastornos en la funcionalidad ovárica. Los quistes son estructuras dinámicas, descritos como folículos anovulatorios únicos o múltiples, localizados en uno o ambos ovarios, que tienen un diámetro mayor a 18 mm (mayor al diámetro ovulatorio para la raza), con una persistencia de más de 6 días, en ausencia de tejido luteal, sin tonicidad uterina y con interrupción de los ciclos estrales normales (Silvia y col., 2002; Bartolomé y col., 2005; Vanholder y col., 2006). Sin embargo, esta definición clásica debe ser complementada con el concepto de que los quistes pueden regresar y ser reemplazados por otros; pueden atresarse o luteinizarse e inclusive puede producirse la ovulación en presencia de estas estructuras (Hamilton y col., 1995; Rutter y Russo, 2000; Pérez y col., 2002; Silvia y col., 2002; Bartolomé y col., 2005). La presencia de más de una estructura quística no es rara, en un estudio realizado por Silvia y col. (2002) el 47% de las vacas con quistes ováricos tuvieron dos o más quistes en el momento de la detección, por lo que ellos consideraron que la condición poliquística es más frecuente en las vacas con quistes incluso que la aparición de ovulaciones múltiples en vacas normales.

1.5.2- Incidencia y prevalencia

La incidencia de COD en vacas lecheras varía entre el 5% y el 10%, habiéndose hallado proporciones aún mayores (30%) dependiendo del país, el establecimiento y el manejo de los animales (Casida y Chapman, 1951; Kesler y Garverick, 1982; Laporte y col., 1994; Fleischer y col., 2001). Así mismo, la incidencia también varía de acuerdo a la cantidad de partos. En estudios hechos por Hackett y Batra (1985; $n = 1830$) y Fleischer y col. (2001; $n = 2197$), la incidencia de COD en el periodo lactacional fue de 5,7% y 7,4% respectivamente en vaquillonas, y 18% y 13,7% en vacas multíparas (Hooijer, 2003). Por otro lado, en Suecia se ha visto que la incidencia se redujo de 11% en 1954 al 3% en 1977, como resultado de la selección genética (Kesler y Garverick, 1982).

1.5.3- Factores predisponentes en la formación de quistes ováricos

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

1.5.3.1- Factores Generales

Dentro de este grupo se encuentran factores tales como la herencia, la producción de leche, la edad, momento reproductivo, condición corporal y la estación del año. Existen evidencias del rol de la herencia en la formación de quistes ováricos. Se sabe que la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en algunas líneas de sangre de ganado, aunque su heredabilidad es baja.

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

expresión evidente de la disfunción endocrina característica de esta etapa delicada de la vida reproductiva en la vaca.

La condición corporal de los animales es un factor predisponente importante: las vacas con una condición corporal mayor a 4 (escala de 0 a 5) tienen una frecuencia de 2,5 veces superior de presentación de quistes con respecto a las que poseen una condición corporal menor o igual a 3 (Maizon y col., 2004).

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

1.5.3.2- Factores Específicos

Alimentación: Las raciones ricas en proteínas utilizadas para elevar la producción de leche, asociadas a la falta de ejercicio, podrían ser factores importantes en el desarrollo de la enfermedad. Esta enfermedad es muy común en hembras de alta producción y durante la lactancia temprana. En ese momento, la mayor parte de la energía del animal es destinada hacia la producción de leche y requerimientos de mantenimiento, provocando una mayor vulnerabilidad de la vaca a disturbios endocrinos. Con respecto a los desbalances metabólicos, se ha sugerido que la resistencia insulínica y la hiperinsulinemia no son factores relacionados a COD en vacas, teniendo en cuenta que sí están altamente relacionados con el Síndrome Poliquístico Ovárico (PCOS) que se presenta en la mujer (Opsomer y col., 1999). Por otro lado, el rol de los fitoestrógenos aún no ha sido establecido, sin embargo, muchos investigadores han sugerido que el forraje con alto contenido de componentes estrogénicos podría estar asociado con la presentación de la enfermedad (Roberts, 1986).

Infecciones uterinas: Durante el período posparto, las hembras bovinas lecheras son susceptibles a una alta variedad de procesos patológicos, incluyendo retención de placenta, endometritis, metritis, hipocalcemia, y anestro posparto. Todas estas condiciones han sido correlacionadas positivamente con la COD (Kesler y col., 1980; Garverick, 1997).

Es a partir de los trabajos de Bosu y Peter (1987) que se demuestra en forma evidente que las infecciones uterinas posparto causadas por bacterias Gram (-), capaces de sintetizar y liberar endotoxinas, estimulan la liberación de cortisol adrenal suprimiendo de este modo el pico preovulatorio de LH y consecuentemente conducen a la formación de quistes ováricos foliculares. El mecanismo a través del cual ocurre esta modulación es desconocido, sin embargo las endotoxinas y sus mediadores, tales como las interleuquinas, son las responsables de la mayoría de los efectos patógenos. Las interleuquinas inducen la liberación de hormona liberadora de corticotrofina (CRH) del hipotálamo y consecuentemente de la adrenocorticotrofina (ACTH) de la hipófisis, lo que lleva a una mayor producción adrenal de corticoesteroides los que a su vez suprimen la expresión de receptores de LH en células de la granulosa. De esta manera, se produce una alteración de las interacciones hormonales que controlan el funcionamiento normal del ovario (Nakao y Grünert, 1990).

Estrés: Cualquier factor considerado provocador de estrés estimula al eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, el cual a su vez modula al eje hipotálamo-hipofisario-gonadal modificando la secreción de gonadotrofinas. El pico preovulatorio de LH es especialmente sensible al efecto inhibitorio de la ACTH y glucocorticoides exógenos en la vaca (Stoebel y Moberg, 1982; Moberg, 1991; Ribadu y col., 2000). Experimentalmente, la inhibición del pico preovulatorio de LH mediante el tratamiento con ACTH resultó en el desarrollo de quistes ováricos en bovinos (Refsal y col., 1987; Dobson y col., 2000) y ovinos (Cooke y Benhaj, 1989). Los glucocorticoides son factores claves que afectan al eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, y otras hormonas como la ACTH y la CRH juegan un papel secundario (Moberg, 1991). Además de la CRH y los derivados de la proopiomelanocortina (POMC), como la β -endorfina, tienen receptores (MCRs) presentes en la glándula adrenal y las gónadas, y podrían actuar como señales autocrinas y paracrinas en la regulación de la secreción de gonadotrofinas. Recientemente, se han demostrado la expresión de los 5 tipos de MCRs en células de la teca en los folículos antrales de diferentes diámetro y solamente la isoforma MC3R se expresó en células de la granulosa (Amweg y col., 2011). Se cree que los péptidos opioides endógenos (producidos por la hipófisis y el cerebro) bloquean la onda preovulatoria de LH inducida por los estrógenos y la liberación de GnRH (Malven, 1986).

La inhibición de la secreción de la LH hipofisaria, consecuencia de la acción fisiológica de los glucocorticoides, podría ser causada por la modificación en la retroalimentación de los esteroides gonadales, dado que los corticoides reducen el efecto estimulante de los estrógenos sobre la secreción de LH (Echternkamp, 1984; Moberg, 1991; Lucy, 2003)

1.5.4- Patogenia

Disfunciones ováricas, tales como los quistes foliculares se presentan con mayor frecuencia durante el período posparto cuando se produce la transición de la condición acíclica de la gestación hacia el reinicio de la actividad cíclica regular. Es generalmente aceptado que los quistes foliculares se desarrollan debido a una disfunción del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Esta disfunción tiene una etiología multifactorial, en la que los factores genéticos, fenotípicos y ambientales están implicados (Kesler y Garverick, 1982; Garverick, 1997; Peter, 2004). Cuando se habla de la patogenia de la COD, se puede distinguir entre un defecto en el eje hipotálamo-hipofisario y un defecto directo a nivel ovárico.

1.5.4.1- Disfunción Hipotálamo-Hipofisaria

La hipótesis más aceptada en la actualidad involucra un desequilibrio neuroendocrino a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Liptrap y McNally, 1976; Kesler y Garverick, 1982; Eyestone y Ax, 1984; Bosu y Peter, 1987; Lopez-Diaz y Bosu, 1992; Woolums y Peter, 1994; Hamilton y col., 1995; Garverick, 1997; Peter, 1997; Zulu y Penny, 1998; Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000; Peter, 2004; Monniaux y col., 2008). Según esta hipótesis, la causa principal es una deficiencia en la onda preovulatoria de LH o un patrón de liberación aberrante de esta hormona (Peter, 2004). Recientemente, se ha sugerido que la reducción de pulsos de LH también puede estar implicada en la anovulación (Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000).

Los folículos preovulatorios secretan estrógenos que causan una retroalimentación positiva sobre el eje hipotálamo-hipofisario para liberar LH responsable de la ovulación.

Una alteración en este proceso puede resultar en una falla o en una liberación inadecuada de GnRH desde el hipotálamo. La respuesta hipofisaria a este evento es una falta de liberación de LH, insuficiente en magnitud o producida en el momento inapropiado durante la maduración del folículo preovulatorio (Peter, 2004; Vanholder y col., 2006). Además, existe una falla en la respuesta hipofisaria o refractariedad del efecto de retroalimentación positiva de los estrógenos sobre la liberación de gonadotrofinas. Se cree que la magnitud y el momento de la liberación del pico preovulatorio de LH dependen del restablecimiento del efecto de retroalimentación positiva mediada por estrógenos en el hipotálamo (Kesler y Garverick, 1982; Woolums y Peter, 1994; Peter, 2004, Gümen y Wiltbank, 2005). Así, el mecanismo de retroalimentación positiva del estradiol en el pico de LH puede no estar funcionando correctamente en las vacas con quistes foliculares (Peter, 2004). Silvia y col. (2005) han reportado que folículos destinados a formar quistes secretan altas concentraciones de estradiol y el pico preovulatorio de LH esta ausente. Las vacas con COD y con niveles elevados de estrógenos endógenos fallan en generar un pico de LH en respuesta a una dosis de estradiol exógeno, indicando que se ha perdido la capacidad de responder a la retroalimentación positiva del estradiol sobre el eje hipotálamo-hipofisario (Zaied y col., 1981; De Silva y Reeves, 1988; Refsal y col., 1988). En un estudio realizado por Hamilton y col. (1995) se detectó una concentración promedio mayor tanto de LH como de 17β -estradiol circulantes en las vacas con quistes, si se las comparaba con vacas con ciclos normales, sin registrarse el pico preovulatorio de LH en las vacas afectadas.

Con respecto al hipotálamo, se demuestra que la cantidad de GnRH presente en la eminencia media es mayor en vacas que presentan COD y podría estar relacionada con defectos en la liberación de gonadotrofinas, mientras que la concentración en la región preóptica anterior es inferior, alterando el patrón de liberación preovulatoria de LH (Cook y col., 1991; Garverick, 1997; Sciorsci y col., 2000). La disminución de GnRH se asocia también a hipofunción adrenal, infecciones uterinas y otras enfermedades posparto (Pérez y col., 2002)

Por otro lado, niveles elevados de estrógenos probablemente podrían inhibir la secreción de FSH resultando en una falla en la ovulación luego de que uno o varios folículos de una onda de crecimiento folicular se desarrollan y superan el tamaño ovulatorio. Luego de tres a cinco días la hembra aparentemente se adapta a la

concentración elevada de estrógenos y la concentración de FSH aumenta, estimulando el crecimiento de otros folículos, algunos de los cuales llegarían a alcanzar e incluso superar el tamaño ovulatorio. Esto puede ocurrir en condiciones de COD cuando un único quiste está presente y una nueva onda folicular comienza y un folículo dominante (o múltiples folículos dominantes) se desarrollan (Cook y col., 1991).

Respecto a la progesterona, se ha observado que niveles suprabasales pueden desencadenar un exagerado crecimiento folicular, alterando la viabilidad ovocitaria y favoreciendo la presentación de quistes, posiblemente como consecuencia de fallas en la luteólisis (Pérez y col., 2002). Hather y col. (2003) han observado que al momento del diagnóstico muchos quistes fueron acompañados por concentraciones suprabasales de progesterona. En un estudio realizado en vacas se observó que la frecuencia de los pulsos de LH fueron menores en animales con folículos ováricos quísticos mientras que la amplitud de los pulsos de LH no fue afectada. Se cree que la concentración elevada de progesterona presente en las vacas afectadas fueron suficientes para mantener la retroalimentación negativa sobre el hipotálamo resultando en frecuencias de los pulsos de LH disminuida e inhibiendo el pico preovulatorio de LH (Savio y col., 1993; Duchens y col., 1994; Noble y col., 2000; Hatler y col., 2003). Esto se sustenta en las observaciones realizadas en vacas donde la administración de progesterona exógena durante la fase folicular suprime la frecuencia del pulso de LH y el pico de LH (Duchens y col., 1994; Hatler y col., 2003). Silvia y col. (2002) sugieren que la insensibilidad del hipotálamo al estradiol es debido a las concentraciones intermedias de la progesterona. Esto ha llevado a la hipótesis de que las concentraciones suprabasales de progesterona pueden actuar como un disparador para la formación de quistes foliculares (Silvia y col., 2002; Robinson y col., 2005; 2006).

1.5.4.2- Disfunción ovárica

Aunque muchos estudios han caracterizado la dinámica del crecimiento folicular, la comprensión de los cambios celulares y moleculares que ocurren dentro del folículo ovárico antes del proceso de anovulación es todavía escasa. Una disfunción a nivel del folículo puede alterar el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y causar la formación de

folículos ováricos quísticos. En primer lugar, las alteraciones en la expresión de RLH pueden causar anovulación. De acuerdo con Kawate (2004), el número de RFSH y de RLH en las células de la granulosa de los quistes es menor en comparación a los folículos normales, pero esto se contradice con los datos de Odore y col. (1999) y Calder y col. (2001) quienes encontraron concentraciones similares de los receptores o niveles más altos en la expresión del ARNm de estos receptores. Estas discrepancias entre diferentes autores pueden explicarse por las diferentes metodologías empleadas. Sin embargo, estos estudios son incapaces de establecer claramente una relación causa-efecto, ya que cualquier cambio detectado puede ser primario o secundario a la formación de quistes. Además, en el mismo estudio Calder y col. (2001) no encontraron diferencias significativas en la expresión del ARNm de los receptores LH/FSH entre los folículos quísticos y folículos dominantes, indicando que el incremento de la expresión del ARNm del RLH en quistes es una consecuencia más que una causa del estado quístico.

Otro receptor de interés es el RE β . Estudios realizados con roedores demostraron la importancia de este receptor en el desarrollo y crecimiento folicular (Wang y Greenwald, 1993; Robker y Richards, 1998). Además, se ha evaluado su localización en las células del folículo durante el crecimiento folicular en muchos mamíferos, incluyendo la vaca (Byers y col., 1997; Rosenfeld y col., 1999; Salvetti y col., 2007). Específicamente, en las células de la granulosa de los folículos ováricos de ratas la expresión del ARNm del RE β precede al aumento de la expresión de los ARNm del RLH y de las enzimas esteroideogénicas específicas (Bao y col., 2000). Por lo tanto, alteraciones en la expresión de RE β podría producir una disrupción en el sistema local autocrino/paracrino intraovárico, provocando alteraciones en la esteroideogénesis y en el desarrollo folicular lo que finalmente llevaría a la formación de quistes ováricos. Sin embargo, Calder y col. (2001) no hallaron diferencias en la expresión del ARNm del RE β en los folículos quísticos de hembras bovinas con respecto a los folículos dominantes, utilizando la técnica de hibridización *in situ*. Odore y col. (1999) mostraron que hay una notable reducción en la concentración total del RE en los quistes foliculares bovinos con respecto a los folículos dominantes de animales normales. Sin embargo, estos autores no discriminaron entre los distintos subtipos de receptores de estrógenos, así como en la localización de los mismos por lo que una vez más esto podría ser la causa o efecto de la enfermedad.

Además de los cambios en la expresión de los receptores, alteraciones en la capacidad esteroidogénica de los folículos dominantes podrían desencadenar la formación de quistes. Esto es, porque el estímulo a nivel hipotalámico para la consecuente liberación del pico preovulatorio de LH, depende de una adecuada y suficiente secreción de estradiol desde la estructura folicular dominante (Calder y col., 2001). En un estudio realizado por Calder y col. (2001) los quistes estrógeno-dependientes mostraron una mayor expresión del ARNm de 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3 β -HSD), una enzima esteroidogénica, y las vacas que desarrollaron quistes presentaron concentraciones elevadas de estradiol durante las primeras etapas de dominancia folicular (Beam, 1995). Los datos obtenidos del trabajo de Beam (1995) sugieren que la esteroidogénesis está alterada en el desarrollo temprano del futuro quiste, lo cual puede alterar la señal hacia el eje hipotálamo-hipofisario. En este sentido, a través de una intensa retroalimentación positiva, podría verse alterada la liberación de LH llevando a la aparición de la onda preovulatoria de manera temprana e inoportuna en relación al desarrollo folicular. El folículo inmaduro en consecuencia, no ovularía y podría convertirse en quiste.

Estudios dirigidos a entender los cambios moleculares ocurridos en células de la pared folicular respecto a la expresión y caracterización de genes involucrados en la transducción de señales, permitieron abordar aspectos relacionados a la proliferación y apoptosis en los estratos celulares de ovarios sanos y sus alteraciones en los quistes (Peter y Dhanasekaran, 2003; Salvetti y col., 2010). Al respecto, algunos investigadores sugieren que el proceso apoptótico está involucrado en los mecanismos que llevan a la anovulación. La falta de ocurrencia del proceso apoptótico en células de la granulosa estaría colaborando con la formación y persistencia de dicha estructura anovulatoria (Isobe y Yoshimura, 2000a,b; Salvetti y col., 2010).

Por otro lado, los cambios celulares pueden presentarse como una producción aberrante de factores de crecimiento por las células de la granulosa (Ortega y col., 2007a, 2008; Rey y col., 2010), alteraciones en las proteínas que componen el citoesqueleto celular, ya sea en cantidad o tipo de proteínas (Salvetti y col., 2003; Ortega y col., 2007b) o por la secreción inapropiada de proteínas de la matriz extracelular (Salvetti y col., 2003). Entre las proteínas de la matriz extracelular, la vitronectina y la fibronectina podrían tener un rol importante y su producción parecería estar influenciada por el tamaño del folículo (Perrone y col., 1995)

Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio y similares publicados por otros autores, permiten suponer que los receptores de gonadotrofinas, receptores de esteroides cumplen funciones muy importantes en la regulación del desarrollo folicular, siendo capaces de participar en la patogénesis de la COD (Hamilton y col., 1995; Bao y Garverick, 1998; Calder y col., 2001; Berisha y col., 2002; Silvia y col., 2002; Kawate, 2004; Peter, 2004; D'Haeseleer y col., 2005, 2006; Salvetti, 2010). Dado los intrincados mecanismos de regulación endocrina, paracrina y autocrina existentes en el ovario, pequeñas alteraciones en los mecanismos de transcripción y/o traducción de estas proteínas podrían producir importantes variaciones a nivel de la dinámica ovárica normal. Resta discernir si estas alteraciones son causa o consecuencia de cambios a nivel sistémico como pueden ser los niveles de gonadotrofinas circulantes. Trabajos previos han demostrado alteraciones en los niveles de los receptores hormonales (estrógeno, progesterona) como proteicos (receptores de LH y FSH) tanto en modelos experimentales como en ovarios quísticos obtenidos de material de frigorífico (Cook y col., 1991; Odore y col., 1999; Ribadu y col., 1999, 2000; Dobson y col., 2000; Calder y col., 2001, Ortega y col., 2008; Salvetti, 2010). Un evento importante en los mecanismos moleculares utilizados por los receptores esteroides ha sido asociado a proteínas correguladoras, las cuales les confieren la capacidad reguladora a estos factores de transcripción (Perissi y Rosenfeld, 2005). En el presente trabajo profundizamos el estudio acerca de la expresión y los mecanismos moleculares de regulación de los diferentes componentes de los receptores de gonadotrofinas, receptores de hormonas esteroides y proteínas correguladoras, para una mayor comprensión del desarrollo de la COD.

2- OBJETIVOS

2.1. General

Nos proponemos estudiar la expresión y regulación de receptores hormonales y de proteínas correguladoras en ovarios de bovinos con Enfermedad Quística Ovárica (COD), buscando dilucidar su participación en los mecanismos causantes de la formación de los quistes foliculares. El presente estudio está diseñado para examinar la localización y expresión de receptores hormonales y de factores que modulan la transcripción de los receptores esteroides en ovarios normales y en ovarios con COD en bovinos.

2.2. Específicos

- a) Inducir experimentalmente quistes ováricos en bovinos utilizando un modelo experimental para estudiar aspectos de la enfermedad, que ocurren antes de las manifestaciones clínicas y que no pueden ser hallados en los casos de quistes espontáneos.
- b) Realizar un seguimiento de la enfermedad a través del diagnóstico precoz de los “casos a campo” y obtención de material previo a tratamiento.
- c) Analizar semicuantitativamente los patrones de expresión del ARNm de los receptores de gonadotropinas en los distintos folículos antrales del bovino.
- d) Realizar una valoración cualitativa y semicuantitativa de los patrones de expresión proteica y del ARNm de los receptores de hormonas esteroides: estrógenos (α y β), progesterona y andrógenos en los diferentes estadios foliculares del ciclo estral del bovino, caracterizando sus variantes e isoformas.
- e) Establecer el patrón de expresión de proteínas y del ARNm de las proteínas correguladoras evaluando su expresión en diferentes estadios foliculares del ciclo estral del bovino. Analizar el posible rol de las proteínas correguladoras en la regulación de la actividad transcripcional de los receptores de hormonas esteroides.

- f) Identificar qué tipos celulares de los que integran el folículo ovárico sufren modificaciones en la expresión de las variables estudiadas en los animales que presentan la enfermedad quística ovárica.

- g) Determinar similitudes y diferencias entre los hallazgos efectuados en el modelo experimental, con aquellos realizados en ovarios quísticos provenientes de bovinos sacrificados en frigoríficos.

- h) Realizar una descripción cualitativa de la expresión del ARNm de los receptores esteroides y de las enzimas esteroidogénicas en los estratos celulares que integran la pared folicular de quistes foliculares espontáneos diagnosticados “a campo”, a partir de muestras de aspiración folicular.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Modelo experimental

3.1.1- Selección del modelo

Los quistes ováricos han sido inducidos en los bovinos por una variedad de tratamientos aplicados en el diestro tardío o en el proestro. Tales tratamientos incluyen: administración de estrógenos; una combinación de progesterona y estradiol (Cook y col., 1991); antisuero contra LH bovina; testosterona (Fathala y col., 1978) y ACTH exógena (Liptrap y McNally, 1976; Ribadu y col., 2000; Dobson y col., 2000; Ortega y col., 2008).

En este sentido, se ha demostrado que la ACTH causa una supresión de los valores basales de LH (Stoebel y Moberg, 1982; Li y Wagner, 1983; Ribadu, 1993; Ribadu y col., 2000) así como también una menor frecuencia de los pulsos de la misma (Dobson y Smith, 1995). Las alteraciones en las secreciones basales de LH afectan el desarrollo folicular durante el ciclo estral y por consiguiente, podría suponerse que la ACTH podría inducir quistes ováricos por una alteración de la frecuencia de pulso de la LH. Este modelo resulta en la generación de quistes foliculares en un alto porcentaje de los animales tratados por lo cual fue elegido para el desarrollo de trabajos previos (Ortega y col., 2008; Rodríguez y col., 2011) y la presente Tesis.

3.1.2- Animales

En esta experiencia se utilizaron 10 vaquillonas de la raza Holando Argentino puras por cruce, entre 18 y 24 meses de edad, con un peso promedio de 400 kg, examinadas por tacto rectal y ultrasonografía antes del comienzo de la experiencia para comprobar la normalidad en su tracto reproductor; y la normalidad y regularidad de sus ciclos estrales. Las vaquillonas se alojaron en corrales descubiertos, la alimentación se basó en alimento balanceado comercial, heno de alfalfa y silo de maíz y se dispuso agua *ad libitum*.

Se realizó la sincronización de celos a todas las vaquillonas mediante el protocolo Ovsynch (Pursley y col., 1995). Brevemente, se administró GnRH (Receptal®, Intervet, Argentina, 4 µg/ml, 5 ml/animal) el día 0, y a los 7 días se inyectó una dosis de prostaglandina (Iliren®, Intervet, Argentina, 0.2 mg/ml, 5 ml/animal). Finalmente, una nueva dosis de GnRH fue administrada a las 48 horas (día 9). Se realizó la observación del

comienzo de estro 24 horas luego de la segunda administración de GnRH (día 10) y luego cada 12 horas. La primera detección de comportamiento de celo fue designada como día cero del ciclo y se confirmó por ultrasonografía (Sirois y Fortune, 1988). Durante ese período, los animales no recibieron ningún otro tratamiento (Figura 12). Las experiencias fueron realizadas en primavera para evitar los períodos críticos de estrés ambiental.

3.1.3- Grupos experimentales

Luego de la sincronización de celo, los animales fueron distribuidos en 2 grupos, cada uno en corrales individuales.

Grupo Inducido (n=6): las vaquillonas fueron tratadas con 100 UI de corticotrofina (ACTH) (1mg/ml de Tetracosactido [corticotropina], Synacthen depot, Novartis, Buenos Aires, Argentina), cada 12 horas durante 7 días seguidos a partir del día 15 del ciclo estral (Figura 12). El comienzo del tratamiento se realizó en el momento del ciclo en el que la onda de LH preovulatoria comienza a ser sensible a la inhibición por la hormona adrenocorticotropa exógena lo que coincide con el día 15 del ciclo estral normal (Liptrap y McNally, 1976; Dobson y col., 2000; Ortega y col., 2008).

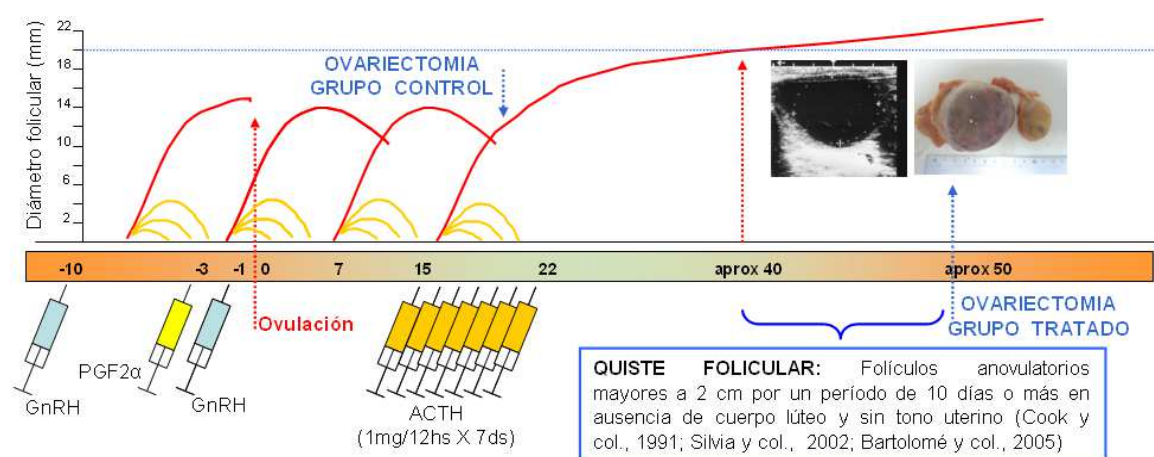


Figura 12: Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes ováricos foliculares mediante administración de ACTH.

Grupo Control (n=4): este grupo de hembras se mantuvo en condiciones ambientales normales, y sin tratamiento, como grupo control. Estos animales, una vez sincronizados, fueron sometidos a ovariectomía durante la etapa de proestro cuando el folículo dominante alcanzó el tamaño preovulatorio.

3.1.4- Ultrasonografía

Para monitorear los cambios en el ciclo estral se realizaron exámenes diarios mediante tacto rectal y ultrasonografía a las vaquillonas de ambos grupos hasta la obtención de las muestras. Se utilizó un ecógrafo Chison 8300vet Digital (Chison Medical Imaging Co, Wuxi, China), equipado con sonda transductora transrectal de doble frecuencia de onda (5.0-7.5 Mhz.). El seguimiento se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Sirois y Fortune (1988). Las imágenes fueron almacenadas para efectuar las mediciones de las estructuras foliculares ováricas.

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

Se consideraron estructuras quísticas todos aquellos folículos que presentaron un diámetro mayor de 20 mm y que permanecieron por 10 días o más en ausencia de cuerpo lúteo y sin tono uterino (Cook y col., 1991; Silvia y col., 2002; Bartolomé y col., 2005; Vanholder y col., 2006). El primer día de formación del quiste se consideró aquel en que la formación folicular alcanzó 20 mm o más.

3.2- Identificación y obtención de muestras de ovarios de animales con COD espontánea obtenidos a campo

Las muestras de “casos a campo” fueron provistas por numerosos profesionales de la zona de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Esperanza, quienes al primer indicio de alteraciones foliculares compatibles con la presencia de quiste, nos lo informaron. En colaboración con profesionales de nuestro grupo de trabajo se realizó la

evaluación de los signos clínicos y la confirmación por ultrasonografía de la enfermedad. Se tomaron imágenes y se evaluaron las medidas que presentaron las estructuras foliculares de cada animal. Además se realizó una anamnesis completa registrando condición corporal, alimentación, número de pariciones, producción y estado reproductivo.

Se estudiaron un total de 14 vacas raza Holando Argentino en lactancia, seleccionadas por presentar signos clínicos de la enfermedad. Los animales tenían edades comprendidas entre los 40 y 93 meses de edad, al menos un parto lo que descartaba posibles anomalías reproductivas congénitas asociadas a infertilidad y estaban libres de enfermedades infectocontagiosas.

3.3- Toma de muestras

3.3.1- Muestras provenientes del modelo experimental

Una vez detectados los quistes foliculares en los animales a los cuales se les realizó el protocolo de inducción (Grupo Inducido) se procedió a la ovariectomía. En el caso de los animales control del modelo experimental (Grupo control) se le efectuó la ovariectomía en la etapa del proestro. El abordaje fue por el flanco izquierdo, con anestesia local infiltrativa y anestesia epidural (160 ml de clorhidrato de lidocaína al 2% (Anestésico 2%, Rudavet®, Buenos Aires, Argentina). Se procedió a la incisión desde dorso-caudal hacia ventro-craneal de la piel del flanco y los planos musculares, de una longitud suficiente como para que entre la mano del cirujano. Una vez localizados los ovarios, estos fueron extraídos, ligando los vasos sanguíneos que los irrigan, procediendo luego a la sutura de todos los planos de acuerdo a la técnica quirúrgica descrita previamente (Garnero y Perusia, 2002). Las muestras obtenidas fueron destinadas a técnicas histológicas, inmunohistoquímica, western blot y biología molecular como se describirá más adelante. Además, se obtuvieron muestras de sangre 2 veces al día, desde el inicio del tratamiento con ACTH hasta el día de la ovariectomía, para las determinaciones hormonales. Esto permitió, en trabajos de investigación previos, corroborar el funcionamiento del modelo experimental y modificaciones endocrinas existentes durante el desarrollo del mismo (Ortega y col., 2008; Salvetti y col., 2010).

3.3.2- Muestras provenientes de casos de COD espontánea obtenidas a campo

Se obtuvieron muestras de líquido folicular de quistes de animales con COD espontánea mediante aspiración folicular. Para ello se utilizó un ecógrafo digital Chison 8300vet equipado con un transductor microconvexo de 5.0 MHz montado en una sonda transvaginal (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Cravinhos, 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. El aspirado se realizó empleando una bomba de vacío a una presión de 500 mmHg. Una vez que el dispositivo de aspiración fue montado, se introdujo vía vaginal hasta contactar con el fondo de la misma. El quiste folicular fue localizado por tacto rectal, acercado y fijado al transductor de la sonda. Una vez visualizado en la pantalla del ecógrafo, se procedió a la introducción de la aguja a través de la pared vaginal y luego a través de la pared del quiste para la obtención de la muestra, al mismo tiempo que la bomba de vacío fue activada. Inmediatamente luego de la recolección del líquido folicular se procedió a su conservación a 4-6°C y se trasladó al laboratorio. Además, se tomaron muestras de sangre en el momento de la aspiración del líquido folicular para análisis hormonales posteriores.

3.3.3- Muestras de quistes espontáneos provenientes de frigorífico

En establecimientos frigoríficos de la zona, con la ayuda de la inspección veterinaria, se identificaron tropas compuestas mayoritariamente por vacas Holando Argentino provenientes de tambos. En playa de faena se examinó el aparato reproductor completo, se confirmó la no preñez y la ausencia de alteraciones macroscópicas tales como adherencias, alteraciones en las trompas uterinas o en útero, etc. Se recolectaron ovarios normales y ovarios con estructuras ováricas compatibles con la definición de quistes foliculares (Bartolomé y col., 2005).

3.4- Procesamiento de las muestras

3.4.1- Muestras

Todos los ovarios fueron trasladados refrigerados al laboratorio y se colocaron sobre una tabla de disección para realizar una inspección macroscópica. De acuerdo a las técnicas a aplicar sobre las muestras se procesaron como se detalla a continuación:

3.4.1.1- Muestras de pared folicular: Del material obtenido de frigorífico se seleccionaron folículos antrales de diferentes tamaños de ovarios normales ($n = 10$ en todos los casos) y folículos quísticos ($n = 10$), los que fueron disecados con ayuda de bisturí y tijera. Se midió el diámetro de los folículos, se recolectó el líquido folicular mediante jeringa y aguja- que se almacenó a -20°C para determinaciones hormonales- y se tomaron muestras de pared folicular, las que fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y posteriormente conservadas en a -80°C hasta su procesamiento. Estas muestras fueron destinadas a las técnicas de western blot y de RT-PCR.

3.4.1.2- Muestras de células de la granulosa: Del líquido folicular de quistes ($n = 10$) y de folículos antrales normales de diferentes tamaños ($n = 10$ en todos los casos) obtenidos de frigorífico, se procedió a separar las células de la granulosa presentes en el mismo mediante la centrifugación a 2000 g en centrífuga refrigerada durante 5 minutos, el pellet obtenido fue congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C hasta su procesamiento. El sobrenadante (líquido folicular) fue almacenado a -20°C y destinado a mediciones hormonales. Las células de la granulosa fueron destinadas a técnicas de biología molecular.

3.4.1.3- Muestras de células de la teca: Del material obtenido de frigorífico se seleccionaron folículos antrales de diferentes tamaños de ovarios normales ($n = 10$ en todos los casos) y folículos quísticos ($n = 10$) para muestras de la teca. Para obtener la teca se eliminaron las células remanentes de granulosa por raspaje y lavados consecutivos con agua libre de ARNasas (DEPC 0,1%). Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas en a -80°C hasta su procesamiento (técnicas de biología molecular).

3.4.1.4- Muestras de líquido folicular: El líquido folicular del material obtenido de frigorífico se recolectó y almacenó como se detalló anteriormente (inciso 3.4.1.1 y 3.4.1.2). El líquido folicular proveniente de muestras obtenidas a campo se centrifugó a 2000 g en centrífuga refrigerada durante 10 minutos para separar las células foliculares que fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización. De estas muestras se obtuvieron células y se extrajo ARN total, como se detalla más adelante.

3.4.1.5- Muestras de ovarios normales y quísticos para procesamiento histológico: Los ovarios provenientes del modelo experimental ($n = 10$) como así también ovarios normales ($n = 10$) y con quistes ($n = 15$) obtenidos de frigorífico fueron reducidos y fijados en formol bufferado al 10% durante 8 horas a 4°C para realizar el procesamiento histológico de rutina para una caracterización histológica inicial y para la realización de la técnica de inmunohistoquímica.

3.4.2- Procesamiento de las muestras destinadas a Inmunohistoquímica

Luego de la fijación con formol bufferado las muestras de ovarios fueron lavadas en buffer fosfato salino (PBS) 0,01M, pH 7,2, deshidratadas en concentraciones graduales crecientes de alcohol etílico, aclaradas en xilol y embebidas en parafina siguiendo protocolos histológicos de rutina (Ortega y col., 2009).

Se efectuaron cortes seriados de 4 μm de espesor con un micrótomo rotativo, los que se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), fueron secados en estufa a 37°C y luego almacenados a 4°C hasta su utilización en técnicas de inmunohistoquímicas (IHQ). Para hacer una caracterización inicial y evidenciar la morfología general se utilizó la coloración de hematoxilina-eosina.

3.4.3- Procesamiento de las muestras destinadas a Western Blot

Se tomaron fracciones de aproximadamente 60 mg de pared folicular de folículos antrales sanos y quísticos, las que fueron colocadas en buffer RIPA (Anexo I) con inhibidores de proteasas (Complete Mini: Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Indianápolis, Estados Unidos) y homogeneizadas con un homogeneizador de mano UltraTurrax (Ika, Staufen, Alemania). El sobrenadante se obtuvo luego de centrifugar las muestras a 14.000 g 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.

3.4.4- Procesamiento de las muestras destinadas a las técnicas de Biología molecular

3.4.4.1- Extracción de ARN total

El ARN total fue aislado de la pared folicular completa como así también de las células de la granulosa y de la teca de folículos antrales sanos y quísticos. Para ello el método elegido fue el del reactivo Trizol LS (Invitrogen) que consiste en homogeneizar 50-100 mg de tejido (o el pellet en caso de células de la granulosa) en 1 ml de reactivo e incubar 5 minutos a 25°C. El ARN total se extrajo a partir del sobrenadante obtenido con cloroformo (Merk KGaA, Darmstadt, Alemania), previa agitación vigorosa e incubando 15 minutos a 4°C. Se centrifugó a 12000 g para separar la fase acuosa de la orgánica. Posteriormente se precipitó el ARN con un volumen equivalente de alcohol isopropílico (Merk KGaA) incubando por 30 minutos a -20°C y se separó por centrifugación a 12000 g. El ARN obtenido se lavó con etanol 75% por 10 minutos a 4°C, se resuspendió en 30 µl de agua DEPC 0,1% precalentada a 60°C. El producto final fue almacenado a -80°C hasta su posterior utilización.

3.4.4.2- Lectura espectrofotométrica de ácidos nucleicos

La concentración final de ARN en las muestras procesadas se estimó mediante la lectura en espectrofotómetro (Boeco, Hamburg, Alemania) de una dilución 1/100 de las mismas, empleando para tal fin el cociente entre las absorbancias obtenidas a 260 nm (punto de máxima absorción de los ácidos nucleicos) y 280 nm (punto de máxima absorción de proteínas). En los ensayos realizados solamente se utilizaron muestras con una relación mayor a 1,9. La concentración de ARN se obtuvo siguiendo la fórmula detallada a continuación:

$$1 \text{ unidad de Abs.}_{260} = 40 \mu\text{g Ácido ribonucleico/ml}$$

$$\text{Concentración de ARN } (\mu\text{g/ml}) = \text{Abs.}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{dilución}^{-1}$$

3.4.4.3- Eliminación del ADN genómico

Inicialmente, a los efectos de eliminar posibles contaminaciones de ADN genómico, se realizó un tratamiento con ADNasa (Invitrogen). Para ello, se preparó una solución con agua DEPC 0,1%, buffer para la enzima ADNasa I 10X y la enzima ADNasa I 1U/ μ l, se agregó una cantidad constante de ARN (1,2 μ g) y se incubó a 20°C durante 15 minutos. Seguidamente se procedió a la inactivación de la enzima mediante el agregado de EDTA 25mM incubando 10 minutos a 65°C.

3.5- Clasificación de las estructuras foliculares

Las diferentes categorías foliculares observadas en los cortes histológicos se clasificaron de acuerdo a lo establecido por la Nomina Histológica (1994). Por otra parte, los folículos antrales provenientes de ovarios sanos que fueron utilizados para las técnicas

de biología molecular fueron clasificados según Parrot y Skinner (1998) como se detalla en la Tabla 1. Para los quistes foliculares se tomó un diámetro de 20 mm o más.

FOLÍCULOS	TAMAÑO
Antrales Pequeños	< 5 mm
Antrales Medianos	5-10 mm
Antrales Grandes	> 10 mm
Quistes	≥ 20 mm

Tabla 1: Clasificación de las estructuras foliculares utilizadas.

3.6- Localización y Cuantificación de la expresión proteica por Inmunohistoquímica sobre muestras de tejido ovárico

3.6.1- Técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) indirecta

La localización y expresión del receptor de andrógenos se evaluó mediante IHQ indirecta. La inmunomarcación de los receptores de estrógenos y progesterona se determinó en trabajos anteriores, desarrollados en nuestro laboratorio (Salveti, 2010). Además, por esta metodología también se evaluó los patrones de expresión de las proteínas correguladoras SRC-3, SMRT y REA.

Se analizaron folículos primarios, secundarios, terciarios y folículos quísticos de animales provenientes de frigorífico tanto controles como con COD espontánea y por otro lado se evaluaron las mismas categorías foliculares en animales controles sincronizados y con COD inducida mediante ACTH. En la Tabla 2 se detallan los anticuerpos específicos utilizados con las concentraciones de uso empleadas para la determinación de las proteínas analizadas en este trabajo de Tesis. Las inmunomarcaciones se realizaron siguiendo el protocolo descrito previamente por Ortega y col. (2009), según se detalla a continuación:

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

- 3- Hidratación en PBS pH 7,2 durante 5 minutos.
- 4- Tratamiento de recuperación antigénica. Se realizó en un horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 1000 W). Como solución de recuperación se usó Buffer Citrato 0,01 M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en un coplin sumergido en un recipiente con agua y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación: 3 minutos a 100% de potencia, 12 minutos al 40% y 20 minutos dentro del microondas apagado.
- 5- Bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa, sumergiendo las muestras durante 10 minutos en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno 30 volúmenes en metanol absoluto, agregando nuevamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno a los 10 minutos.
- 6- Dos lavados en PBS durante 5 minutos.
- 7- Bloqueo de los sitios de unión no-específicos incubando 20 minutos a 25°C en cámara húmeda con una solución de suero normal de cabra (SNC) al 5% (ver Anexo I).
- 8- Incubación con anticuerpo primario: escurrido el exceso de solución de bloqueo y sin lavar cubrirlo con el anticuerpo primario, de acuerdo al procedimiento correspondiente (ver Tabla 2). Incubación en cámara húmeda durante toda la noche (O.N.) a 4°C. Para los controles de especificidad se sustituyó el anticuerpo primario por SNC.
- 9- Después de la incubación con el anticuerpo primario la cámara se retiró de la heladera y se dejó a 25°C durante 10 minutos.
- 10- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- 11- Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado preabsorbido seleccionado (monoclonal o policlonal, según el anticuerpo primario, ver Tabla 2) durante 30 minutos a 25°C en cámara húmeda.
- 12- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- 13- Incubación con complejo estreptavidina-peroxidasa (Biogenex, San Ramon, Estados Unidos) lista para usar, durante 30 minutos a 25°C.
- 14- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- 15- Revelado de la reacción con diaminobencidina (DAB) (Dako, Glostrup, Dinamarca). Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y de ese modo estandarizarlo.
- 16- Lavados con agua destilada, 2 de 5 minutos cada uno. Luego se realizó la coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur, Bubendorf, Suiza), deshidratación y montaje con Bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur) y cubreobjetos apropiados.

Origen	Dilución	Recuperación Antigénica	Incubación	Procedencia
<i>Anticuerpos primarios</i>				
RA	Ratón	1:15	Microondas	O.N. a 4°C BioGenex, San Ramon, USA
SRC-3	Conejo	1:50	Microondas	O.N. a 4°C LETH, UNL, Sta. Fe, Arg.
REA	Conejo	1:100	Microondas	O.N. a 4°C LETH, UNL, Sta. Fe, Arg.
SMRT	Conejo	1:40	Microondas	O.N. a 4°C LETH, UNL, Sta. Fe, Arg.
<i>Anticuerpos secundarios</i>				
Anti conejo IgG	Cabra	1:200		30 min a 25°C LETH, UNL, Sta. Fe, Arg.
Anti ratón IgG	Cabra	1:50		30 min a 25°C LETH, UNL, Sta. Fe, Arg.

Tabla 2: Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunohistoquímica. Diluciones de uso, tipo de recuperación antigénica empleada, modo de incubación del anticuerpo primario y procedencia del mismo.

3.6.2- Análisis digital de imágenes

Las imágenes de los preparados histológicos generadas con un microscopio convencional Olympus CX31 (Olympus Co., Tokyo, Japón), fueron digitalizadas por una cámara de video color CCD Moticam 2000 (Mikron Instrument Inc., California, Estados Unidos) conectada a una PC de escritorio. Se realizó el análisis de las imágenes utilizando el programa Image Pro-Plus 3.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, Estados Unidos). La evaluación de las imágenes se efectuó mediante un análisis de segmentación de colores en los tonos e intensidades correspondientes a las áreas de reactividad del cromógeno utilizado. El área inmunohistoquímicamente marcada por la reacción del anticuerpo fue calculada como un porcentaje del área total evaluada a través de la segmentación de colores localizando todos los objetos de color específico (marcación marrón) y extrayendo los objetos que presentan un color diferente. Se realizó un histograma para determinar el porcentaje del área marcada (Salveti y col., 2004; Ortega y col., 2009, 2010).

3.7- Determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados en IHQ mediante Western Blot

3.7.1- Corrida electroforética

Se llevaron a cabo electroforesis en geles de poliacrilamida discontinuos en condiciones desnaturalizantes para el gel de resolución (SDS-PAGE) (Ortega y col., 2009). Se utilizaron homogeneizados de pared folicular de folículos antrales grandes y quísticos. Las muestras fueron diluidas 1:2 con buffer de muestra para SDS-PAGE, e incubadas en baño termostático a 95°C por 5 minutos. Se utilizó una cuba vertical (Bio-Rad, California, Estados Unidos) y el buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1% de SDS, pH 8,3. Se sembraron los volúmenes adecuados para 40 µg de proteínas y se realizó una corrida electroforética durante 45 minutos a 25 mA para el gel de apilamiento y luego durante 90 minutos a 50 mA para el gel de resolución. Los marcadores de peso molecular (PM) (Kaleidoscope Prestained Standards 161-0324, Bio-Rad) que se utilizaron se detallan en la Tabla 3.


	Proteína	Peso molecular (kDa)
	Miosina	195
	β-galactosidasa	31
	Albúmina sérica	85
	Anhidrasa carbónica	40
	Inhibidor de tripsina	31,53
	Lisozima	17,25
	Aprotinina	6,75

Tabla 3: Estándares de PM para SDS-PAGE, amplio espectro. Kaleidoscope Prestained Standards 161-0324. Bio-Rad.

3.7.2- Electrotransferencia

Luego de terminada la corrida se procedió a la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, GE Healthcare, Buenos Aires,

Argentina) para lo cual se utilizó el buffer de transferencia Towbin modificado compuesto por Tris-Glicina con 20% de metanol. Se realizó la transferencia en frío a 100 V durante 180 minutos. Al término de este período se coloreó la membrana con el colorante Rojo Ponceau para ver la efectividad de la transferencia. Con el mismo sentido se coloreó el gel con Coomassie Brilliant Blue 250G.

3.7.3- Inmunodetección de las proteínas analizadas en IHQ sobre muestras de tejido ovárico

Las membranas de nitrocelulosa obtenidas de las muestras del tejido ovárico fueron bloqueadas con TBS-T-leche 3%, durante 180 minutos a 25°C en agitación para evitar uniones inespecíficas. Posteriormente, se incubó toda la noche a 4°C con una dilución de los anticuerpos detallados en la Tabla 4. Las diluciones de los anticuerpos fueron preparadas en buffer de bloqueo. Se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T y luego se incubó la membrana con una dilución del anticuerpo secundario en solución de bloqueo por 120 minutos a 25°C. Luego de realizar lavados con TBS-T se detectó la señal específica por quimioluminiscencia, (Sistema ECL Plus, GE Healthcare). Las membranas fueron expuestas a una placa radiográfica (ECL, GE Healthcare) durante 15 a 30 segundos. El revelado de la placa se realizó en forma manual utilizando soluciones de revelador y fijador (Kodak, Nueva York, Estados Unidos). Las placas autoradiográficas fueron escaneadas con un escáner de oficina (HP Officejet J5700) y las imágenes obtenidas fueron guardadas con formato Tiff de alta resolución.

Proteína	Anticuerpo	Origen	Dilución	Procedencia
RA	Anti- RA	Monoclonal	1:25	BioGenex
SRC-3	Anti-SRC-3	Policlonal	1:50	LETH-FBCB-UNL
SMRT	Anti-SMRT	Policlonal	1:50	LETH-FBCB-UNL
REA	Anti-REA	Policlonal	1:100	LETH-FBCB-UNL

Tabla 4: Anticuerpos utilizados en la técnica de Western Blot.

3.8- Evaluación de la expresión del ARNm mediante RT-PCR

3.8.1- Caracterización de muestras de células de la granulosa y de la teca

En la síntesis de andrógenos ováricos participa la enzima 17 α -hidroxilasa/17,20 liasa dependiente del citocromo P₄₅₀ (CyP17). Esta enzima está presente solo en las células tecales catalizando la conversión de pregnenolona a androstenediona. Por otra parte, el último paso en la biosíntesis de los estrógenos es la aromatización de los andrógenos utilizando la enzima CyP19 dependiente del citocromo P₄₅₀ que está presente en grandes cantidades únicamente en las células granulosas (Payne, 1990; Luo y Wiltbank, 2006).

Conociendo que las células de la teca expresan la enzima CyP17 y que solo en las células de la granulosa se expresa CyP19 se emplearon oligonucleótidos específicos de la secuencia codificante de estas enzimas para evaluar, por PCR de punto final, la pureza de los diferentes tipos celulares.

3.8.2- Diseño y selección de oligonucleótidos para receptores hormonales y proteínas correguladoras.

Se diseñaron distintos juegos de oligonucleótidos específicos para los genes detallados en la Tabla 5 mediante el programa de bioinformática Lasergen (Dnastar, Madison, Estados Unidos). En los casos en que fue posible, los pares de oligonucleótidos se diseñaron de forma tal que el sentido y el antisentido fueran complementarios a secuencias ubicadas en exones diferentes, a fin de evitar amplificaciones inespecíficas a partir de ADN genómico.

Para caracterizar y cuantificar la expresión de las distintas isoformas del RP se diseñaron 3 juegos de oligonucleótidos diferentes abarcando al menos dos sitios de *splincing* alternativos. El juego de oligonucleótidos diseñado para la isoforma B abarca secuencias de la región NH₂-terminal específicas para esta isoforma. El par de oligonucleótidos designados *RPab* flanquea la región A/B común a las isoformas A y B. Por último, *RPtotal* abarca las secuencias de la región E que es común para todas las isoformas del RP (Figura 13).

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Nro. Acceso	Posición Del fragmento	Tamaño del fragmento	T (C°)	Ciclos
RA						
Sentido	CCTGGTTTTCAATGAGTACCGCATG	AY862875	420-444	172 pb	60	32
Antisentido	TTGATTTTTTCAGCCCATCCACTGGA		591-567			
REα						
Sentido	AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC	AY538775	1352-1372	234 pb	64	32
Antisentido	CGGTGGATGTGGTCCTTCTCT		1585-1565			
REβ						
Sentido	CTTCGTGGAGCTCAGCCTGT	NM_174051	972-991	241 pb	54.1	31
Antisentido	GAGATATTCTTTGTGTTGGAGTTT		1212-1189			
RPb						
Sentido	TGCGAGACCCCCAGAGAAGGA	XM_583951	291-311	62 pb	57.5	32
Antisentido	GCGCCAGCAGGGTGTCCAG		352-334			
RPab						
Sentido	CCCCGGTGCCCAAAGAAGATG	XM_583951	767-787	131 pb	63.5	33
Antisentido	CAGGATGGGCACGTGGATGAAGTC		897-874			
RP$total$						
Sentido	GAGATCTTATAAGCATGTCAGTGG	XM_583951	2160-2183	360 pb	51.2	32
Antisentido	TCATGCAAGTTATCAAGAAGTTTT		2519-2496			
SRC-1						
Sentido	CTCCCCGTTAGCATGACAAGTA	XM_867432	1839-1861	491 pb	55.5	30
Antisentido	GAGAGGAGGGGCAAGAACCAC		2329-2309			
SRC-2						
Sentido	CCGGCCGATCCAAGGAGGTATG	XM_584905	2995-3016	487 pb	61.7	30
Antisentido	CTGCGGGAACACGGGGGTCTT		3481-3461			
SRC-3						
Sentido	CAAAGAGCTCCAGCCCAAAGTG	XM_602010	2256-2277	490 pb	56.4	30
Antisentido	AGGCGCTGATTCACAGTCAC		2745-2725			
LCoR						
Sentido	GGAAGGCCCGCAGATTGA	XM_584325	701-720	340 pb	55.2	32
Antisentido	CTGAAGCCGCACCCCTGTC		1040-1023			
RFSH						
Sentido	GGCCAAGTCAACTTACCGCT	L22319	799-818	399 pb	53.4	32
Antisentido	GTGATGGCCAGGATGCTAATAA		1197-1176			
RLH						
Sentido	GGCTGGGATTATGACTATGGTTTC	AF491303	988-1011	133 pb	52.7	29
Antisentido	GGATATTAATCAGCCAAATCAGGAC		1120-1096			
CyP17						
Sentido	GGAGGCGACCATCAGAGAAGTGC	NM_174304	1105-1127	319 pb	60.8	35
Antisentido	CAGCCGGGACATGAAGAGGAAGAG		1423-1400			
CyP19						
Sentido	TAAAACAAAGCGCCAATCTCTACG	BTCYP19	8-31	341 pb	55.4	35
Antisentido	GGAACCTGCAGTGGGAAATGA		348-328			
GAPDH						
Sentido	CACCCTCAAGAT TGCAGCA	BC102589	8-31	103 pb	52	31
Antisentido	GGTCATAAGTCCCTCCACGA		348-328			

Tabla 5: Secuencia de oligonucleótidos, posición del fragmento utilizado y condiciones usadas en la técnica de PCR punto final.

La especificidad de todos los oligonucleótidos fue cotejada por comparación directa de su secuencia contra el genoma completo de *Bos taurus* utilizando la herramienta **BLAST** disponible *on line* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/RnBlast.html>). Todos los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por Invitrogen en una escala de 25 nM.

Las condiciones de reacción óptimas fueron establecidas experimentalmente. Se probaron distintas temperaturas de hibridación y para determinar la cinética se enfrentó cada mezcla de reacción de PCR a ciclos crecientes comprendidos entre 28 a 40 ciclos. El número de ciclos óptimo para cada par de oligonucleótidos fue elegido estableciendo la zona de síntesis exponencial de los amplificados y de linealidad respecto a la carga de ARN inicial.

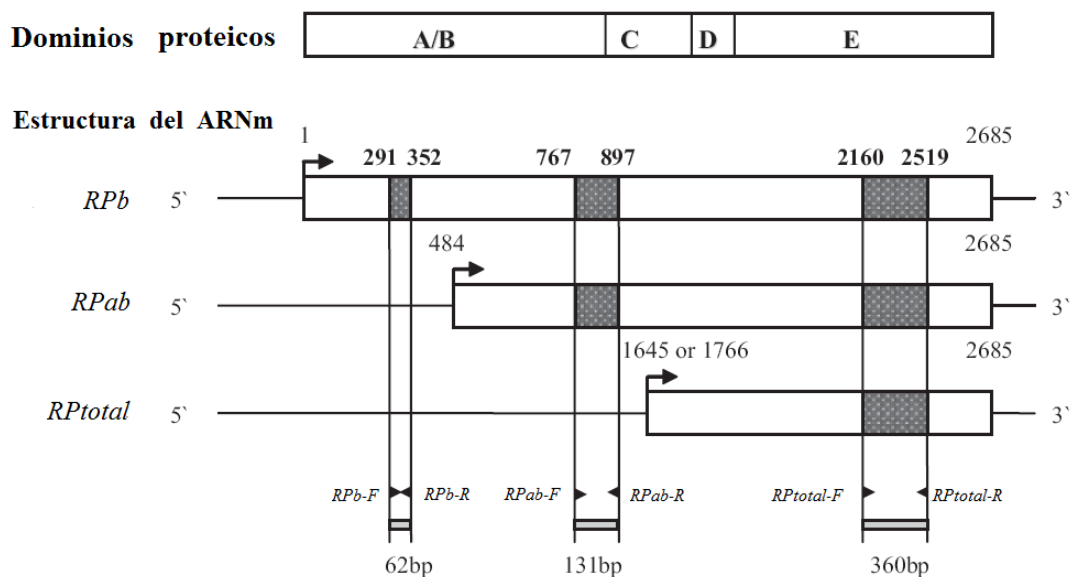


Figura13: Diagrama de los dominios funcionales del RP bovino y sus variantes. La isoforma A del RP es una variante NH₂-terminal truncada de la isoforma B. La isoforma C es también un producto transcripcionalmente truncado pero más chica que la isoforma A. En la figura se indican la posición y el tamaño de los juegos de oligonucleótidos generados para las diferentes isoformas del RP (Adaptado de Fang y col., 2002).

3.8.3- Control interno

Como control interno se utilizó el gen correspondiente a la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) cuya abundancia relativa de su mensajero en el tejido ovárico se mantuvo constante durante el transcurso del experimento. La secuencia del gen normalizador se obtuvo de trabajos publicados previamente (Shibaya y col., 2007). Con el uso del programa bioinformático Lasergen (Dnastar) se determinó la complementariedad del juego de oligonucleótidos, la estabilidad y el tamaño del producto y con la herramienta **BLAST** se comparó contra el genoma completo de *Bos taurus* para determinar su especificidad. Las condiciones óptimas de reacción se determinaron experimentalmente. Para la amplificación de GAPDH se utilizaron 31 ciclos y una temperatura de hibridación de 52°C (Tabla 5).

3.8.4- Procedimiento general de la técnica de la transcriptasa reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

3.8.4.1- Transcripción Reversa

Para la transcripción reversa primeramente se preparó una solución “master mix” conteniendo oligonucleótidos con secuencia al azar (*Random Primers*), dNTPs, buffer para la enzima MMLV 5X, DTT 100 mM, inhibidor de ribonucleasas ARNasaOut 40U/μl y la enzima MMLV RT 200U (Invitrogen), y se adicionó una cantidad constante de ARN tratado con ADNasa. Las condiciones utilizadas para la transcripción reversa fueron 10 minutos a 25°C para el anillado, 50 minutos a 37°C para la síntesis del ADNc y 15 minutos a 70°C para la inactivación de la enzima. Todas las reacciones se llevaron a cabo para un volumen final de 20μl utilizando termociclador (Techne TC-312, Stone, Reino Unido).

La concentración de ADN simple cadena (ADNsc) obtenida fue cuantificada por un método fluorimétrico Quant-iT™ ssDNA Assay Kit (Qubit™, Invitrogen) con el objeto de utilizar luego una cantidad constante para la técnica de amplificación del ADN (PCR) para cada par de oligonucleótidos.

3.8.4.2- Técnica de PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo resuspendiendo la muestras de ADNc en una solución “master mix” conteniendo agua bidestilada, MgCl₂ 50 mM, oligonucleótido sentido 20 μM, oligonucleótido antisentido 20 μM, dNTPs (25 mM), buffer Taq 10X y Taq polimerasa (5U/μl) (todos los reactivos de Invitrogen). Las condiciones de la técnica de PCR de punto final se muestran en la Tabla 6. Se llegó a un volumen final de 25 μl utilizando termociclador convencional (Techne TC-312).

# ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo
x1	Desnaturalización del templado	94°C	3min
x (Variable*)	Desnaturalización	94°C	45sec
	Hibridación (Variable*)	Variable*	30sec
	Extensión	72°C	1min 30sec
x1	Extensión final	72°C	10min

Tabla 6: Condiciones utilizadas para PCR en termociclador (* ver Tabla 5).

Los niveles de expresión del ARNm de los receptores de gonadotrofinas, los receptores de hormonas esteroides y las proteínas correguladoras se evaluaron en muestras de quistes ováricos espontáneos y de folículos antrales pequeños, medianos y grandes provenientes de frigorífico. Para el caso de los receptores de esteroides además se evaluó la expresión del ARNm en muestras de quistes ováricos provenientes de “casos a campo”.

3.8.5- Electroforesis en geles de agarosa

Los amplificadores obtenidos de las distintas PCR se corrieron en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed™ (Biotium, California, Estados Unidos) de manera conjunta con un marcador de pares de bases (Ladder 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina) con el objetivo de determinar la especificidad del producto. Las bandas

obtenidas fueron visualizadas en el gel con un transiluminador UV (Labnet, Edison, Estados Unidos) y se tomaron imágenes digitales con una cámara de fotos Olympus BH-2, (Olympus Co.).

3.8.6- Análisis de imágenes

El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Image-Pro Plus 3.0.1 (Media Cybernetics). Los niveles de ARNm se expresaron como una relación entre la Densidad Óptica Integrada (DOI) de las bandas de los diferentes mensajeros con su correspondiente gen normalizador.

3.8.7- Secuenciación de los productos de amplificación

Para confirmar la identidad de las bandas observadas en los geles de agarosa, todos los productos de amplificación obtenidos fueron aislados y enviados a un laboratorio externo para su secuenciación (Macrogen, Seúl, Corea del Sur). Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando el programa **BioEdit** y se compararon con la base de datos GenBank mediante la herramienta **BLASTn** disponible *on line* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.9- Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los diferentes parámetros cuantificados se utilizó un programa informático (SPSS 11.0, Windows, SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). La diferencia significativa entre grupos se obtuvo por one-way ANOVA, seguida de un análisis de comparación múltiple Duncan's. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm error estándar medio (SEM). Este error estándar medio se puede definir como la distribución de probabilidad de un parámetro; es la desviación estándar de la distribución de las muestras.

3.10- Normas éticas y de bioseguridad

Los procedimientos efectuados con los animales de experimentación fueron realizados de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching, Federation of Animal Science Societies, 1a. Ed. 1999. Estados Unidos). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral bajo el número 32/2008.

Se prestó especial atención en el uso y manejo de residuos de drogas o reactivos potencialmente contaminantes, siguiendo las normativas institucionales para su eliminación.

4- RESULTADOS

4.1- Caracterización de la inducción de la COD

Por ultrasonografía pudo observarse que todos los animales tratados con ACTH presentaron desarrollo de un folículo dominante en uno de sus ovarios el cual no ovuló y persistió por más de 10 días, momento en el que se realizó la ovariectomía (Figura 14). La dinámica folicular de los animales controles permaneció normal observándose desarrollo de folículos antrales de distinto tamaño con la consiguiente ovulación del folículo dominante preovulatorio y formación del cuerpo lúteo.

Con la coloración de hematoxilina-eosina, pudo observarse que los ovarios de los animales controles exhibían folículos en varios estadios de desarrollo incluyendo folículos primarios, secundarios y terciarios; cuerpos lúteos en regresión y cuerpos blancos así como también folículos con diferente grado de atresia. En todos ellos la morfología fue normal en relación a la estructura analizada.

En los animales tratados con ACTH, los ovarios no presentaron cuerpo lúteo ni tejido luteal activo, se encontraron además folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos. En todos los casos se observó un folículo quístico con un diámetro mayor a 20 mm en uno de los ovarios (Figuras 15 y 16). Las capas de la pared folicular presentaron células aparentemente sanas, sin procesos degenerativos. Las modificaciones endocrinas existentes durante el desarrollo del modelo experimental fueron evaluadas en un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo, donde se describió que las estructuras quísticas del modelo experimental presentaron una baja concentración de testosterona y alta concentración de progesterona en líquido folicular, sin cambios para la concentración de estradiol (Ortega y col., 2008; Salvetti, 2010), en concordancia a lo sugerido por otros autores (Monniaux y col., 2008). El nivel de 17β -estradiol medido en suero durante el período de inducción de la enfermedad con ACTH hasta 10 días posteriores presentó una elevación significativa en los animales con COD inducida en relación a los controles. La progesterona presentó una elevación significativa en los animales controles en relación a los COD a partir del día 23 del ciclo. El cortisol se mantuvo elevado desde el inicio en los animales tratados con ACTH hasta el día 23, bajando luego a los mismos niveles de los animales controles (Ortega y col., 2008; Salvetti, 2010).

De los ovarios obtenidos en playa de faena se obtuvieron quistes foliculares espontáneos con diferentes características (algunos con capa de granulosa ausente, otros

con la teca luteinizada, e incluso se observaron quistes luteales y paraováricos). Solo se evaluaron aquellos quistes foliculares que presentaron todas las capas foliculares sin luteinización (Figura 17).

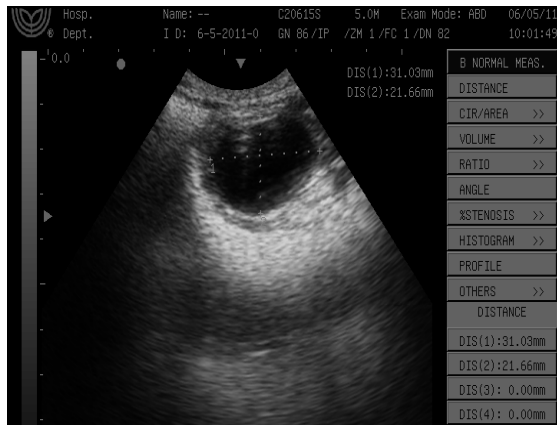


Figura 14: Ultrasonografía de un animal con un quiste folicular de 31,03 x 21,66 mm en el ovario derecho.

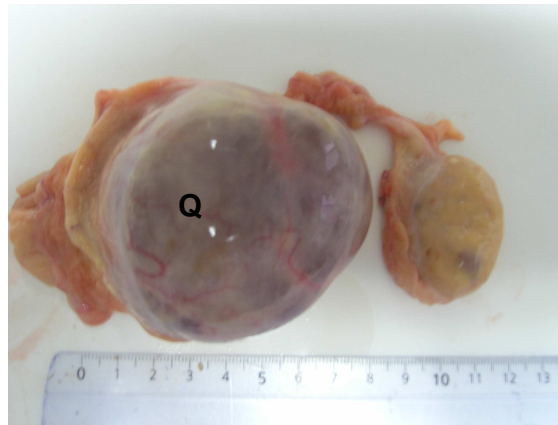


Figura 15: Quiste folicular de más de 30 mm de diámetro obtenido luego de la castración. Q: quiste.

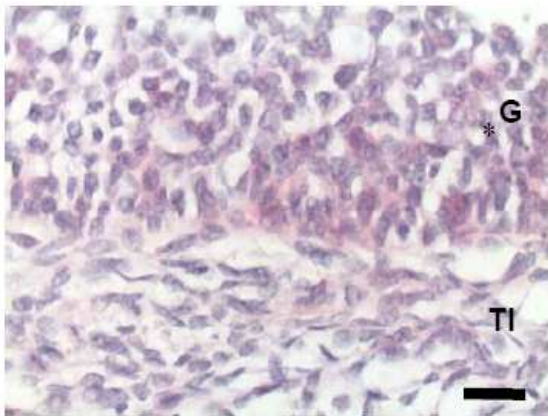


Figura 16: Detalle de la pared folicular de un quiste de un animal con COD inducida. La barra equivale a 20 µm. G: granulosa; TI: teca interna.

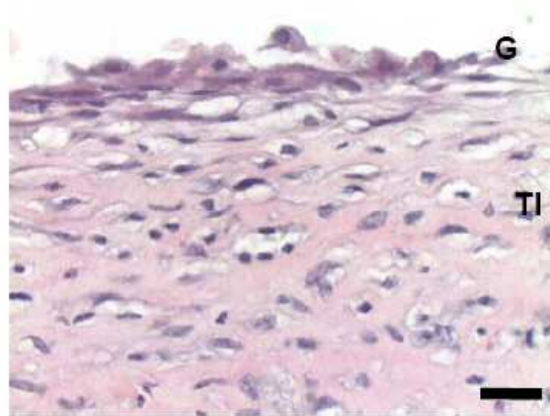


Figura 17: Detalle de la pared folicular de un quiste de un animal con COD espontánea. La barra equivale a 20 µm. G: granulosa; TI: teca interna.

4.2- Caracterización de muestras de células de la granulosa y de la teca

Se utilizaron aquellas muestras de células de la granulosa que fueron positivas para la amplificación del ARNm de la enzima CyP19 y negativo para el ARNm de la enzima CyP17. Las muestras de células de la teca utilizadas fueron las que evidenciaron la presencia de bandas correspondientes al tamaño esperado del producto de amplificación de ADNc de CyP17 y los transcritos de CyP19 no se encontraron en ninguna de ellas.

Los juegos de oligonucleótidos diseñados fueron comparados contra el genoma completo de *Bos Taurus* utilizando la herramienta **BLAST** disponible *on line*, los cuales demostraron ser específicos para su correspondiente secuencia de ADNc y no presentaron homología contra ninguna otra secuencia contenida en el genoma bovino.

El resultado de la secuenciación para CyP17 demostró que los productos amplificados de 319 pb tuvieron un 100% de homología con la secuencia del gen que codifica la enzima CyP17 de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso NM_174304). Para CyP19, la secuencia correspondiente a la banda de 341 pb tuvo un 100% de similitud con la secuencia genómica para CyP19 de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso BTCYP19). Los resultados obtenidos mediante **BLASTn** se muestran en el Anexo II.

4.3- Análisis de la expresión del gen normalizador

Los amplificados para GAPDH fueron localizados en todas las muestras analizadas con un patrón de expresión constante en todos los grupos estudiados (Figura 18) por lo tanto, la elección de GAPDH como control interno de RT-PCR resultó ser adecuada en el presente trabajo de Tesis. La secuencia correspondiente a la banda de 103 pb tuvo un 100% de similitud con la secuencia del gen que codifica para GAPDH de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso BC102589) (Anexo II).

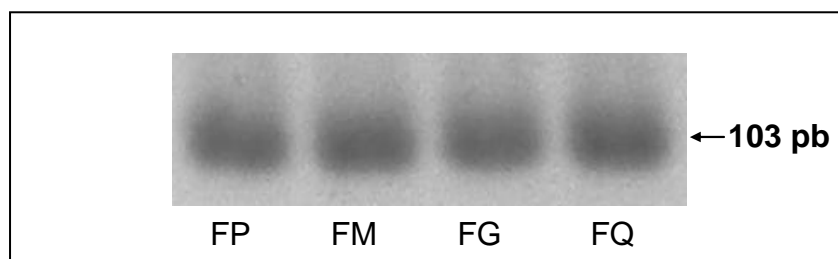


Figura 18: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR de GAPDH. Los amplificados de GAPDH fueron localizados en todas las muestras analizadas de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. A la derecha se indica el tamaño en pares de bases (pb) de los productos de PCR de GAPDH.

4.4- Evaluación de los patrones de expresión de los receptores hormonales en estructuras foliculares

4.4.1- Receptores de hormonas gonadotróficas

4.4.1.1- Receptor de FSH

4.4.1.1.1- Expresión del ARNm del RFSH por PCR de punto final

Los niveles del ARNm del RFSH fueron evaluados en folículos antrales pequeños, medianos, grandes de animales sanos y folículos quísticos de animales con COD espontánea. Todas las muestras de ovario analizadas fueron recolectadas en la playa de faena. Se encontró expresión del RFSH solo en la granulosa de los folículos antrales controles y quistes (Figura 19). La secuencia correspondiente al producto de PCR mostró una similitud del 100% con la secuencia genómica para RFSH de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso L22319) (Anexo II).

La semicuantificación por PCR del ARNm del RFSH evidenció una disminución significativa en quistes espontáneos respecto a los folículos antrales controles ($p < 0,05$) (Figura 20).

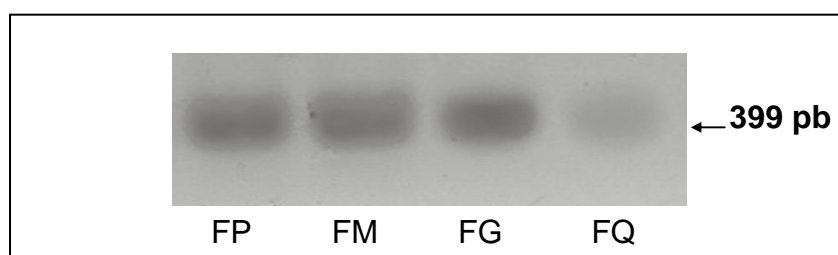


Figura 19: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR del RFSH. Los amplificados del RFSH fueron localizados solo en las células de la granulosa de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. A la derecha se indica el tamaño en pares de bases (pb) de los productos de PCR de RFSH.

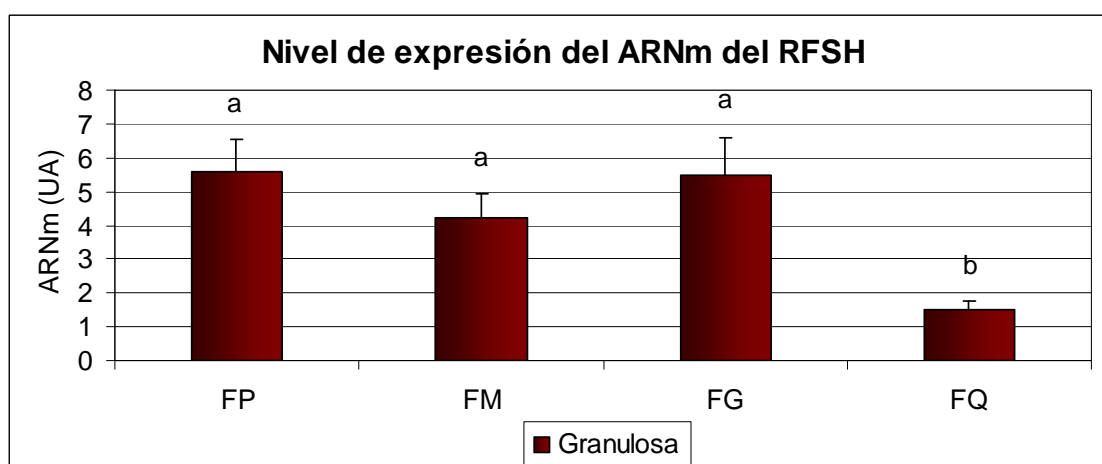


Figura 20: Semicuantificación del ARNm del RFSH en estructuras foliculares bovinas. Solo se observa expresión del ARNm del RFSH en células de la granulosa de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. Las barras representan los valores medios de la densidad óptica integrada (DOI) para RFSH en relación a GAPDH (UA) \pm el error estándar medio (SEM). Letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.4.1.2- Receptor de LH

4.4.1.2.1- Expresión del ARNm del RLH por PCR de punto final

Los ADNc utilizados para la evaluación de los niveles del ARNm fueron generados a partir de folículos antrales pequeños, medianos, grandes de animales sanos y folículos

quísticos de animales con COD espontánea. Todas las muestras de ovario fueron recolectadas en la playa de faena.

Mediante PCR se obtuvo un producto de 133 pb, correspondiente con la longitud esperada del fragmento amplificado del RLH (Figura 21). La secuencia correspondiente a la banda de 133 pb tuvo un 100% de similitud con la secuencia del gen que codifica para RLH de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso AF491303) (Anexo II).

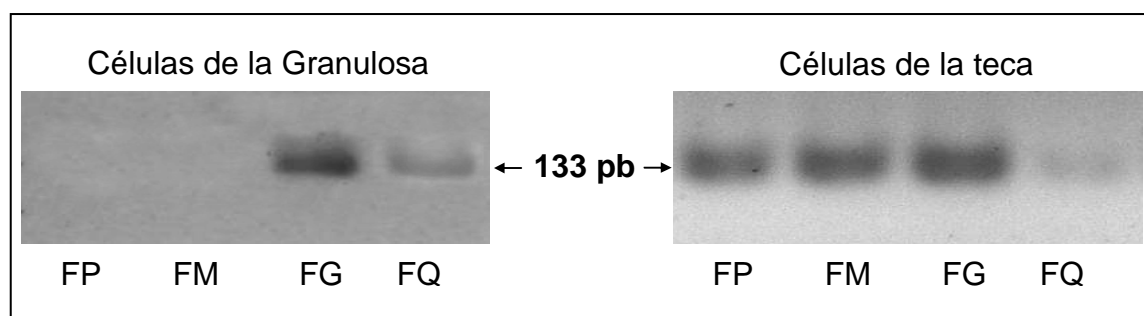


Figura 21: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR del RLH. Los amplificados del RLH fueron localizados en las células de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. Solo se detectaron bandas en las células de la granulosa de los FG y FQ. En el centro se indica el tamaño en pares de bases (pb) de los productos de PCR de RLH.

La expresión del ARNm del RLH se observó en las células de la teca de todas las categorías foliculares analizadas y solo en folículos antrales grandes y folículos quísticos en la capa de la granulosa. Los resultados demuestran una disminución significativa en la expresión del RLH ($p < 0,05$) en los folículos quísticos en ambos estratos celulares. La Figura 22 muestra los niveles de expresión del RLH en células de la granulosa y de la teca de las distintas estructuras foliculares evaluadas.

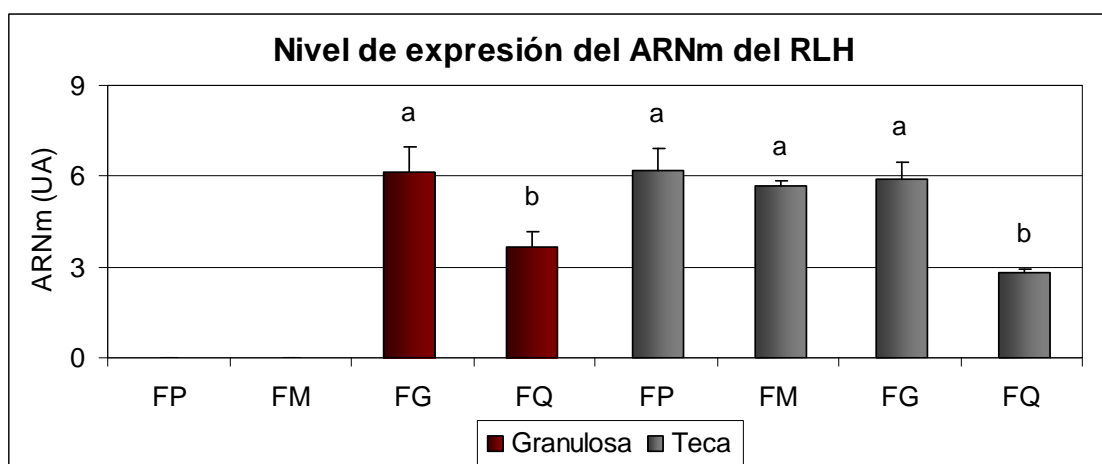


Figura 22: Semicuantificación del ARNm del RLH en estructuras foliculares bovinas. La gráfica muestra el nivel de expresión del ARNm del RLH en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. Las barras representan los valores medios de DOI para RLH en relación a GAPDH (UA) \pm SEM. Las letras muestran diferencias significativas entre las diferentes estructuras foliculares de cada estrato celular ($p < 0,05$).

4.4.2- Receptores de hormonas esteroides

4.4.2.1- Receptor de andrógenos

4.4.2.1.1- Localización y cuantificación de la expresión del RA por Inmunohistoquímica

La expresión proteica del RA se realizó sobre preparados histológicos de ovarios provenientes de animales del grupo control (ver sección 3.1.3) y de animales con quistes foliculares espontáneos obtenidos en frigorífico (ver sección 3.3.3) e inducidos experimentalmente (ver sección 3.1.3). Se observó marcación nuclear en las células de la granulosa y de las tecas (interna y externa) de los folículos en los distintos estadios del desarrollo así como también en los folículos quísticos (Figura 23).

Los resultados obtenidos evidenciaron un incremento significativo en la expresión nuclear del RA en folículos terciarios de animales controles en relación a lo detectado en folículos secundarios, terciarios y quísticos de animales con la enfermedad. No se observaron diferencias significativas en los perfiles de expresión del RA detectados en los folículos primarios y secundarios de ovarios de animales del grupo control con respecto a los ovarios de animales con COD espontánea e inducida experimentalmente (Figura 24).

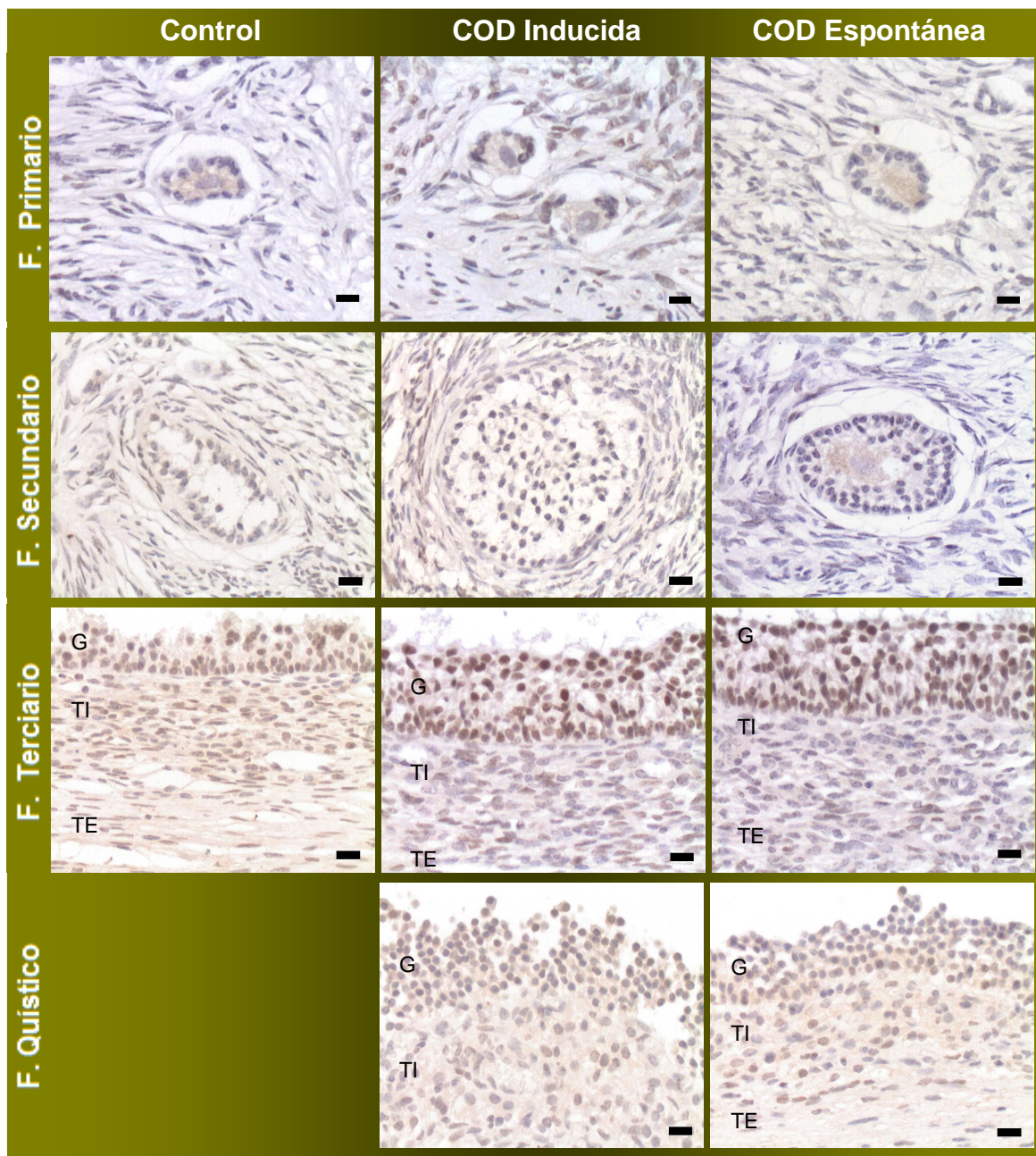


Figura 23: Detección del RA en estructuras foliculares bovinas. Inmunomarcación con anti-RA de la pared folicular de folículos en distintos estadios de desarrollo y de folículos quísticos. Se observa marcación contra RA en los núcleos de las células de la granulosa (G), de la teca interna (TI) y externa (TE). La barra equivale a 40 micras.

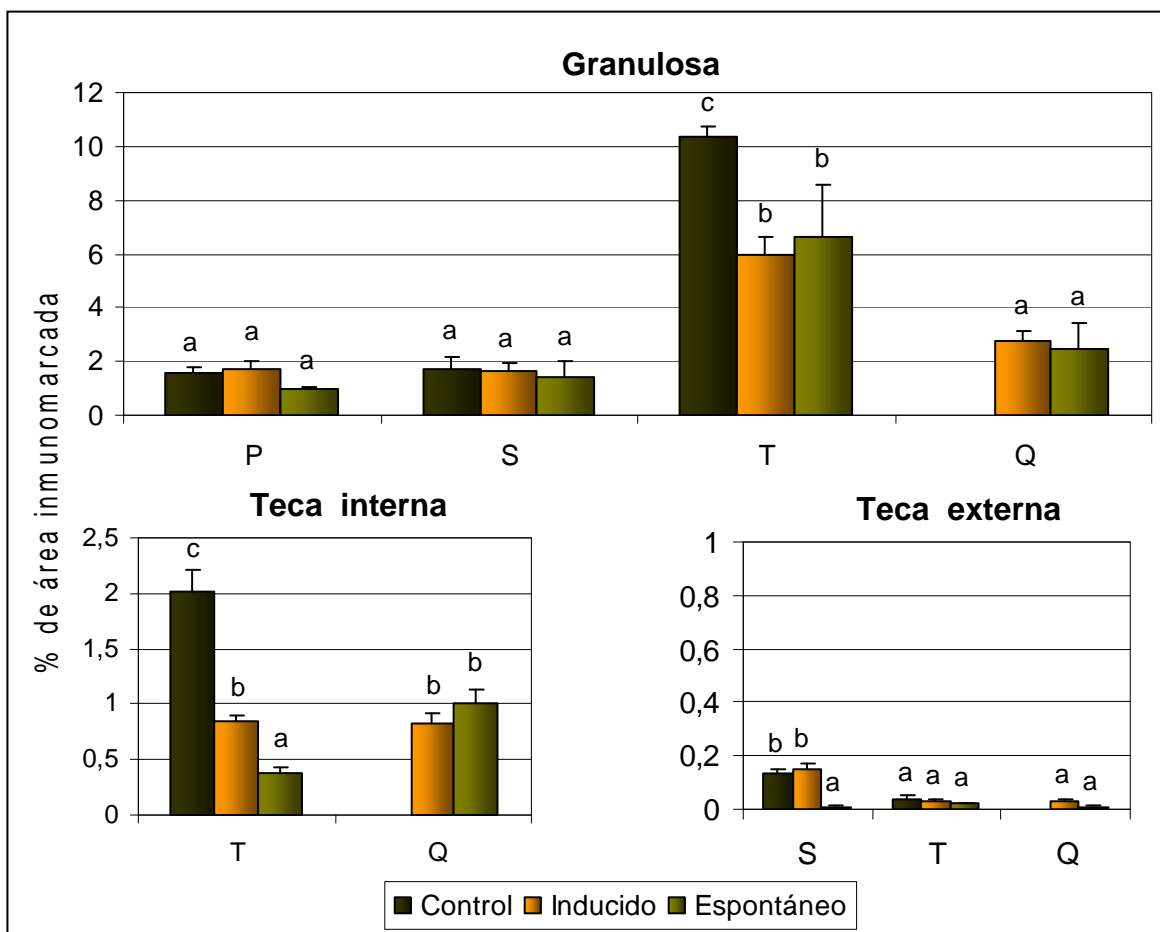


Figura 24: Inmunomarcación del RA en estructuras foliculares bovinas. Las gráficas muestran el porcentaje del área inmunomarcada en células de la granulosa, teca interna y teca externa evaluada en folículos primarios (P), secundarios (S), terciarios (T) y quísticos (Q) de ovarios provenientes de animales del grupo control, con COD inducida experimentalmente (Inducido) y con COD espontánea obtenido de frigorífico (Espontáneo). Las barras representan las medias de los porcentajes del área inmunomarcada \pm SEM. Las letras muestran diferencias significativas entre las diferentes estructuras foliculares de cada estrato celular ($p < 0,05$).

4.4.2.1.2- Determinación de la especificidad del anticuerpo anti-RA

Por medio de la técnica de western blot, se detectaron dos bandas intensamente marcadas en folículos antrales grandes de hembras controles y folículos quísticos de animales con COD espontánea, cuyos pesos moleculares correspondieron a 110 kDa (RA-A) y 87 kDa (RA-B) (Figura 25). La marcación fue altamente específica sin detectar reacción cruzada con otras proteínas bajo las condiciones establecidas en el ensayo. No se

observó detección alguna al reemplazar el anticuerpo primario por TBS-T-leche 3% o buffer de bloqueo.

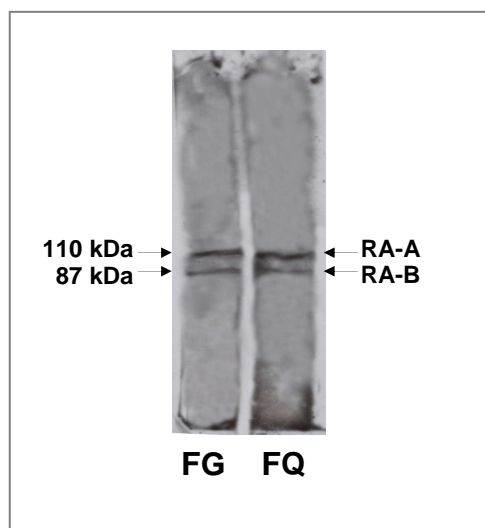


Figura 25: Especificidad del anticuerpo anti-RA en estructuras foliculares bovinas. Detección específica de dos bandas, cuyos pesos moleculares corresponden a RA-A de 110 kDa y a RA-B de 87 kDa, en la pared folicular de folículos antrales grandes (FG) de ovarios de animales controles y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. A la derecha se indica la isoforma de la proteína identificada y a la izquierda sus pesos moleculares.

4.4.2.1.3- Expresión del ARNm del RA por PCR de punto final

El patrón de expresión del ARNm del RA se evaluó en muestras de pared completa como así también en células de la granulosa y de la teca, por separado, en folículos pequeños, medianos, grandes de animales controles y folículos quísticos de animales con COD espontánea. Todas las muestras de ovario fueron recolectadas en la playa de faena.

Los amplificados obtenidos por PCR correspondieron a la longitud esperada del fragmento amplificado para RA (Figura 26). La secuencia correspondiente a la banda de 172 pb, tuvo un 100% de similitud con la secuencia genómica para RA de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso AY862875) (Anexo II).

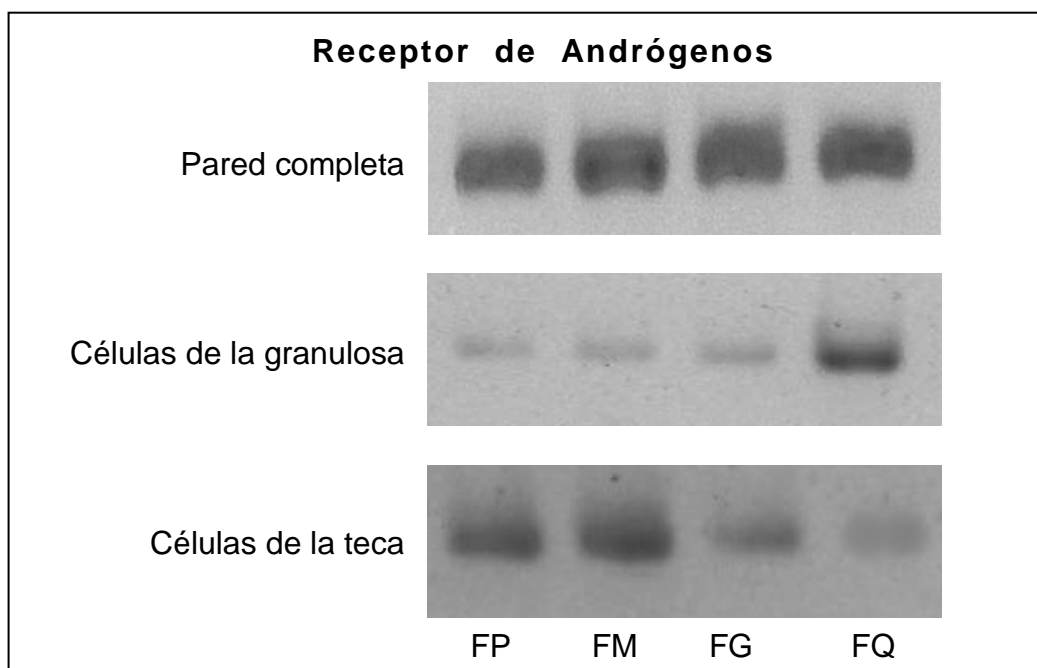


Figura 26: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificadores por PCR del RA. Productos de RT-PCR del RA en todas las muestras analizadas de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) provenientes de ovarios sanos y de folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea.

Los resultados de la semicuantificación obtenidos mostraron que los niveles de expresión del ARNm del RA permanecieron similares en la pared completa de los folículos de todas las categorías estudiadas (Figura 27).

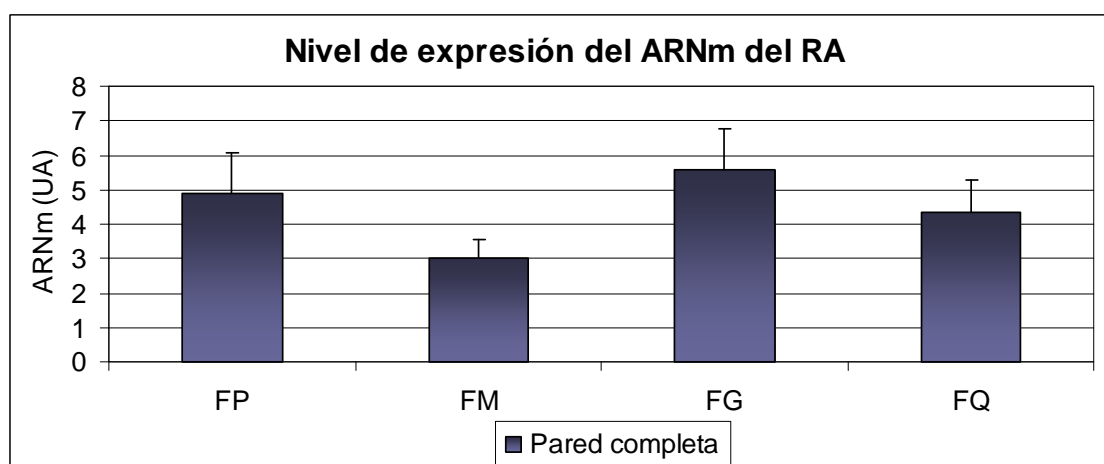


Figura 27: Semicuantificación del ARNm del RA en la pared folicular de ovarios bovinos. La gráfica muestra el nivel de expresión del ARNm del RA en la pared completa de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. Las barras representan los valores medios de DOI para RA en relación a GAPDH (UA) \pm SEM.

Una expresión diferencial del ARNm del RA se observó cuando se analizaron las células de la granulosa y de teca por separado. Los folículos quísticos evidenciaron un nivel de expresión significativamente mayor del ARNm del RA ($p < 0,05$) en células de la granulosa. En células de la teca se detectó una expresión moderada con una disminución significativa ($p < 0,05$) en folículos quísticos en relación a los folículos medianos de ovarios normales (Figura 28).

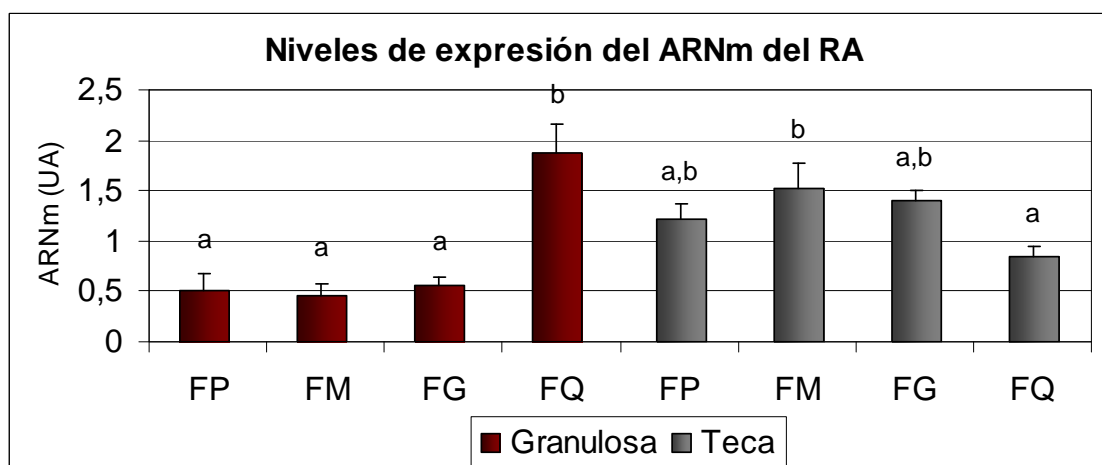


Figura 28: Semicuantificación del ARNm del RA en estructuras foliculares bovinas. La gráfica muestra el nivel de expresión del ARNm del RA en las diferentes capas celulares de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. Las barras representan los valores medios de DOI para RA en relación a GAPDH (UA) \pm SEM. Las letras muestran diferencias significativas entre las diferentes estructuras foliculares de cada estrato celular ($p < 0,05$).

4.4.2.2- Receptores de estrógenos α y β

4.4.2.2.1- Expresión del ARNm de las isoformas del RE por PCR de punto final

Los ADNc de las isoformas α y β del RE se generaron a partir de muestras de estructuras foliculares que presentaron tanto la pared completa como también solo células de la granulosa y de teca. Los niveles de ARNm se evaluaron en folículos antrales pequeños, medianos, grandes de animales controles y folículos quísticos de animales con COD espontánea. Todas las muestras de ovario fueron recolectadas en la playa de faena.

El resultado de la secuenciación para los productos amplificados del RE α denota que la secuencia correspondiente a la banda de 234 pb tuvo un 100% de similitud con la

secuencia del gen que codifica para RE α de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso AY538775). Para RE β , la secuencia correspondiente a la banda de 241 pb tuvo un 100% de similitud con la secuencia genómica para RE β de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso NM_174051). Los resultados obtenidos mediante **BLASTn** se muestran en el Anexo II.

La expresión del ARNm fue detectada en todas las estructuras foliculares analizadas (Figura 29). El nivel de expresión del ARNm del RE α en folículos quísticos mostró una tendencia a disminuir con respecto a los folículos antrales grandes de ovarios de animales controles ($p < 0.10$). En la pared completa de folículos quísticos el nivel de expresión del RE β fue significativamente menor ($p < 0,05$) en comparación a los folículos pequeños (Figura 30).

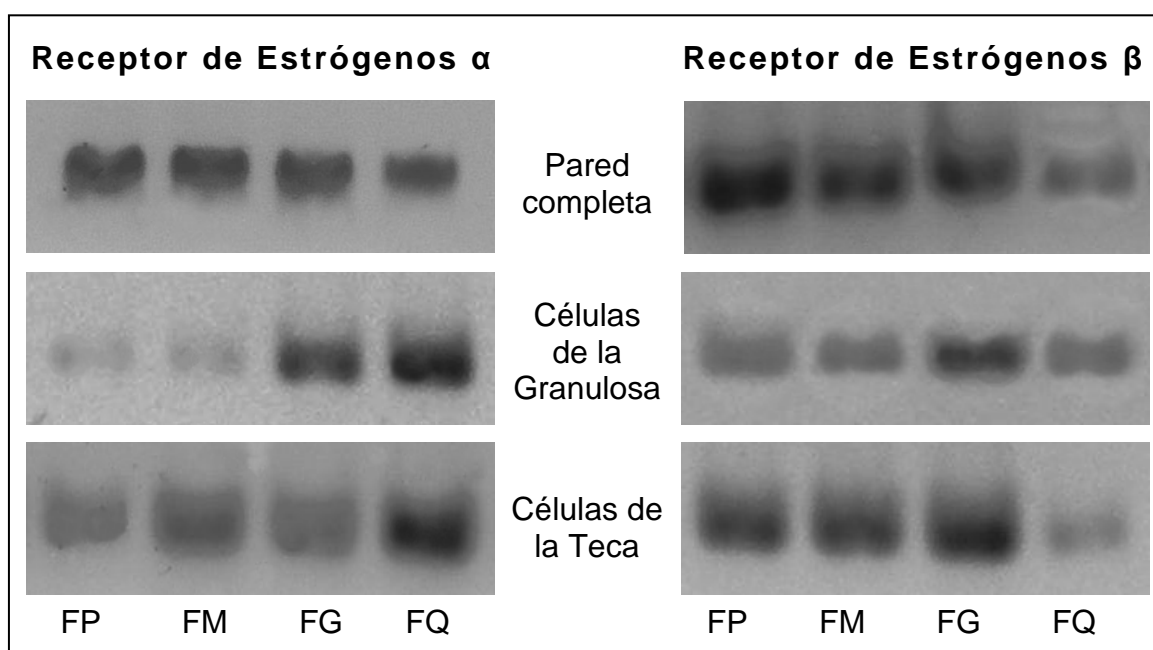


Figura 29: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR de las isoformas del RE. Productos de RT-PCR de las isoformas del RE en todas las muestras analizadas de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea.

Se detectó una expresión débil del RE α en células de la granulosa y de teca de folículos antrales pequeños y medianos, aumentando de manera significativa en la granulosa de folículos grandes ($p < 0,05$). En células de la granulosa y de la teca los

folículos quísticos mostraron una expresión de los transcritos del $RE\alpha$ significativamente mayor en comparación a los resultados obtenidos en las distintas categorías de los folículos sanos ($p < 0,05$).

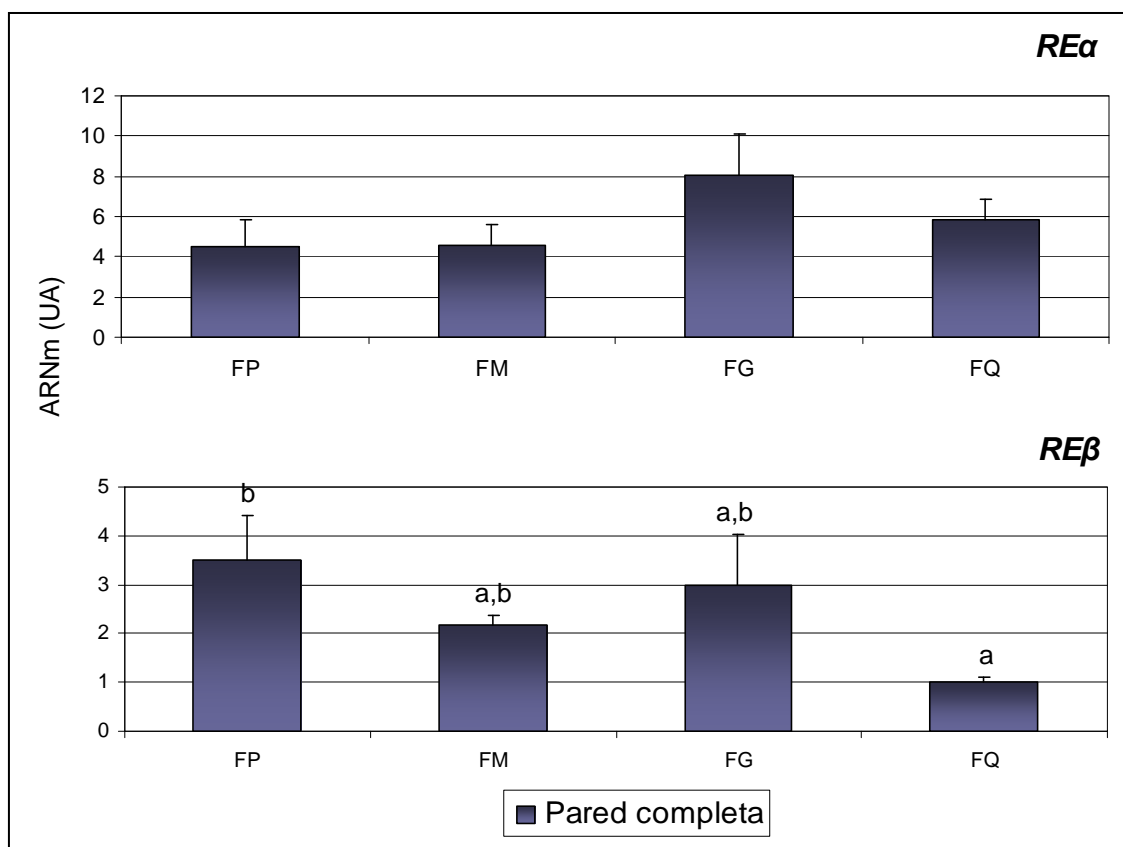


Figura 30: Semicuantificación del ARNm de las isoformas del RE en la pared folicular de ovarios bovinos. Las gráficas muestran el nivel de expresión del ARNm de ambas isoformas del RE en la pared completa de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. Las barras representan los valores medios de DOI de las distintas isoformas del RE en relación a GAPDH (UA) \pm SEM. Letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0,05$).

En las células de la granulosa de folículos antrales grandes se observó un aumento significativo en la expresión del $RE\beta$ en comparación a las otras categorías foliculares estudiadas, mientras que se evidenció una disminución estadísticamente significativa en la expresión de este receptor en las células de la teca de los folículos quísticos ($p < 0,05$). Los resultados del patrón de expresión del ARNm de ambas isoformas del RE en las diferentes capas celulares se muestran en la Figura 31.

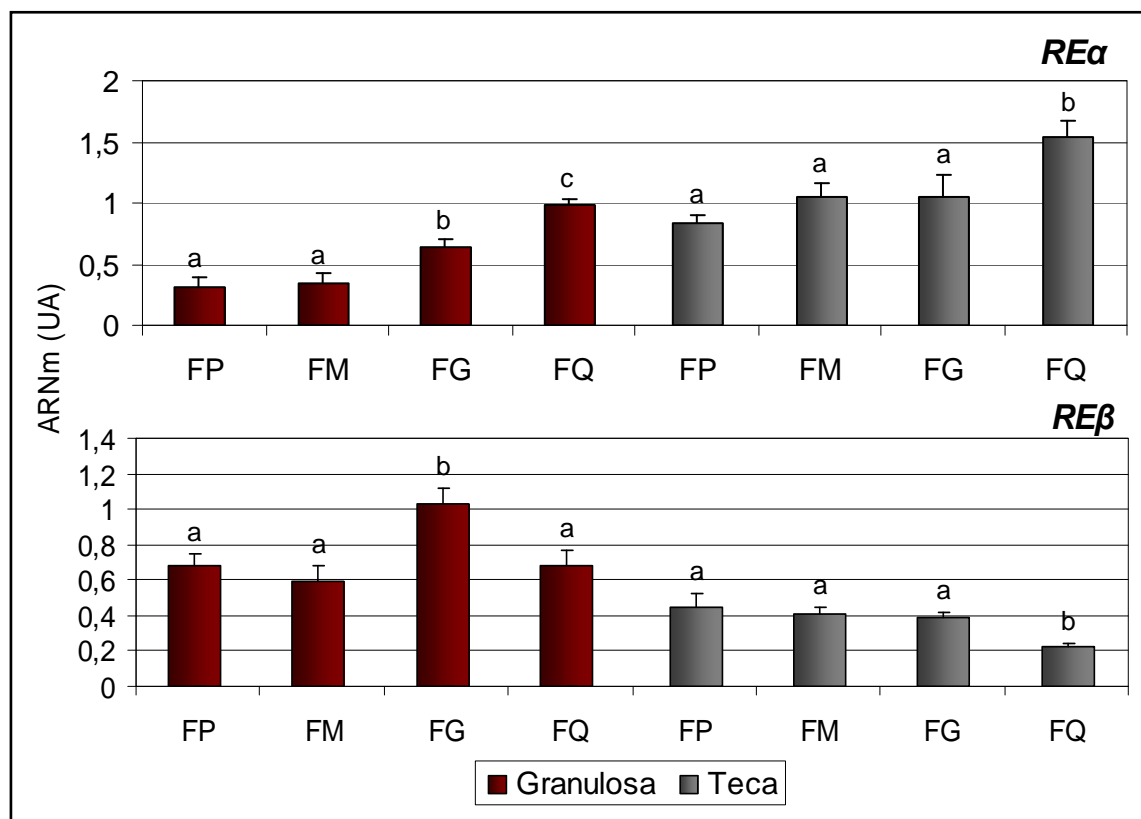


Figura 31: Semicuantificación del ARNm de las isoformas del RE en estructuras foliculares bovinas. La gráfica muestra el nivel de expresión del ARNm de las isoformas α y β del RE en las diferentes capas celulares de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. Las barras representan los valores medios de DOI de las distintas isoformas del RE en relación a GAPDH (UA) \pm SEM. Las letras muestran diferencias significativas entre las diferentes estructuras foliculares de cada estrato celular ($p < 0,05$).

4.4.2.3- Receptor de progesterona y sus isoformas

4.4.2.3.1- Expresión del ARNm de las isoformas del RP por PCR de punto final.

La expresión de la región E del RP se determinó mediante el uso de los oligonucleótidos *RPtotal*. La semicuantificación por RT-PCR se evaluó en muestras de pared completa como así también en muestras de células de la granulosa y de la teca, por separado, de las distintas categorías foliculares estudiadas. Los productos de PCR mostraron bandas con la longitud correspondiente al tamaño esperado del fragmento amplificado con el juego de oligonucleótidos *RPtotal* (Figura 32). La secuencia

correspondiente a la banda de 360 pb, tuvo un 100% de similitud con la secuencia genómica para RP de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso XM_583951) (Anexo II).

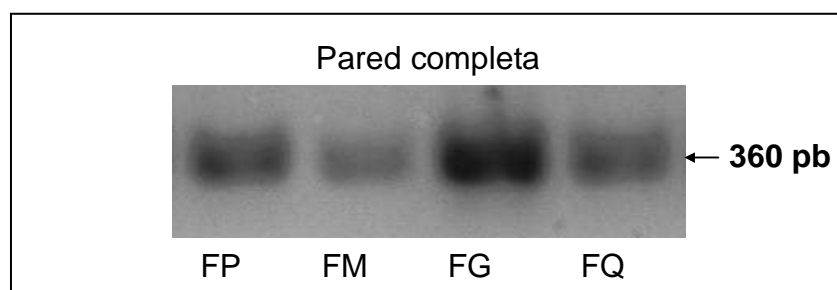


Figura 32: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificadores del RP en la pared folicular de ovarios bovinos. Los amplificadores de la región E del RP fueron localizados en la pared completa de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. A la derecha se indica el tamaño en pares de bases (pb) de los productos de PCR obtenidos con *RPtotal*.

Los resultados de la semicuantificación en muestras de pared completa de muestras de ovario de animales provenientes de frigorífico mostraron un aumento significativo ($p < 0,05$) en la expresión del ARNm que codifica para las tres isoformas del RP en los folículos antrales grandes con respecto a los medianos. Los folículos quísticos tuvieron un comportamiento similar a los folículos antrales pequeños sin diferencias significativas con las otras categorías (Figura 33).

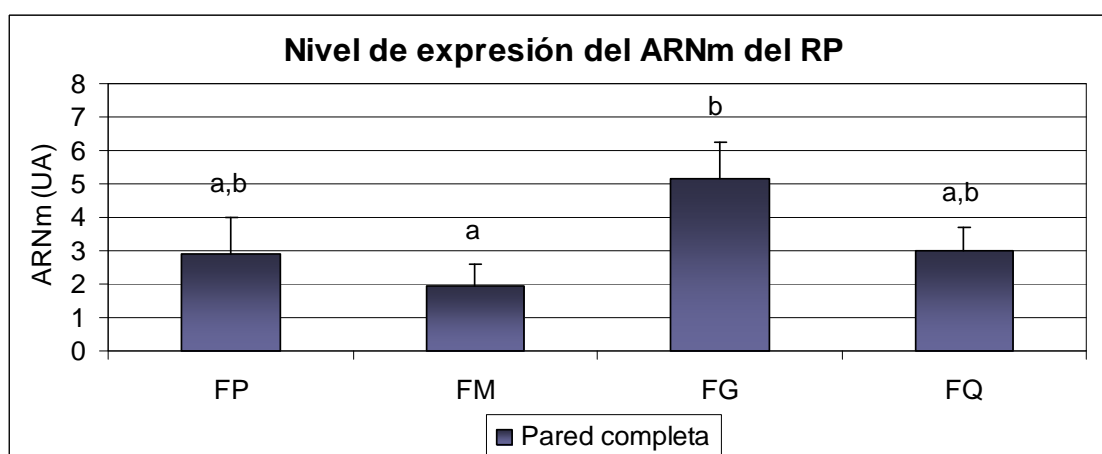


Figura 33: Semicuantificación del ARNm del RP en la pared folicular de ovarios bovinos. La gráfica muestra el nivel de expresión del ARNm de la región E del RP, utilizando *RPtotal*, en la pared completa de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. Las barras representan los valores medios de DOI para RP en relación a GAPDH (UA) \pm SEM. Letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Conociendo que el contenido de las isoformas del RP, así como su regulación varían en los tejidos reproductivos como consecuencia del desarrollo, del estado hormonal y de la carcinogénesis, utilizamos RT-PCR para determinar el patrón de expresión de las isoformas del RP en células de la granulosa y de la teca de las distintas categorías de folículos antrales sanos y también en folículos quísticos de animales con COD espontánea. Todas las muestras de ovario fueron recolectadas en la playa de faena.

Se observó la expresión diferencial de las isoformas del RP obteniéndose bandas correspondientes al tamaño del fragmento esperado de los productos amplificados por PCR (Figura 34). Para confirmar la identidad de las bandas los productos de amplificación obtenidos en las PCR fueron secuenciados.

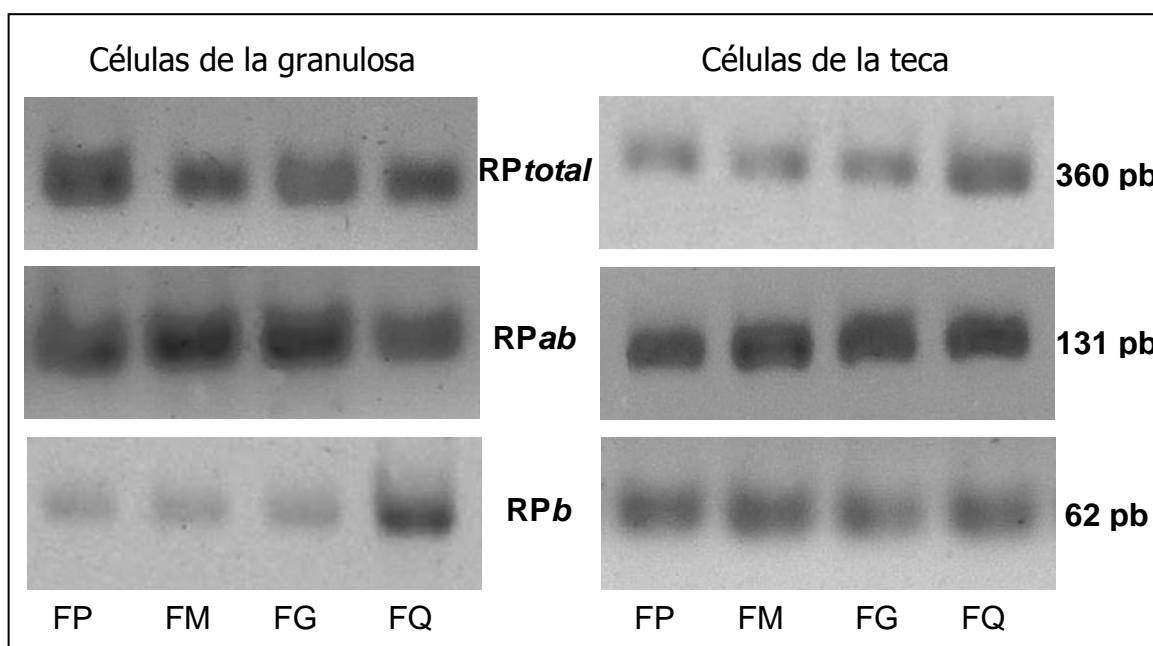
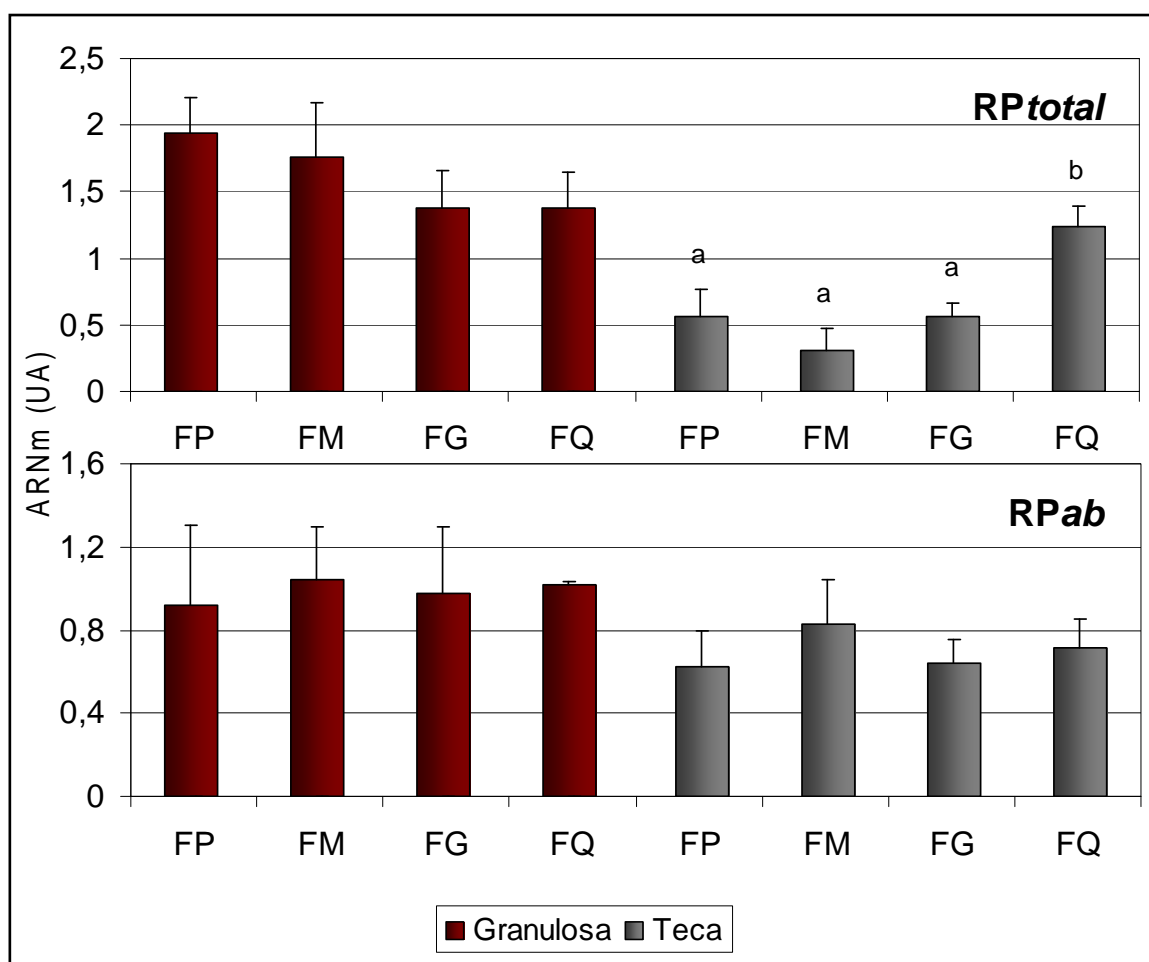


Figura 34: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR de las isoformas del RP en estructuras foliculares bovinas. Los amplificados del RP fueron localizados en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. A la izquierda se indica el tamaño en pares de bases (pb) y en el centro se muestra los oligonucleótidos usados en la identificación de las distintas isoformas del RP.

El resultado de la secuenciación para los productos amplificados obtenidos con el juego de oligonucleótidos *RPtotal*, que abarca todas las isoformas del RP, denota que la secuencia correspondiente a la banda de 360 pb tuvo un 100% de similitud con la

secuencia del gen que codifica para RP de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso XM_583951). Para el juego de oligonucleótidos *RPab* que flanquea una región común de las isoformas RP-A y RP-B, la secuencia correspondiente a la banda de 131 pb tuvo un 100% de similitud con la secuencia genómica para RP de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso XM_583951). Para la banda correspondiente a 62 pb (isoforma RP-B), los resultados de la secuenciación arrojaron un 100% de similitud con la secuencia del gen que codifica para RP de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso XM_583951) (Anexo II).

La expresión de los transcritos de la región E del RP en células de la granulosa demostró una tendencia a disminuir a medida que avanza el desarrollo folicular ($p < 0,10$). Los folículos quísticos mostraron un comportamiento similar a lo hallado en folículos antrales grandes. Un aumento significativo en la expresión del ARNm del RP que contiene las tres isoformas se encontró en las células tecaes de los folículos quísticos ($p < 0,05$).



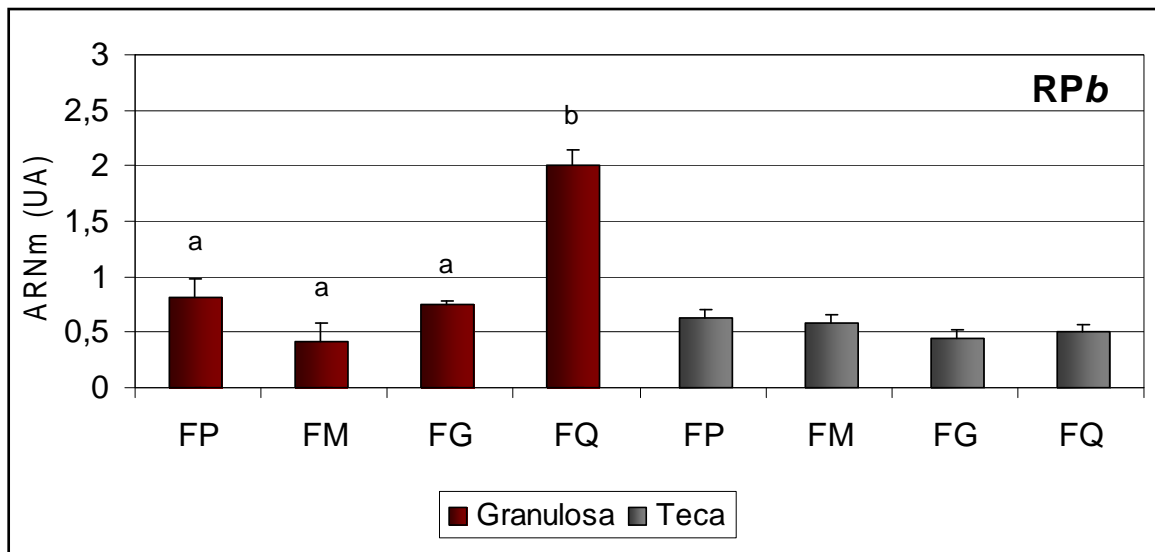


Figura 35: Semicuantificación del ARNm de las isoformas del RP en estructuras foliculares bovinas. La gráfica muestra el nivel de expresión del ARNm de las isoformas del RP en las diferentes capas celulares de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. Las barras representan los valores medios de DOI de las distintas isoformas del RP en relación a GAPDH (UA) \pm SEM. Las letras muestran diferencias significativas entre las diferentes estructuras foliculares de cada estrato celular ($p < 0,05$). **RPtotal**, **RPab**; **RPb**: oligonucleótidos usados para determinar las distintas isoformas del RP.

Los transcritos obtenidos con el juego de oligonucleótidos **RPab** que codifica para una región común de las isoformas A y B del RP revelaron una moderada expresión del ARNm en células de la granulosa y de la teca de todas las estructuras foliculares analizadas. En células de la granulosa y de la teca de animales sanos los niveles del ARNm de la isoforma B del RP no mostraron cambios durante el desarrollo folicular, pero un incremento significativo se encontró en la granulosa de los folículos quísticos ($p < 0,05$). No se observaron diferencias del ARNm de la isoforma RP-B entre las categorías foliculares en células de la teca (Figura 35).

4.5- Evaluación de los patrones de expresión de las proteínas correguladoras en estructuras foliculares

4.5.1- Proteínas coactivadoras

4.5.1.1- Proteína SRC-1

4.5.1.1.1- Expresión del ARNm de SRC-1 por PCR de punto final

Los ADNc utilizados para la evaluación de los niveles del ARNm fueron generados a partir de folículos antrales pequeños, medianos, grandes de animales sanos y folículos quísticos de animales con COD espontánea. Todas las muestras de ovario fueron recolectadas en la playa de faena.

La reacción de PCR de los ADNc obtenidos a partir de folículos ováricos bovinos, usando los oligonucleótidos específicos para este miembro de la familia p160, generaron amplificaciones de 491 pb, correspondiente con la longitud esperada del fragmento amplificado de la proteína coactivadora SRC-1 (Figura 36). La secuencia correspondiente a la banda de 491 pb, tuvo un 100% de similitud con la secuencia genómica para SRC-1 de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso XM_584905) (Anexo II).

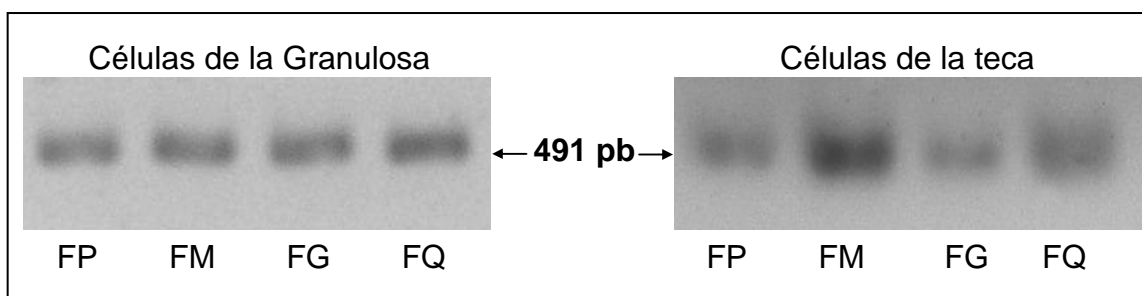


Figura 36: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR de SRC-1. Los amplificados de SRC-1 fueron localizados en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. En el centro se indica el tamaño en pares de bases (pb) de los productos de PCR de SRC-1.

Los niveles del ARNm de SRC-1 en las células de la granulosa permanecieron similares en las diferentes estructuras analizadas. En células tecales la cuantificación por PCR del ARNm de SRC-1 mostró un aumento significativo en los folículos antrales medianos en comparación con las restantes estructuras foliculares controles ($p < 0,05$). En quistes dicho transcripto mostró una tendencia a aumentar ($p < 0,10$) en relación a los folículos antrales pequeños y grandes (Figura 37).

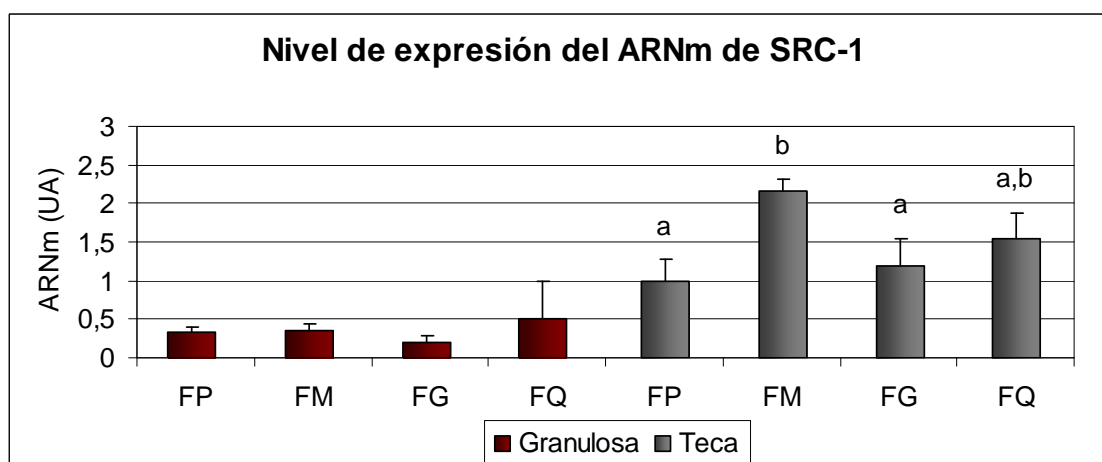


Figura 37: Semicuantificación del ARNm de SRC-1 en estructuras foliculares bovinas. La gráfica muestra el nivel de expresión del ARNm de SRC-1 en folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. Las barras representan los valores medios de DOI para SRC-1 en relación a GAPDH (UA) \pm SEM. Las letras muestran diferencias significativas entre las diferentes estructuras foliculares de cada estrato celular ($p < 0,05$).

4.5.1.2- Proteína SRC-2

4.5.1.2.1- Expresión del ARNm de SRC-2 por PCR de punto final

Para cuantificar el ARNm total de SRC-2 se realizó la técnica de RT-PCR mediante el uso de oligonucleótidos que hibridaron en la región codificante específica para este miembro de la familia de coactivadores p160, comprendida entre las bases 2995-3481. La secuencia correspondiente a la banda de 487 pb, tuvo un 100% de similitud con la secuencia genómica para la proteína coactivadora SRC-2 de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso XM_584905) (Anexo II). La expresión del ARNm de SRC-2 se evaluó en folículos antrales pequeños, medianos, grandes y quísticos provenientes de ovarios obtenidos en frigorífico.

Los niveles de expresión en la capa de células de la granulosa fueron semejantes entre los folículos antrales controles y quísticos, no verificándose diferencias estadísticamente significativas.

En las células de la teca los folículos antrales medianos mostraron un aumento significativo en relación a los folículos antrales pequeños ($p < 0,05$). Los folículos antrales grandes y los folículos quísticos mostraron un patrón de expresión similar de los niveles del ARNm de SRC-2, y una tendencia a aumentar en relación a lo hallado en los folículos

antrales pequeños ($p < 0,10$). Los resultados del perfil de expresión del ARNm de SRC-2 se visualizan en las Figuras 38 y 39.

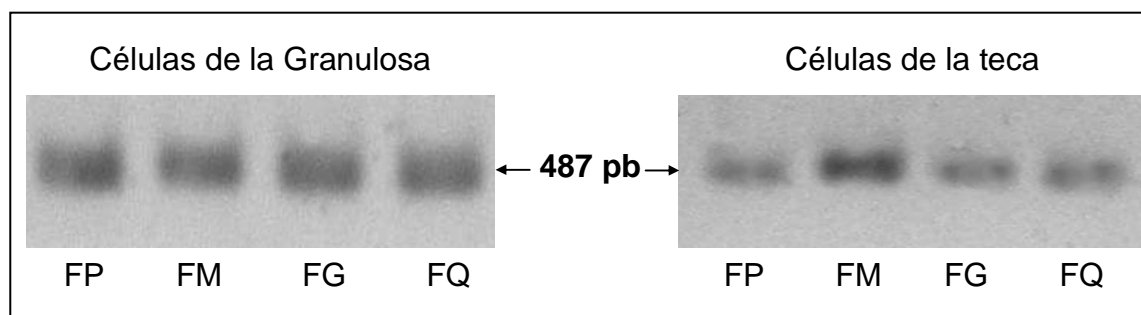


Figura 38: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR de SRC-2. Los amplificados de SRC-2 fueron localizados en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. En el centro se indica el tamaño en pares de bases (pb) de los productos de PCR de SRC-2.

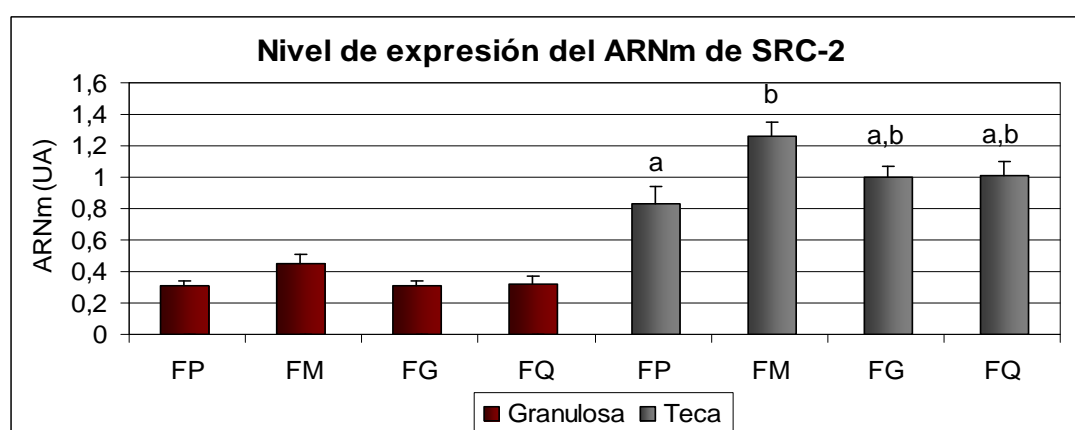


Figura 39: Semicuantificación del ARNm de SRC-2 en estructuras foliculares bovinas. La gráfica muestra el nivel de expresión del ARNm de SRC-2 en folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. Las barras representan los valores medios de DOI para SRC-2 en relación a GAPDH (UA) \pm SEM. Las letras muestran diferencias significativas entre las diferentes estructuras foliculares de cada estrato celular ($p < 0,05$).

4.5.1.3- Proteína SRC-3

4.5.1.3.1- Localización y cuantificación de la expresión de SRC-3 por inmunohistoquímica

La inmunomarcación de SRC-3 fue detectada en el núcleo y citoplasma de las células de la granulosa, teca interna y teca externa en todas las categorías foliculares

estudiadas de ovarios provenientes de animales del grupo control y de animales con quistes foliculares espontáneos obtenidos en frigorífico e inducidos experimentalmente (Figura 40).

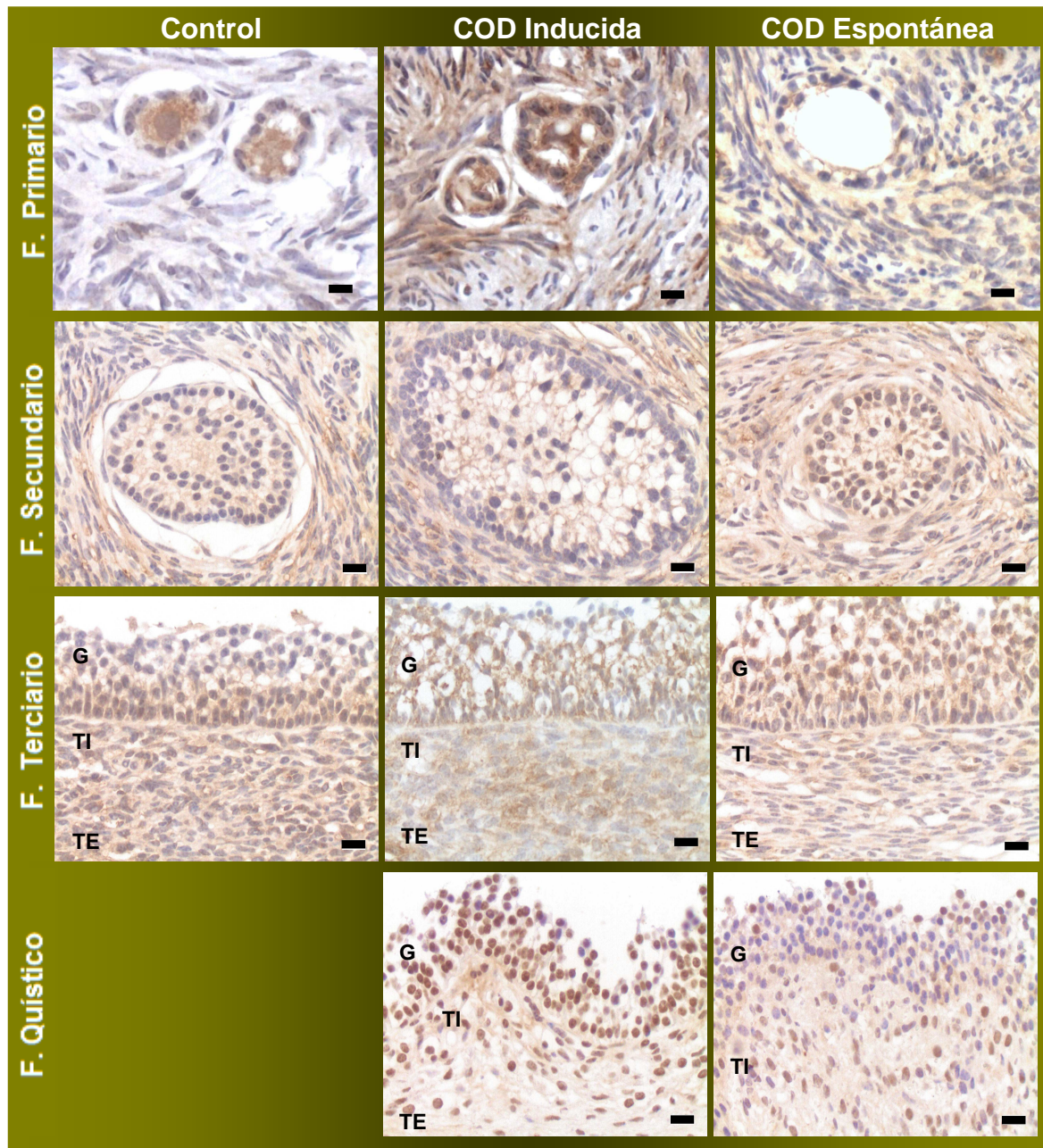


Figura 40: Detección de SRC-3 en estructuras foliculares bovinas. Inmunomarcación con anti-SRC-3 de la pared folicular de folículos en distintos estadios de desarrollo y de folículos quísticos. Se observa marcación contra SRC-3 en el núcleo y citoplasma de las células de la granulosa (G), de la teca interna (TI) y externa (TE). La barra equivale a 40 micras.

El patrón de expresión de SRC-3 fue diferente en los animales controles en comparación a los animales con quistes espontáneos e inducidos, siendo a su vez diferente entre ambos grupos de animales con quistes foliculares. El grupo de animales con COD espontánea presentó un incremento significativo ($p < 0,05$) en la inmunomarcación de SRC-3 en las capas de células de la granulosa de los folículos quísticos. En células tecaales, se evidenció una disminución ($p < 0,05$) en los folículos terciarios y quísticos en relación a la misma categoría folicular de los grupos control y de quistes de animales con COD inducida. En aquellos animales con COD inducida la marcación de SRC-3 en las células de la teca interna de folículos quísticos fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en comparación a los folículos quísticos del grupo de animales con COD espontánea. Los resultados de la inmunomarcación de SRC-3 en los diferentes estratos celulares se muestran en la Figura 41.

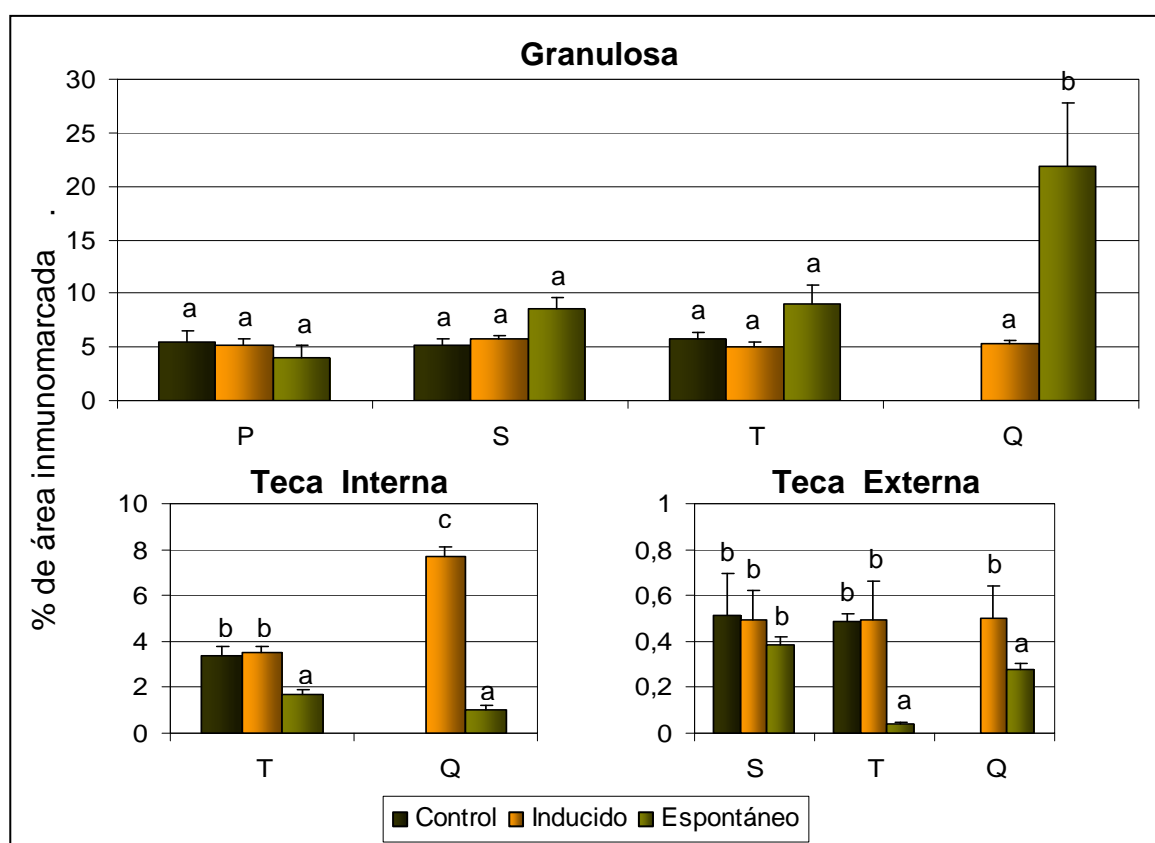


Figura 41: Inmunomarcación de SRC-3 en estructuras foliculares bovinas. Las gráficas muestran el porcentaje del área inmunomarcada en células de la granulosa, teca interna y teca externa evaluada en folículos primarios (P), secundarios (S), terciarios (T) y quísticos (Q) de ovarios provenientes de animales del grupo control, con COD inducida experimentalmente (Inducido) y con COD espontánea obtenido de frigorífico (Espontáneo). Las barras representan las medias de los porcentajes del área inmunomarcada \pm SEM. Las letras muestran diferencias significativas entre las diferentes estructuras foliculares de cada estrato celular ($p < 0,05$).

4.5.1.3.2- Determinación de la especificidad del anticuerpo anti-SRC-3 por Western Blot

La especificidad del anticuerpo para SRC-3 utilizado en IHQ se corroboró mediante la realización de la técnica de western blot. Se evidenció una banda de 160 kDa en folículos antrales grandes y en folículos quísticos correspondiente al peso molecular esperado para la proteína SRC-3 (Figura 42). La marcación fue altamente específica sin detectar reacción cruzada con otras proteínas bajo las condiciones establecidas en el ensayo. No se observó detección alguna al reemplazar el anticuerpo primario por TBS-T-leche 3% o buffer de bloqueo.

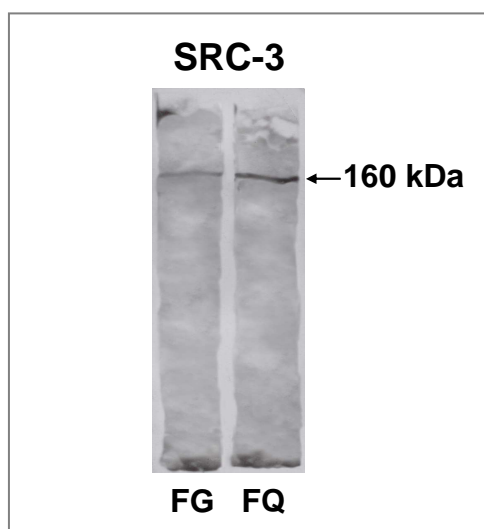


Figura 42: Especificidad del anticuerpo anti-SRC-3 en estructuras foliculares bovinas. Detección específica de la proteína SRC-3 en la pared folicular de folículos antrales grandes (FG) de ovarios de animales controles y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. A la derecha se indica el peso molecular de la proteína identificada.

4.5.1.3.3- Expresión del ARNm de SRC-3 por PCR de punto final

La expresión del ARNm de SRC-3 se evaluó en muestras de células de la granulosa y de la teca, por separado, de las distintas categorías de folículos antrales controles y de folículos quísticos espontáneos provenientes de ovarios obtenidos en frigorífico. Los productos de PCR observados en el gel de agarosa teñidos con gel red mostraron bandas correspondientes con la longitud esperada del fragmento amplificado para SRC-3 (Figura 43). La secuencia correspondiente a la banda de 490 pb, tuvo un 100% de similitud con la secuencia del gen que codifica para SRC-3 de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso XM_602010) (Anexo II). La cuantificación por PCR del ARNm de SRC-3 mostró

que existen diferencias significativas entre los quistes y los folículos antrales controles en células de la granulosa, siendo mayor los niveles de expresión del ARNm de SRC-3 en los quistes foliculares ($p < 0,05$). En teca, los folículos quísticos mostraron una expresión del ARNm significativamente menor ($p < 0,05$) en relación a folículos antrales medianos (Figura 44).

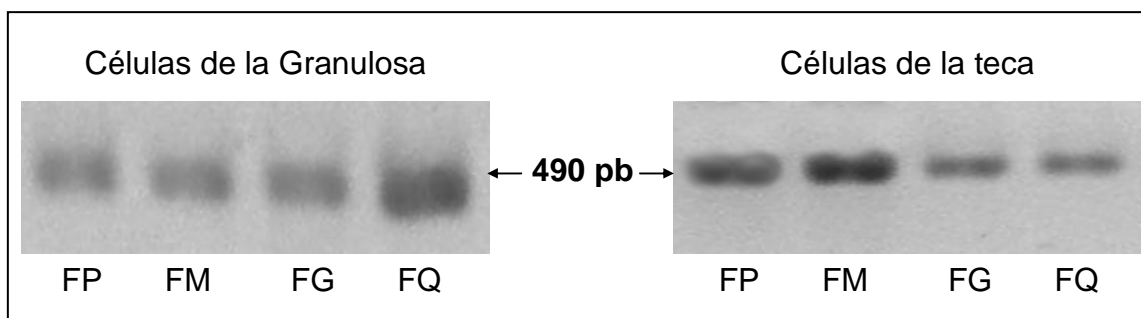


Figura 43: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR de SRC-3. Los amplificados de SRC-3 fueron localizados en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. En el centro se indica el tamaño en pares de bases (pb) de los productos de PCR de SRC-3.

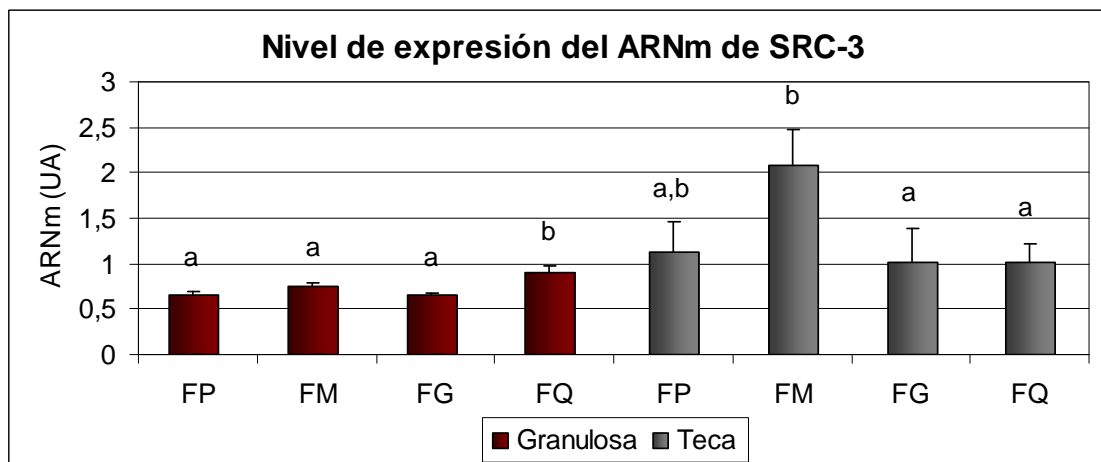


Figura 44: Semicuantificación del ARNm de SRC-3 en estructuras foliculares bovinas. La gráfica muestra el nivel de expresión del ARNm de SRC-3 en folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. Las barras representan los valores medios de DOI para SRC-3 en relación a GAPDH (UA) \pm SEM. Las letras muestran diferencias significativas entre las diferentes estructuras foliculares de cada estrato celular ($p < 0,05$).

4.5.2- Proteínas correpresoras

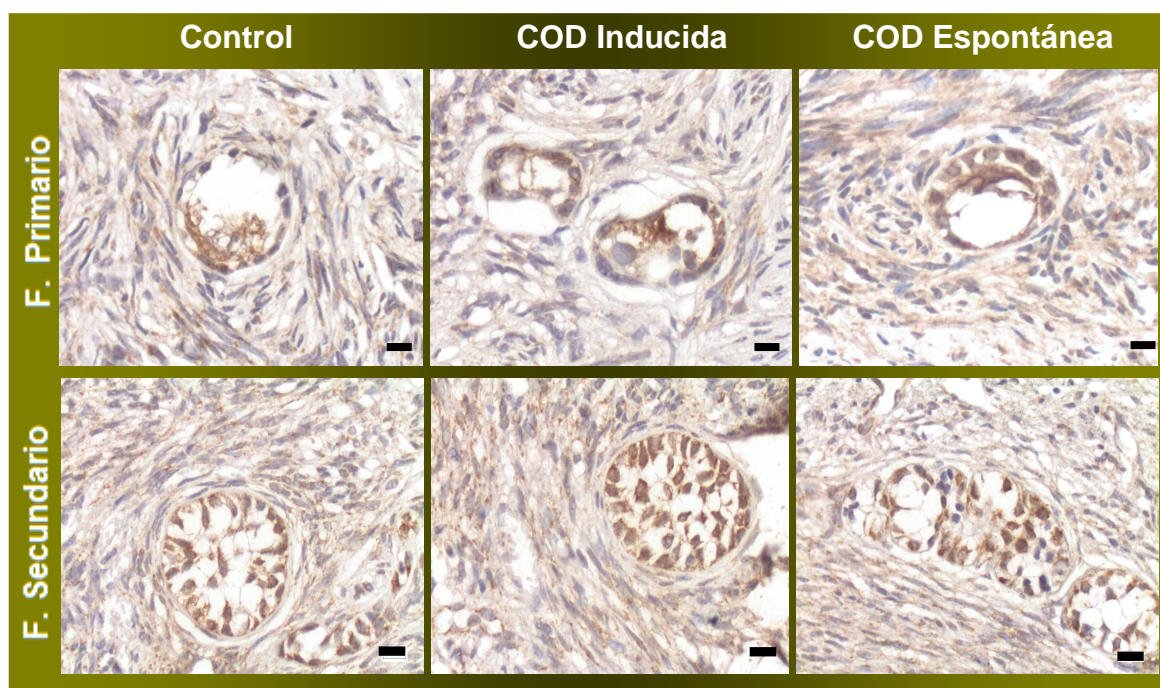
4.5.2.1- Proteínas REA y SMRT

4.5.2.1.1- Localización y cuantificación de la expresión de REA y SMRT por Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica para la detección de las proteínas correpresoras se realizó sobre preparados de tejido ovárico de animales provenientes del grupo control, animales con COD inducida y animales con COD espontánea (material obtenido de frigorífico). Mediante estos ensayos se evaluó la expresión de las proteínas REA y SMRT a lo largo de los distintos estadios del desarrollo folicular y en estructuras quísticas.

4.5.2.1.1.1- Inmunomarcación para REA

Se evaluó la inmunomarcación en las tres capas foliculares: granulosa, teca interna y teca externa de los grupos experimentales estudiados. Con el anticuerpo utilizado se observó marcación nuclear-citoplasmática en las células de la granulosa y de las tecas en los folículos de los distintos grupos de estudio (Figura 45).



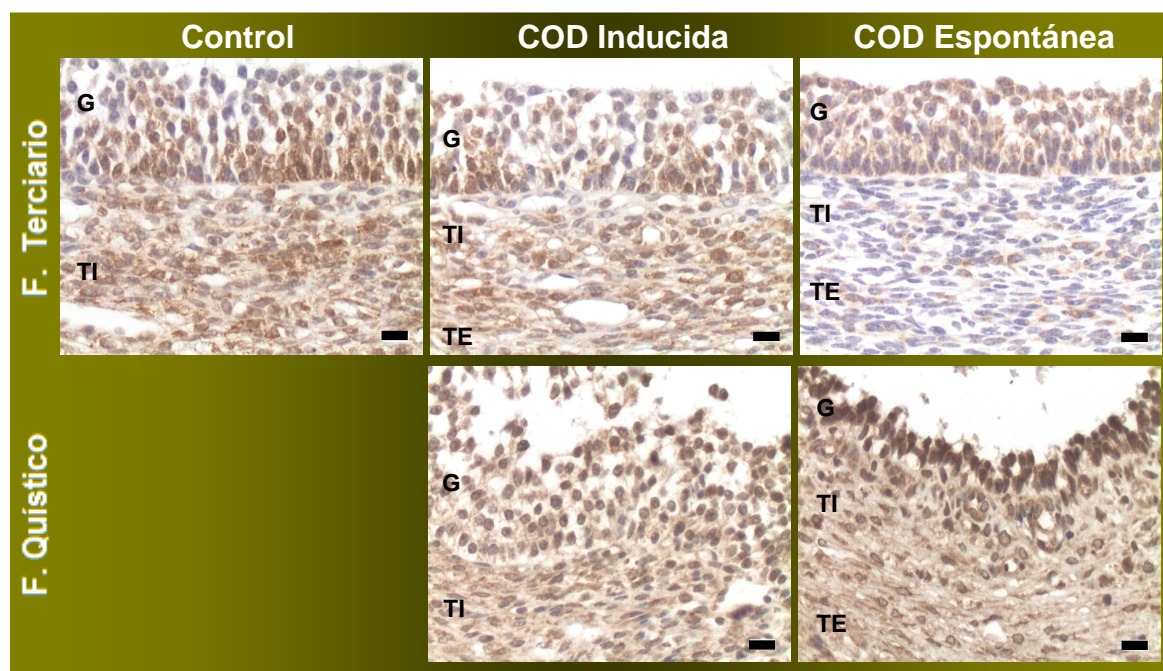
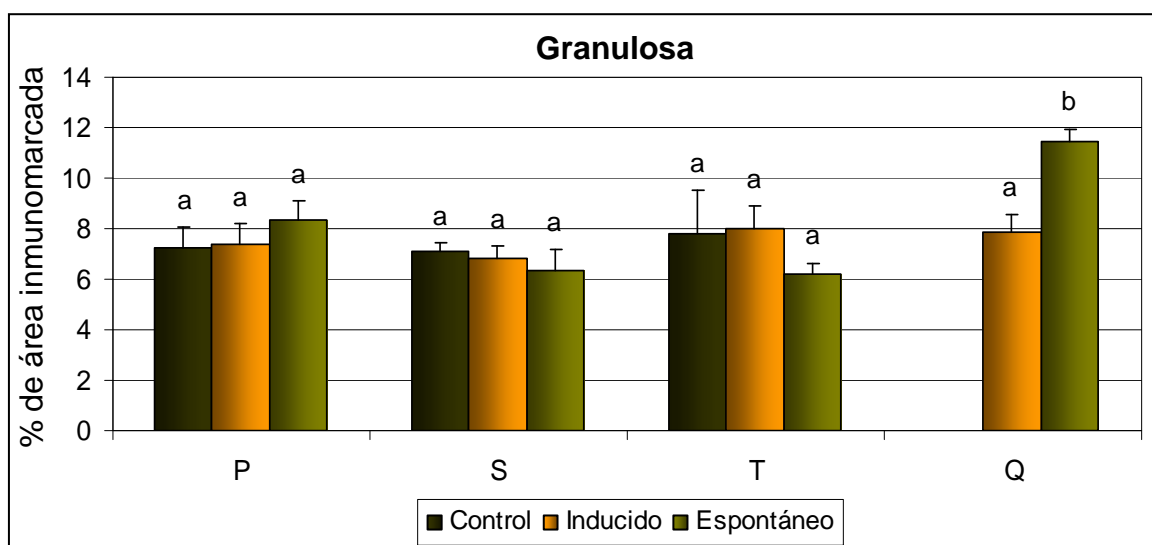


Figura 45: Detección de REA en estructuras foliculares bovinas. Inmunomarcación con anti-REA de la pared folicular de folículos en distintos estadios de desarrollo y de folículos quísticos. Se observa marcación contra REA en los núcleos y en el citoplasma de las células de la granulosa (G), de la teca interna (TI) y externa (TE). La barra equivale a 40 micras.

La expresión de REA se localizó principalmente en la capa granulosa detectándose menor inmunomarcación en la teca interna siendo despreciable su marcación en células de la teca externa. Se halló un aumento significativo en la expresión de REA a nivel de la capa de células de la granulosa en folículos quísticos del grupo de animales con COD espontánea ($p < 0,05$) (Figura 46).



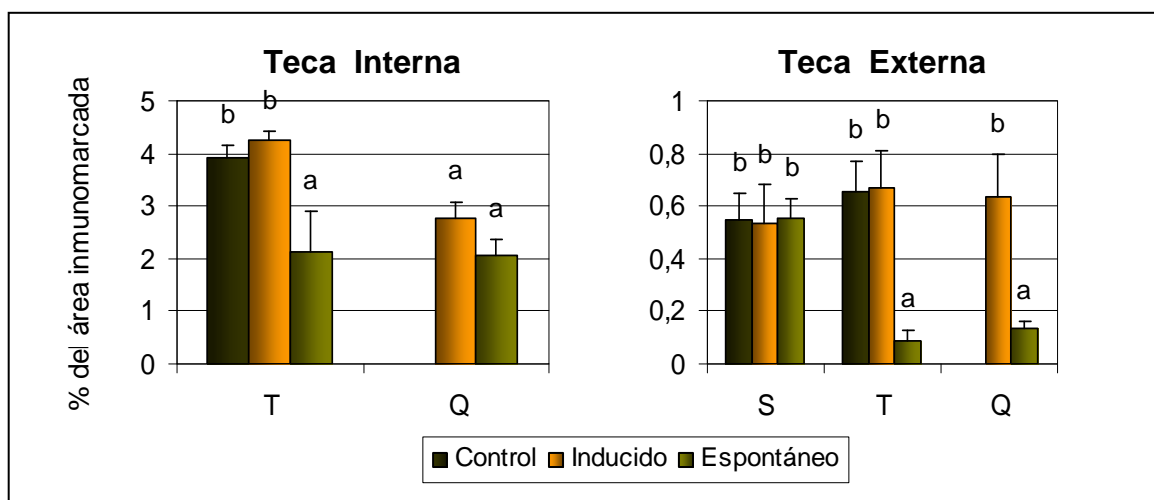


Figura 46: Inmunomarcación de REA en estructuras foliculares bovinas. Las gráficas muestran el porcentaje del área inmunomarcada en células de la granulosa, teca interna y teca externa evaluada en folículos primarios (P), secundarios (S), terciarios (T) y quísticos (Q) de ovarios provenientes de animales del grupo control, con COD inducida experimentalmente (Inducido) y con COD espontánea obtenida de frigorífico (Espontáneo). Las barras representan las medias de los porcentajes del área inmunomarcada \pm SEM. Las letras muestran diferencias significativas entre las diferentes estructuras foliculares de cada estrato celular ($p < 0,05$).

4.5.2.1.1.2- Inmunomarcación para SMRT

Las células inmunomarcadas para SMRT fueron observadas en todas las categorías foliculares estudiadas de los tres grupos estudiados (Figura 47). El SMRT fue detectado en el núcleo y citoplasma de las células de la granulosa, teca interna y teca externa de todos los folículos estudiados. En la capa de la granulosa de los folículos quísticos de animales con COD espontánea se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la expresión de SMRT, contrariamente a lo observado en los folículos quísticos de animales con COD inducida. Este comportamiento opuesto en el grupo de quistes espontáneos en relación al grupo de quistes inducido se demostró en las capas de la teca siendo significativamente menor la inmunomarcación en los folículos quísticos de animales con COD espontánea ($p < 0,05$) (Figura 48).

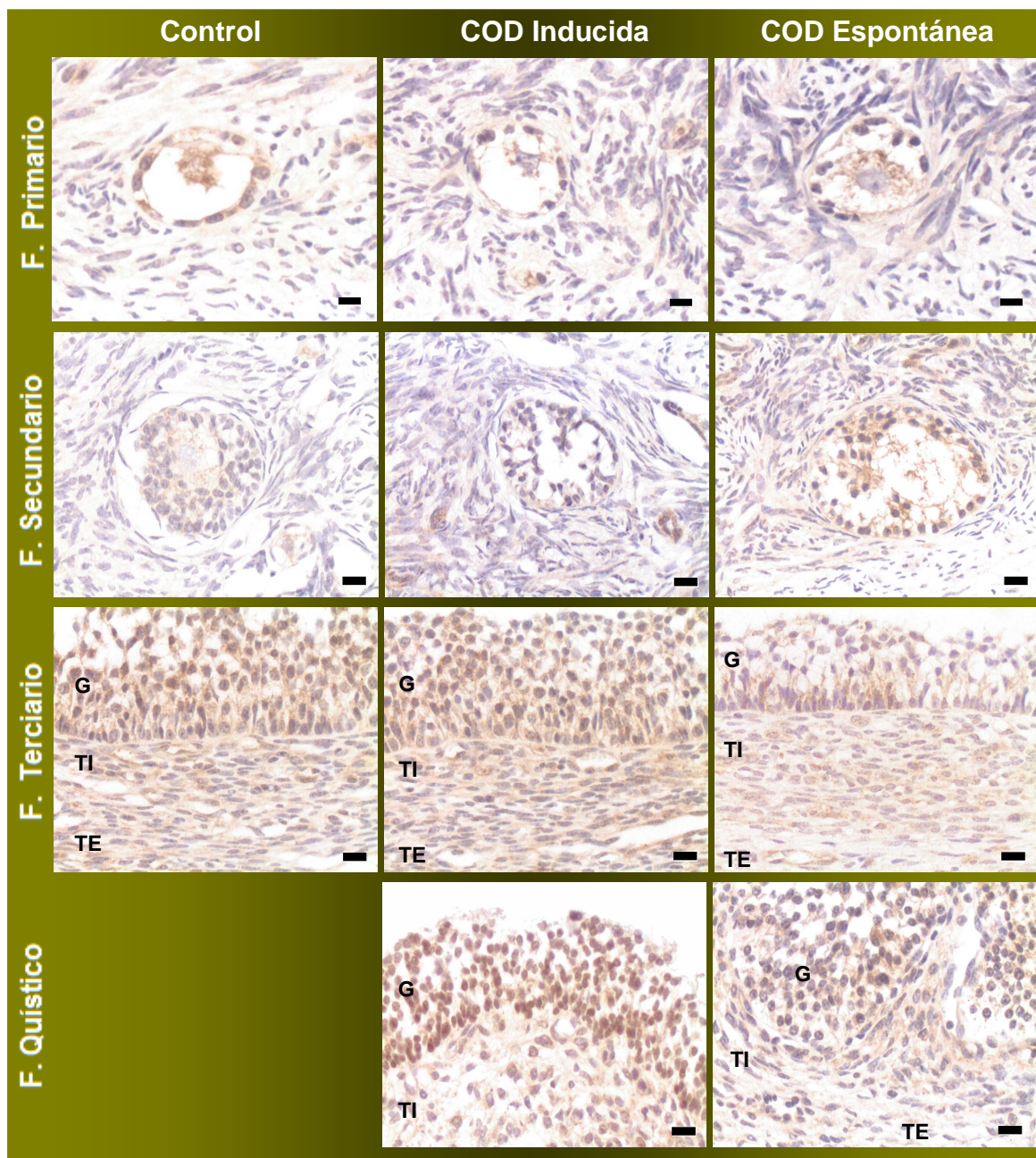


Figura 47: Detección de SMRT en estructuras foliculares bovinas. Inmunomarcación con anti-SMRT de la pared folicular de folículos en distintos estadios de desarrollo y de folículos quísticos. Se observa marcación contra SMRT en el núcleo y citoplasma de las células de la granulosa (G), de la teca interna (TI) y externa (TE). La barra equivale a 40 micras.

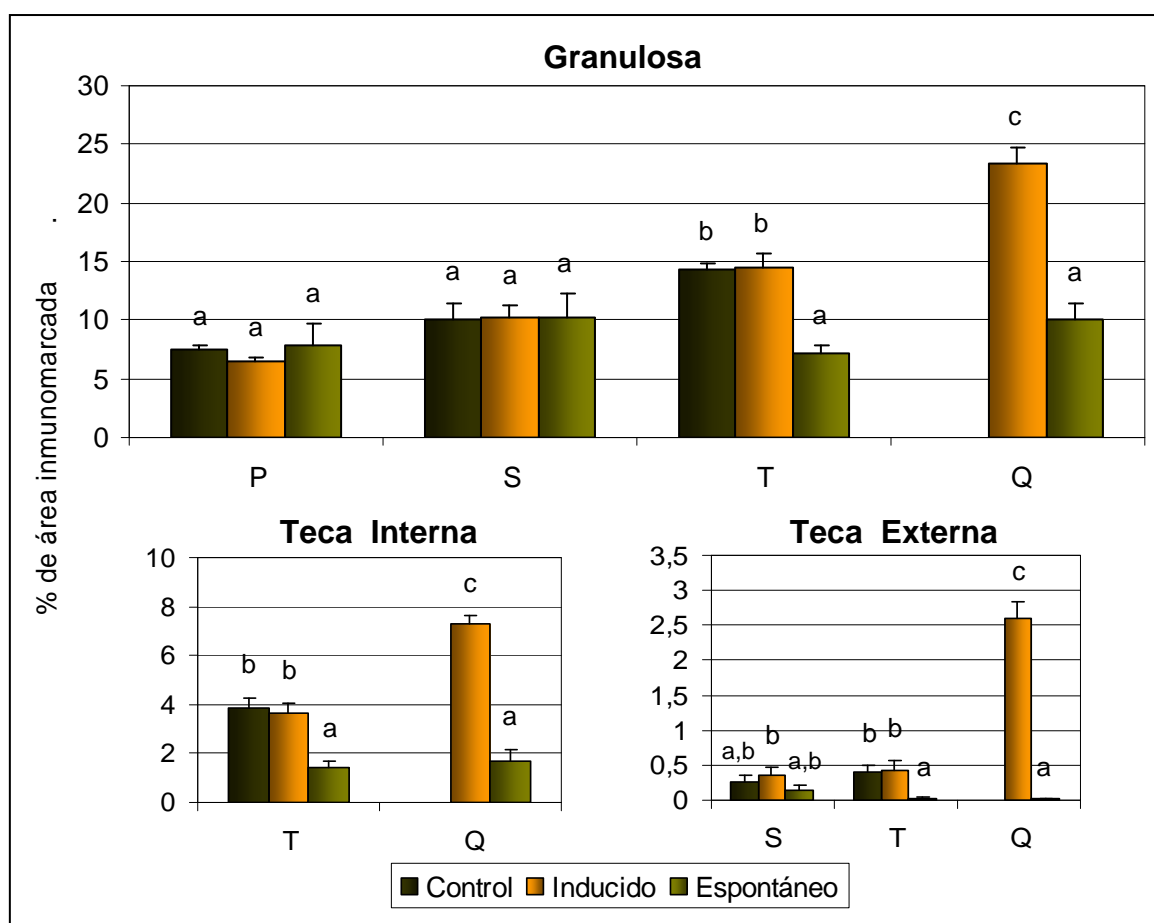


Figura 48: Inmunomarcación de SMRT en estructuras foliculares bovinas. Las gráficas muestran el porcentaje del área inmunomarcada en células de la granulosa, teca interna y teca externa evaluada en folículos primarios (P), secundarios (S), terciarios (T) y quísticos (Q) de ovarios provenientes de animales del grupo control, con COD inducida experimentalmente (Inducido) y con COD espontánea obtenido de frigorífico (Espontáneo). Las barras representan las medias de los porcentajes del área inmunomarcada \pm SEM. Las letras muestran diferencias significativas entre las diferentes estructuras foliculares de cada estrato celular ($p < 0,05$).

4.5.2.1.2- Determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados para detectar proteínas correpressoras mediante Western Blot

La especificidad de los anticuerpos usados para las proteínas correpressoras se determinó mediante la técnica de western blot. La inmunomarcación se realizó en muestras de pared folicular de quistes espontáneos y folículos antrales controles provenientes de material obtenido en frigorífico. La marcación fue altamente específica sin detectar reacción cruzada con otras proteínas bajo las condiciones establecidas en el ensayo. No se

observó detección alguna al reemplazar el anticuerpo primario por TBS-T-leche 3% o buffer de bloqueo. Los resultados se muestran en la Figura 49.

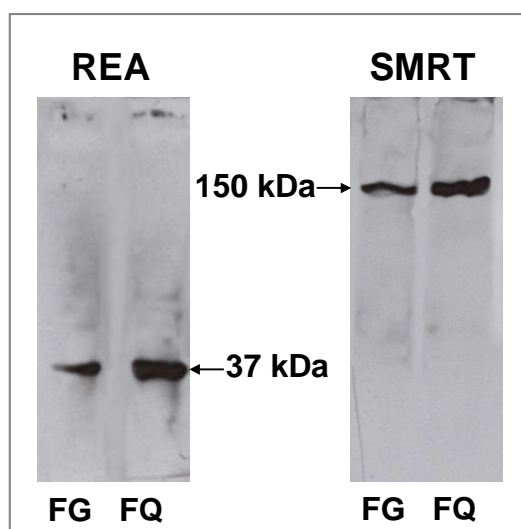


Figura 49: Especificidad de los anticuerpos para las proteínas correpressoras en estructuras foliculares bovinas. Detección específica de las proteínas REA y SMRT en la pared folicular de folículos antrales grandes (FG) de ovarios de animales controles y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. En el centro se indica el peso molecular de la proteína identificada.

4.5.2.2- Proteínas LCoR

4.5.2.2.1- Expresión del ARNm de LCoR por PCR de punto final

Utilizando la técnica de RT-PCR se cuantificó la expresión del ARNm de LCoR en folículos antrales sanos y quistes de animales provenientes de frigorífico. Los productos de PCR evidenciaron bandas de 340 pb, correspondiente con la longitud esperada del fragmento amplificado de LCoR (Figura 50).

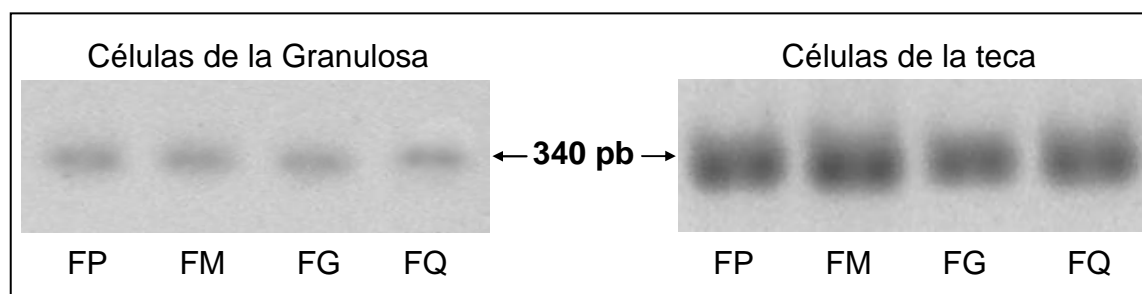


Figura 50: Detección en gel de agarosa 2% de los amplificados por PCR de LCoR. Los amplificados de LCoR fueron localizados en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. En el centro se indica el tamaño en pares de bases (pb) de los productos de PCR de LCoR.

La secuencia correspondiente a la banda de 340, tuvo un 100% de similitud con la secuencia genómica para LCoR de *Bos taurus* presente en GenBank (Nro. Acceso XM_584325) (Anexo II).

Los niveles de expresión no mostraron diferencias en las diferentes estructuras analizadas (Figura 51).

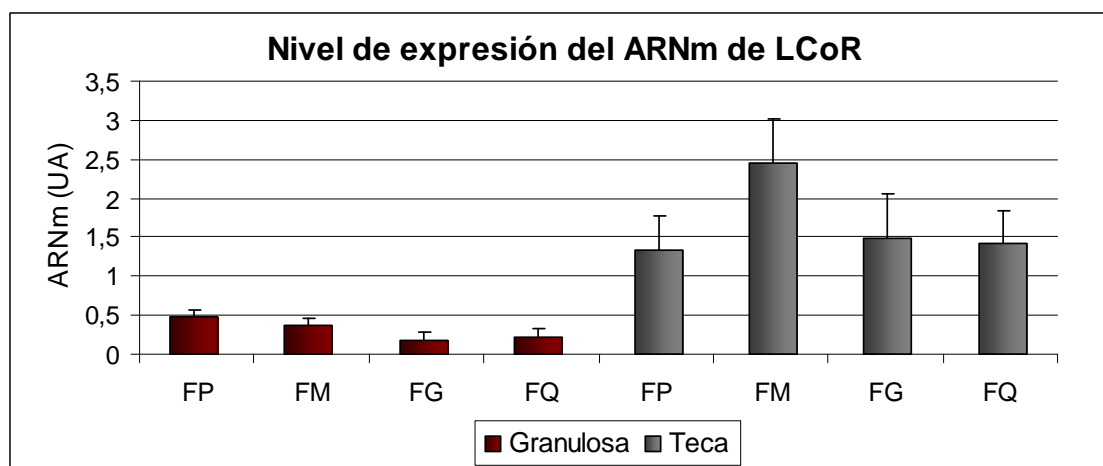


Figura 51: Semicuantificación del ARNm de LCoR en estructuras foliculares bovinas. La gráfica muestra el nivel de expresión del ARNm de LCoR en folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) de ovarios sanos y folículos quísticos (FQ) de ovarios de animales con COD espontánea. Las barras representan los valores medios de DOI para LCoR en relación a GAPDH (UA) \pm SEM.

4.6- Evaluación de la enfermedad quística ovárica en muestras de ovarios de animales con COD espontánea obtenidos a campo

4.6.1- Características observadas en las vacas con COD diagnosticada a campo

La información recibida de varios establecimientos de la zona a cerca de la existencia de animales con COD, permitió que profesionales de nuestro grupo de trabajo realicen la evaluación de los signos y la confirmación por ultrasonografía de la enfermedad. De estos animales en producción, se pudo conocer su condición corporal, la edad, la alimentación que recibieron, el número de pariciones, el tamaño de los quistes, la producción de leche y el estado reproductivo en el que se encontraban. Las características más notables de cada uno de los casos estudiados se presentan en la Tabla 7.

Muestras de casos a campo	Condición corporal	Edad (meses)	Producción de leche	Número de pariciones	Tamaño de los quistes (mm)
<i>Células de la teca</i>					
a	2,5	87	22	4	36,42 x 36,04
b	2,5	89	26	4	53,36 x 24,79
c	3	62	26	2	34,87 x 47,92
e	2,5	72	32,4	3	27 x 21
f	2,5	80	32,6	4	49,6 x 28,4
<i>Células de teca y granulosa</i>					
g	3	60	35,4	2	34 x 27
h	2,5	54	16,2	2	56,48 x 21,91
i	2,5	93	28	5	42,73 x 22,09
j	2,5	64	32,6	3	31 x 29
k	2,5	43	32	1	41,8 x 26,9
l	2,5	84	20	4	29,08 x 27,97
m	3	45	24,4	1	41 x 23
<i>Células de la granulosa</i>					
n	2,5	75	23,4	2	22 x 29

Tabla 7: Características observadas en las vacas quísticas estudiadas, que ponen de manifiesto la gran variabilidad existente en los quistes ováricos.

Los ovarios estudiados presentaban una morfología ovoide, limitados por un borde hiperecogénico constituido por la túnica albugínea. La zona inferior al ovario se caracterizaba por presentar un patrón ecogénico difuso, que se correspondía con la fimbria ovárica. Los folículos quísticos se caracterizaron por su aspecto anecogénico y redondeado que en algunos casos ocupaba la mayor parte del ovario, destacándose en la zona inferior al mismo una banda ecogénica, como consecuencia de la reflexión del eco. Se observaron paredes finas y generalmente bien definidas, si bien en algunos casos se presentaban algo difuminadas. Algunos quistes presentaron delgados septos de separación. Respecto al tamaño quístico, todos los animales presentaron un diámetro superior a 20 mm, siendo un diámetro mayor al ovulatorio para la raza Holando Argentino. En la Figura 52 se muestran fotografías tomadas durante el examen ultrasonográfico de los animales.

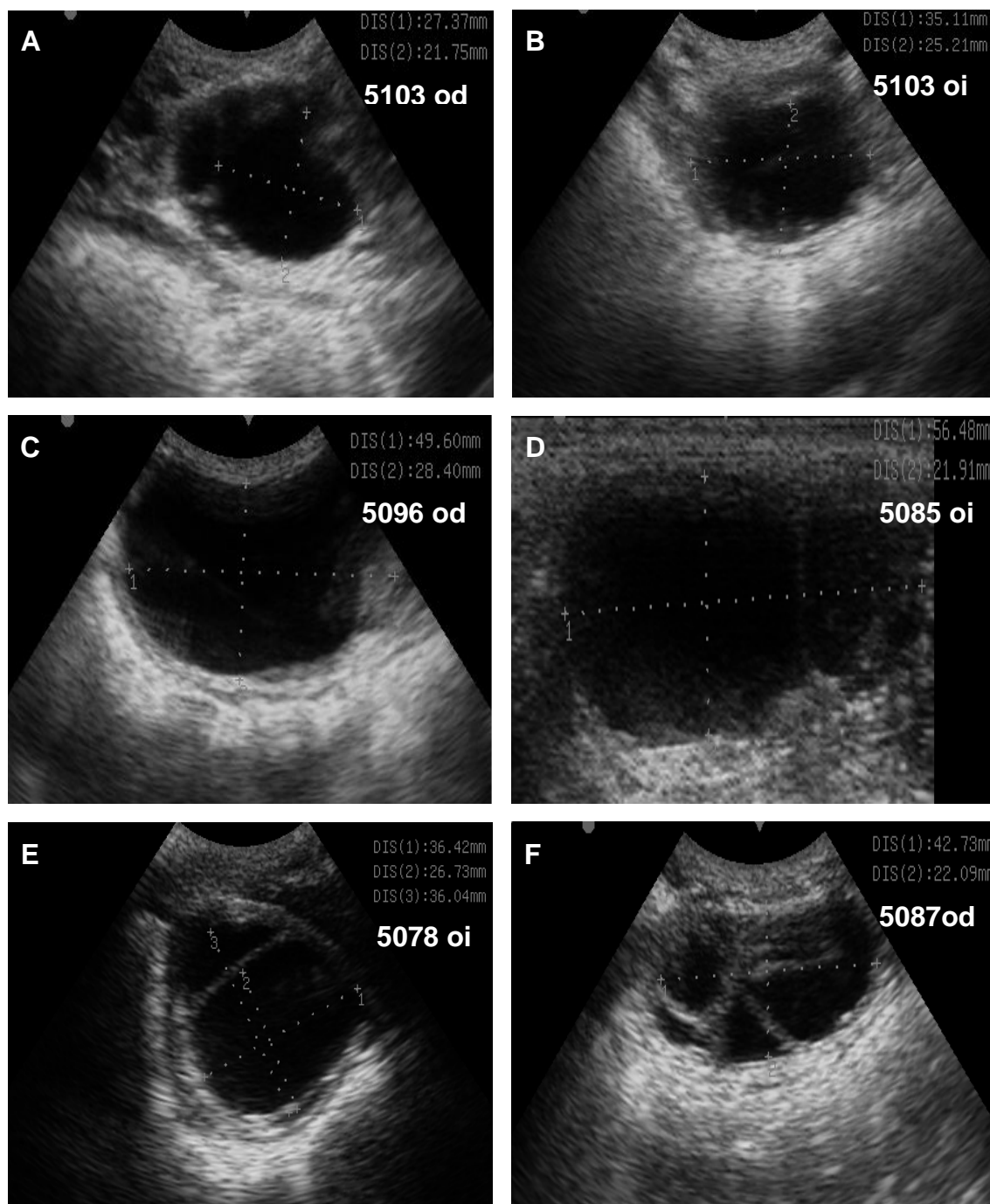


Figura 52: Características ecogénicas de los quistes foliculares. La muestra 5103 (figura A y B) presenta quistes en ambos ovarios. La imagen ecográfica muestra una estructura redondeada con aspecto anecogénico con bordes definidos. Las figuras C-F representan quistes foliculares septados. Se caracterizan por su gran tamaño, aspecto anecogénico y delgados septos de separación.

4.6.2- Expresión de receptores hormonas esteroides y de enzimas esteroideogénicas en “muestras de casos a campo”

En muestras diagnosticadas a campo se analizaron quistes foliculares mediante aspirado folicular guiado por ultrasonografía para evaluar la expresión del ARNm de los receptores de esteroides y de las enzimas esteroideogénicas CyP17 y CyP19. Los resultados demostraron que mediante la técnica de aspirado folicular, es posible obtener poblaciones celulares de granulosa y de teca lo que nos permitió identificar los transcritos de los genes buscados mediante la técnica de RT-PCR. Los valores fueron expresados como la relación entre la DOI de la señal de los productos de PCR y la DOI de la señal de la expresión constitutiva de GAPDH.

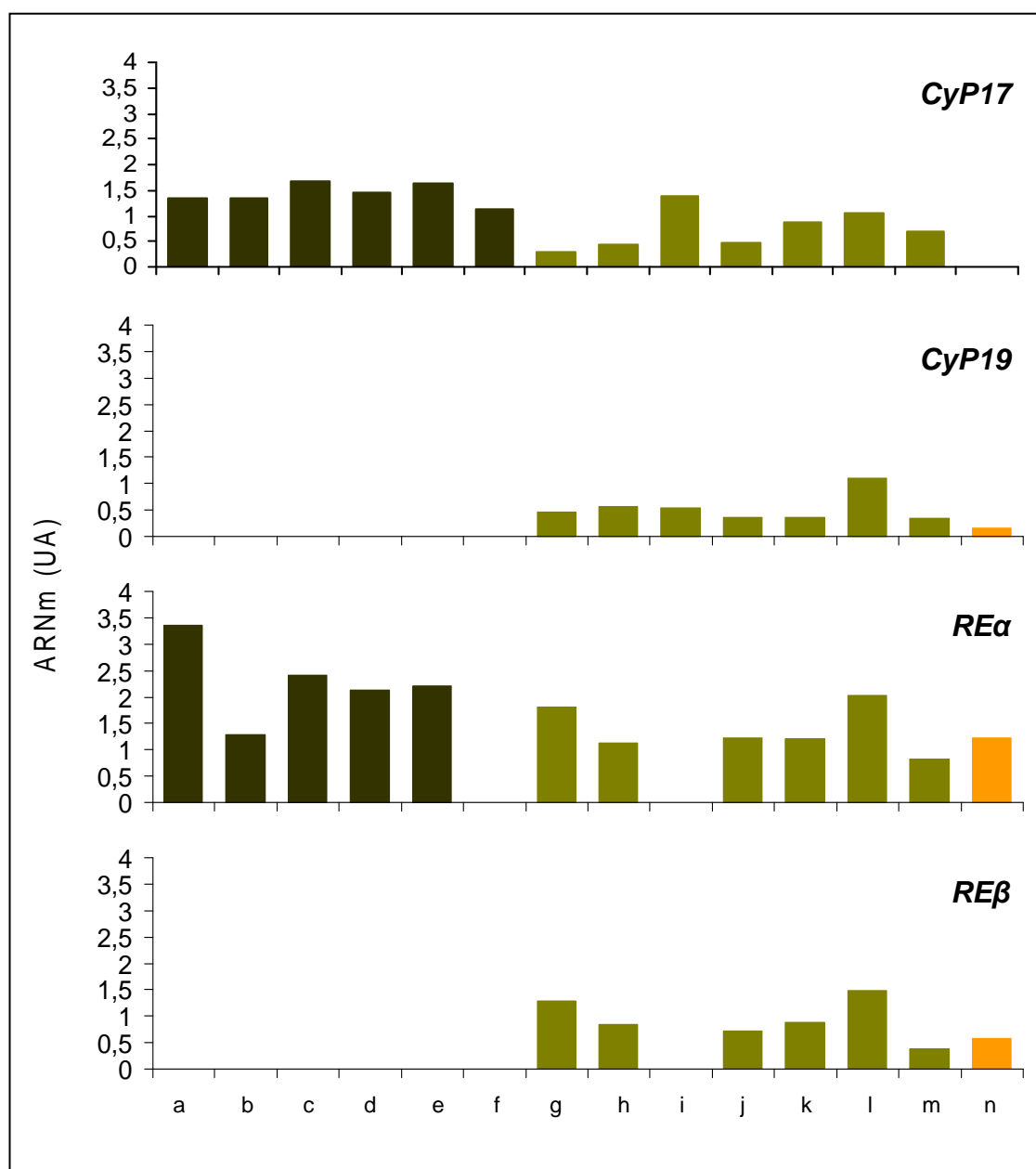
Solo las muestras positivas para la expresión del ARNm de GAPDH fueron utilizados para investigar la expresión del ARNm de los genes de interés. Además, en todos los casos se realizó un control negativo omitiendo el paso de transcripción reversa y un control sin ADN molde.

Particularmente, se caracterizó la población celular de los aspirados mediante el análisis de la expresión del ARNm de la enzima CyP19 propia de las células de la granulosa y de la enzima CyP17 presente en células de la teca. Aquellas muestras que evidenciaron bandas en los amplificados de PCR correspondientes al tamaño del fragmento esperado para los transcritos de las enzimas CyP17 y CyP19 fueron consideradas como un grupo aparte. Se lograron identificar seis muestras de aspiración folicular de quistes que contenían solo células de la teca; una sola muestra con células de la granulosa y siete muestras que presentaron ambas poblaciones celulares de las que integran la pared de los quistes (teca y granulosa). A partir de ellas se procedió al análisis de la expresión del ARNm de los receptores de hormonas esteroides.

En las muestras que presentaron únicamente células de la teca no se detectó expresión del ARNm que codifican para: RE β , RA y el fragmento del RP que flanquea una región común de las isoformas A y B. Como se puede observar en la Figura 53, las muestras que presentaron ambas poblaciones celulares mostraron expresión del ARNm que codifican para: RE α , RE β , RA y región E del RP, región común a las isoformas A y B del RP y la isoforma RP-B. A diferencia de la muestra que presentó expresión positiva del ARNm de la enzima CyP19, en la cual no se detectó expresión de los transcritos del RP

que abarca las isoforma RP-A y RP-B. Cabe mencionar que solo 2 muestras de 7 mostraron expresión con el juego de oligonucleótidos *RPab*.

En la Figura 53 se visualizan de modo descriptivo los amplificadores de los transcritos de ARNm evaluados en quistes foliculares de muestras diagnosticadas a campo.



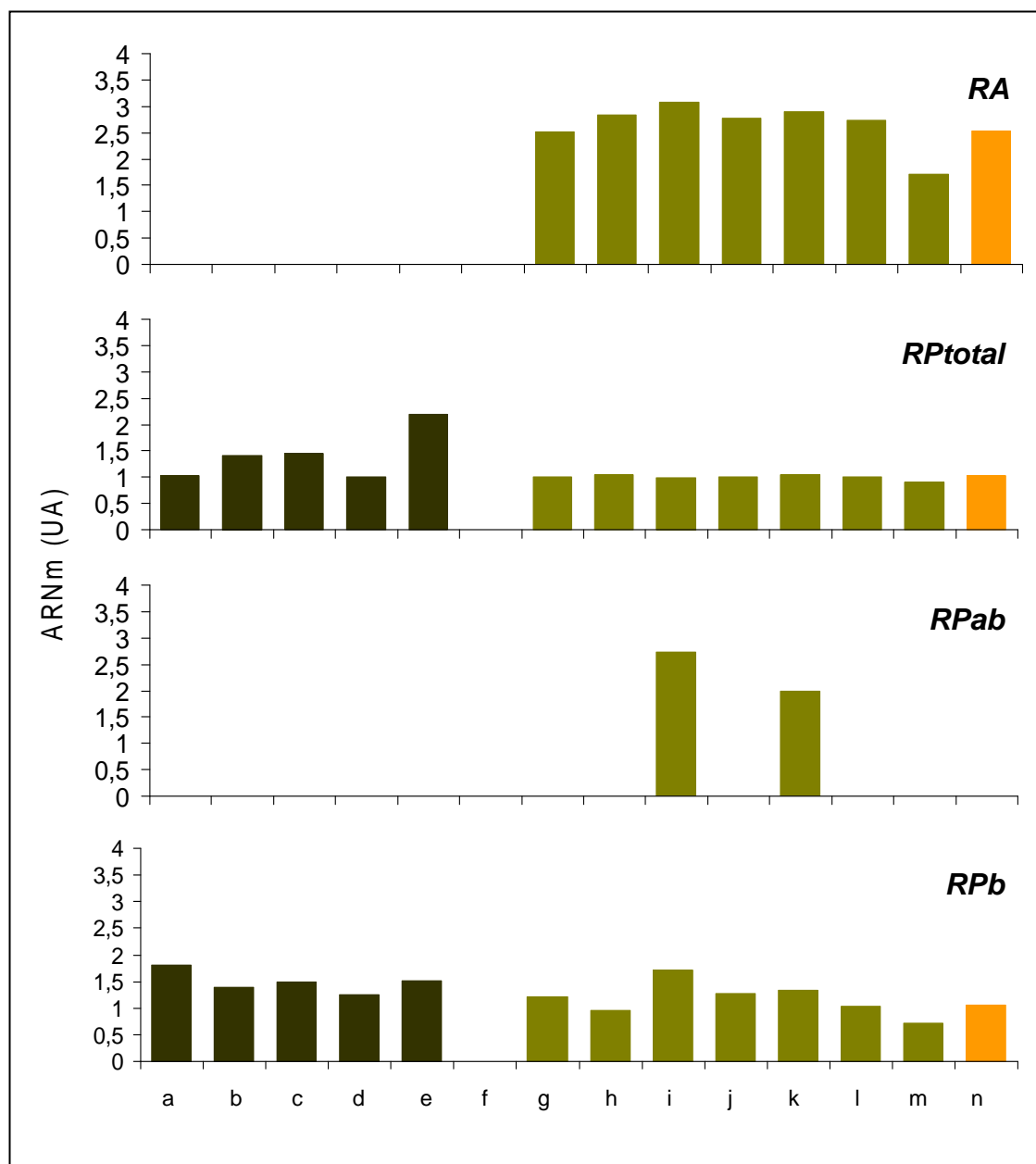


Figura 53: Identificación de los transcritos de los receptores de hormonas esteroideas en muestras de células obtenidas mediante la técnica de aspirado folicular. La gráfica muestra la expresión del ARNm de los receptores esteroideos y de las enzimas esteroideas en muestras de quistes que presentaron células de la teca , células de la granulosa y ambas poblaciones celulares . *CyP17, CyP19*: oligonucleótidos utilizados para la identificación de las enzimas esteroideas evaluadas. *RE α , RE β , RA, RPtota, RPab, RPb*: oligonucleótidos utilizados para la identificación de las distintas isoformas de los receptores esteroideos.

5- DISCUSIÓN

5.1- Inducción de la enfermedad quística ovárica en bovinos

Los métodos de diagnóstico empleados en bovinos para la detección de quistes foliculares han estado basados en la palpación rectal (Grunert y Berchtold, 1982) como método tradicional, económico y rápido, pero actualmente la exploración de los ovarios mediante el empleo de técnicas ultrasonográficas, apoyado con la determinación de los niveles hormonales, permite distinguir estructuras difíciles de clasificar por palpación (Carroll y col., 1990). Además, la visualización del aspecto ecográfico de las paredes foliculares y los niveles de progesterona plasmática sirven para confirmar el diagnóstico y diferenciar los quistes de tipo folicular (progesterona <1 ng/ml, paredes delgadas) de los luteínicos (progesterona ≥ 1 ng/ml, paredes engrosadas) (Roberts, 1986). En este estudio, todos los quistes fueron clasificados como foliculares ya que sus paredes eran finas y la concentración plasmática de progesterona durante el período de la experiencia también fue baja ($<0,5$ ng/ml) (Ortega y col., 2008; Salvetti, 2010). Durante el seguimiento ecográfico, pudo apreciarse una cavidad uniforme anecogénica y redondeada mayor a 20 mm. No se produjo dehiscencia folicular en ninguna de las vacas inducidas.

La administración de ACTH dos veces diarias durante 7 días a partir del día 15 del ciclo estral bovino fue efectiva para inducir quistes foliculares en la totalidad de los animales tratados. Acerca del fundamento de este modelo, se ha demostrado que las vacas con COD presentan células gonadotrofas-LH atróficas, menor cantidad de hormona intracelular (determinada por inmunohistoquímica), liberación alterada y degradación hormonal intracelular (Busato y col., 1995). Paralelamente, se ha descrito que las células hipofisarias corticotrofas se encuentran hipertrofiadas y con mayor inmunoreactividad a ACTH, postulando que una hiperestimulación del eje corticotrópico podría inhibir la secreción pulsátil y basal de LH y causar la atrofia de las células gonadotrofas-LH. Desde el punto de vista reproductivo, se ha demostrado que la administración de ACTH durante la fase folicular generó niveles constantes de LH suprimiendo el pico preovulatorio y afectando la frecuencia pulsátil de esta hormona (Ribadu y col., 1999, 2000; Dobson y col., 2000). Es por ello que el uso de ACTH para inducir experimentalmente quistes foliculares ha proporcionado un excelente modelo para analizar diversos aspectos de la enfermedad que se presenta en bovinos (Cook y col., 1990; Ribadu y col., 1999, 2000; Dobson y col., 2000; Calder y col., 2001, Ortega y col., 2008; Salvetti, 2010).

La caracterización histológica de los ovarios provenientes del modelo experimental evidenció algunas diferencias con la morfología observada en los quistes obtenidos en frigorífico ya que estos últimos mostraron alta variabilidad en cuanto a presencia y estado de la capas de la granulosa y teca interna observándose en muchos casos luteinización de la teca interna o ausencia de la granulosa. Es probable que estos cambios se deban al hecho de que al momento de la toma de muestras de ovarios en los animales con COD espontánea obtenidos en playa de faena, la enfermedad ya esta establecida desconociendo el tiempo de permanencia. Además, el perfil morfológico y endocrino en el momento del diagnóstico puede ser diferente a las condiciones que prevalecieron al momento de la formación inicial del quiste (Ribadu y col., 1999; Dobson y col., 2000; Calder y col., 2001; Silvia y col., 2002; Johnson, 2004; Vanholder y col., 2006).

5.2- Expresión de los receptores de hormonas gonadotróficas

La reproducción en mamíferos es dependiente de la liberación pulsátil de FSH y LH que actúan de manera coordinada para regular la función gonadal. Como ya hemos mencionado, las acciones biológicas de FSH y LH, mediante sus receptores específicos, incluyen la estimulación de la maduración y de la función endocrina del ovario y la regulación de la esteroidogénesis (Bao y Garverick, 1998; Dufau, 1998; Tena-Sempere y col., 1999).

En este trabajo se caracterizó la expresión del ARNm de los receptores de hormonas gonadotróficas (RFSH y RLH) en los diferentes estadios del crecimiento de los folículos antrales y en folículos quísticos. El ARNm del RFSH se expresó solamente en las células de la granulosa de los folículos antrales en concordancia con lo hallado en trabajos previos (Xu y col., 1995; Bao y Garverick, 1998). En los quistes se observó una respuesta diferencial en relación a los folículos antrales controles.

La emergencia de cada onda folicular es precedida por un aumento transitorio en las concentraciones plasmáticas de FSH tanto en vacas con ciclos estrales normales (Cook y col., 1990, Xu y col., 1995) como en aquellas vacas que desarrollan quistes ováricos (Hamilton y col., 1995). Sin embargo, el inicio de las ondas foliculares puede ocurrir a intervalos más largos o más irregulares en las vacas con quistes (Hamilton y col., 1995;

Calder y col., 2001). Estudios anteriores han mostrado que los cambios en la concentración o patrones de secreción de FSH no parecen estar asociados a la aparición de quistes ováricos (Brown y col., 1982; Cook y col., 1990; Busato y col., 1995; Hamilton y col., 1995), ya que la concentración media, la frecuencia y la amplitud de la onda de FSH no difieren entre vacas controles y vacas con quistes (Cook y col., 1990; Hamilton y col., 1995). Calder y col. (2001) no hallaron variación en la expresión del ARNm del RFSH en folículos antrales normales en relación a folículos quísticos, utilizando la técnica de hibridación *in situ*. Estos resultados se contradicen en parte con nuestros hallazgos, y podemos suponer que las diferencias podrían deberse a la mayor sensibilidad de la técnica utilizada en el presente trabajo.

Por otro lado, los nuevos conocimientos que emergen a partir del descubrimiento de las mutaciones espontáneas, como así también las mutaciones generadas *in vitro*, del RFSH proveen nuevos datos sobre aspectos fisiológicos y fisiopatológicos de las funciones de la FSH. Estudios realizados por varios grupos de investigación demostraron la presencia de transcritos alternativos de RFSH en varias especies. A pesar de que los diferentes transcritos encontrados podrían depender del método empleado para su análisis o ser específicos de especie, se han hallado al menos tres transcritos alternativos cuya secuencia nucleotídica se encuentra altamente conservada entre las diferentes especies (Simoni y col., 1997). En los bovinos, los transcritos completos (*full-length*) del RFSH dejan de expresarse cuando las células de la granulosa del folículo que ovuló empiezan a luteinizarse, pero sorprendentemente los transcritos truncados persisten en el medio extracelular, sugiriendo que pueden tener diferente vida media y/o sintetizarse en una sucesión regulada. Debido a que los múltiples transcritos del RFSH podrían tener un rol biológico diferente es que deben existir diversos mecanismos de regulación para asegurar que el transcripto correcto y en la cantidad necesaria se produzca en respuesta a señales biológicas específicas. Aunque es sabido que la expresión del RFSH es regulada por FSH queda por dilucidar que otros factores endocrinos/paracrinicos intervienen tanto en su regulación como en su estabilidad.

En cuanto a la expresión del ARNm del RLH durante la foliculogénesis normal, los resultados de este trabajo concuerdan con lo observado por otros autores (Xu y col., 1995; Bao y col., 1997; Bao y Garverick, 1998). Con respecto a la menor expresión del RLH hallada en las células foliculares de los quistes, estos hallazgos coinciden con los

resultados reportados por Kawate (2004), sin embargo difieren en cierta medida a lo determinado por Odore y col. (1999) y por Calder y col. (2001).

Odore y col. (1999), describieron similares niveles de expresión proteica del RLH en vacas normales y vacas con quistes sugiriendo una posible alteración en el proceso de retroalimentación positiva de los estrógenos sobre el eje hipotálamo-hipofisario. Por otro lado, Calder y col. (2001), mediante hibridación *in situ*, observaron un aumento en los niveles de expresión del ARNm del RLH en células de la granulosa de folículos quísticos dominantes en comparación con folículos antrales. Estos resultados concuerdan con la característica de folículos persistentes los cuales presentan niveles elevados del RLH, capacidad estrogénica por períodos prolongados, bajos niveles de progesterona y alta frecuencia de LH (Hatler y col., 2003). Sin embargo, algunos folículos quísticos no dominantes de animales con la enfermedad expresaron cantidades detectables del ARNm del RLH en células de la teca, mientras que la expresión fue mucho menor en las células de la granulosa. En el mismo estudio Calder y col. (2001) estudiaron el desarrollo de “quistes jóvenes” pero no encontraron diferencias significativas en la expresión del ARNm del RLH entre quistes jóvenes y los folículos dominantes. Por lo tanto, en estos estudios no es posible establecer claramente una relación causa-efecto, ya que cualquier cambio detectado puede ser primario o secundario a la formación de quistes, sugiriendo que el aumento encontrado en la expresión del ARNm del RLH en quistes con capacidad estrogénica es más una consecuencia que una causa del estado quístico.

En el tratamiento de quistes ováricos, se utiliza GnRH y sus análogos, aunque el mecanismo de acción no está esclarecido completamente. Se ha demostrado que la administración de GnRH induce un pico de LH, similar al de la ovulación, dentro de 2,5-3 horas de tratamiento, suficiente para inducir la luteinización de los quistes, la ovulación (si existe un folículo dominante) y la formación de un cuerpo lúteo en el ovario que presenta el quiste o en el contralateral (Nanda y col., 1989). Sin embargo, la tasa de recuperación reportada en la literatura es del 49-56% después del tratamiento con GnRH o sus análogos (Cantley y col., 1975; Nakao y col., 1985; Dinsmore y col., 1987; Nanda y col., 1989), incrementándose cuando la misma se combina con Naloxona (Palomar y col., 2008). La falla en la recuperación puede explicarse por la incapacidad de las estructuras quísticas de responder al pico de LH inducido por GnRH debido a fibrosis, a la alteración en las células de la granulosa y de la teca (Kesler y col., 1979), al número insuficiente de RLH en las

células foliculares y/o a la disminución de la sensibilidad a la hormona LH por alteración del sitio de unión de sus receptores específicos (Nakao y col., 1979; Cairoli y col., 2002).

Por otro lado, se ha demostrado que el ovario expresa gran cantidad de transcritos de ARNm diferentes para los RLH (Segaloff y col., 1990; Gromell y col., 1992; Rossing y col., 1994; Reinholz y col., 2000). Aunque el rol de las isoformas del RLH no está dilucidado completamente, estudios recientes sugieren que los diferentes transcritos de ARNm, generados por empalme alternativo, pueden regular la expresión del RLH maduro en la superficie celular (Aatinski y col., 1992; Bacich y col., 1994; Reinholz y col., 2000). Las isoformas solubles podrían regular los niveles hormonales de LH libre en sangre, mientras que aquellas isoformas incapaces de unirse al ligando podrían modular la respuesta de la hormona por la generación de heterodímeros (Aatinski y col., 1992). La diversidad de los transcritos truncados a partir del ARNm inmaduro del RLH resalta el papel importante que pueden desempeñar en la regulación génica del RLH y también en los efectos sobre la hormona en los diferentes estados fisiológicos y fisiopatológicos (Aatinski y col., 1992; Dufau y col., 1995).

En el presente estudio se utilizaron muestras de tejido ovárico recolectadas en frigorífico, y no fue posible comparar las modificaciones de RFSH y de RLH con los efectos inducidos sobre estos receptores de gonadotrofinas en modelos experimentales debido a la falta de muestras del modelo experimental, ya que las mismas fueron destinadas a estudios histológicos. La caracterización de los cambios observados en la expresión del ARNm de los receptores de las hormonas gonadotróficas luego de la formación de los quistes pueden dificultar la comprensión del mecanismo de la enfermedad, por lo tanto es necesaria la utilización en un futuro, de modelos animales apropiados de manera de poder aclarar numerosos aspectos de los mecanismos de regulación molecular de estos receptores.

5.3- Expresión de los receptores de hormonas esteroides

Alteraciones en las cantidades intraováricas e intrafoliculares de los receptores de hormonas esteroides son claramente relevantes para determinar el destino de los folículos y, de hecho cambios en la expresión de estos receptores se han relacionado con el estadio

folicular y las diferentes etapas del ciclo estral (Rosenfeld y col., 2001; Drummond y col., 2002; Salvetti y col., 2007; Walters y col., 2008; Salvetti y col., 2010).

En este trabajo hemos analizado la localización y cuantificación de la expresión proteica y del ARNm del RA. En los ovarios normales, la expresión proteica del RA se evidenció tanto en las células de la granulosa como de la teca interna de todas las categorías foliculares, con muy pocas células de la teca externa marcadas. Se encontró mayor expresión en las células de la granulosa de los folículos terciarios en relación a las demás categorías evaluadas. En cuanto a la localización de los transcritos del RA, se hallaron en los mismos tipos celulares en los cuales se encontró la expresión de dicha proteína.

La expresión del RA en el ovario ha sido descrita en diferentes estadios de la foliculogénesis en varias especies (Suzuki y col., 1994; Tetsuka y col., 1995; Hillier y col., 1997; Cárdenas y Pope, 2002; Juengel y col., 2006). Sin embargo, la comparación entre las distintas especies ha mostrado diferentes patrones de expresión del RA, así como una diferencia en la distribución espacial. En bovinos, se ha demostrado expresión del RA en folículos con solo 1 a 1,5 capas de células de la granulosa cúbicas y esta expresión se incrementa durante las primeras etapas de desarrollo folicular antral. Estos datos son consistentes con el rol que juegan los andrógenos en el crecimiento y diferenciación folicular (Hampton y col., 2004; Yang y Fortune, 2006; Walters y col., 2008).

En animales con COD, describimos un aumento significativo en la expresión del ARNm del RA en las células granulosas de los folículos quísticos, contrariamente a lo hallado en la expresión proteica de dicha proteína. Las diferencias encontradas en cuanto a los niveles del ARNm del RA y a los niveles proteicos del RA observados por inmunohistoquímica podrían deberse a modificaciones pre- y post-transcripcionales (Ruizeveld de Winter y col., 1992; Keller y col., 1996; Fu y col., 2002; Wong y col., 2004), o a la presencia de diferentes isoformas de la proteína.

Se ha propuesto que la producción de andrógenos estimulados por la LH en las células de la teca es uno de los requerimientos para la biosíntesis de estrógenos en los folículos en crecimiento (McNatty y col., 1984; Valdez y col., 2005). Por otro lado, estudios previos han demostrado que los niveles de andrógenos circulantes se mantienen en niveles normales en folículos quísticos en relación a los folículos antrales normales en bovinos con COD espontánea (Short, 1962; Isobe, 2007). En este sentido, no se han

encontrado diferencias en las concentraciones de andrógenos en animales con COD inducido experimentalmente (Salveti, 2010). Monniaux y col. (2008) describieron que los quistes jóvenes presentaban niveles elevados de testosterona que disminuían en los quistes de más tiempo de evolución en los cuales aumentaban los niveles de progesterona. El exceso de andrógenos, como ocurre en el PCOS que se presenta en humanos, perjudica la función folicular. Esta hormona inhibe los efectos de los estrógenos sobre el desarrollo folicular y la inducción del RLH en las células de la granulosa mediada por FSH (Farookhi, 1980; Weil y col., 1999; Hillier, 2001; Hickey y col., 2004; Drummond, 2006).

El equilibrio alterado de RE α :RE β sumado al aumento de la expresión del ARNm del RA observado en los quistes foliculares pueden ser factores que contribuyan a la persistencia folicular (Ortega y col., 2008).

Hay reportes que indican que la expresión del RA en las células de la granulosa de folículos antrales se reprime por la activación de la isoforma β del RE. La represión del RA provoca cambios a nivel folicular en donde los estrógenos pasan a ser la hormona dominante, un paso crítico para el crecimiento de los folículos (Billig y col., 1993; Hillier y Tetsuka, 1997; Britt y Findlay, 2002; Cheng y col., 2002; Drummond, 2006; Yang y Fortune, 2006). Si la expresión del RA permanece elevada, como sucede en los quistes foliculares, los folículos antrales no pueden alcanzar el estadio de dominancia folicular y su destino es la atresia o la persistencia. Al respecto, es interesante observar que en mujeres con PCOS, en células de la granulosa de folículos antrales estimulados previamente con gonadotrofinas presentan un aumento en la expresión del RA en comparación con folículos antrales controles (Catteau-Jonard y col., 2008).

El desafío por delante no solo es dilucidar la naturaleza precisa de estas interacciones, sino también como interactúan en la regulación del destino folicular y como la desregulación de estas interacciones puede llevar a diversas alteraciones ováricas, como es la COD, y a la no respuesta del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.

En este trabajo el ARNm de las isoformas del RE fueron halladas en los diferentes tipos de células foliculares. Al evaluar la expresión del ARNm del RE α en las poblaciones celulares por separado se pudo observar un aumento significativo en las células de la granulosa de folículos antrales grandes en comparación a los folículos antrales pequeños y medianos. El mismo comportamiento se observó en la expresión del ARNm del RE β . La expresión del ARNm de ambas isoformas del RE no evidenció cambios en las células de la

teca durante el crecimiento folicular. Los datos obtenidos en el trabajo de Tesis concuerdan con los patrones de expresión de los RE descritos en la bibliografía (Rosenfeld y col., 1999; Manikkam y col., 2001; Berisha y col., 2002; Van den Broeck y col., 2002b; Evans, 2003; Amrozi y col., 2004; D'Haeseleer y col., 2005, 2006).

En los animales con COD espontánea observamos una alta expresión del ARNm del RE α en las células de la granulosa y de la teca de los folículos quísticos, de forma concomitante con una disminución en la expresión del transcrito del RE β . Estudios llevados a cabo en distintas especies demuestran diferencias en la expresión de la proteína y del ARNm del RE con respecto a individuos con ovarios normales, incluyendo mujeres con PCOS y en modelos experimentales en bovinos con COD inducida y roedores con ovario poliquístico (PCO) inducido (Odore y col., 1999; Jakimiuk y col., 2002; Salvetti y col., 2007, 2009; Ortega y col., 2009). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos previamente al analizar la expresión proteica en bovinos con COD (Salvetti y col., 2007) y en un modelo experimental en ratas (Salvetti y col., 2009). Odore y col. (1999) mostraron que hay una notable reducción en la concentración total del RE en los quistes foliculares bovinos con respecto a los folículos dominantes de animales normales. Sin embargo, estos autores no discriminaron entre los distintos subtipos del RE, así como en la localización de los mismos. Por otro lado, Calder y col. (2001) no hallaron diferencias en la expresión del ARNm del RE β en los folículos quísticos de hembras bovinas con respecto a los folículos dominantes, utilizando la técnica de hibridización *in situ*, de lo que podría inferirse que las diferencias determinadas en el presente trabajo se deban a las distintas metodologías empleadas. Jakimiuk y col. (2002) encontraron variaciones en la expresión de las dos isoformas del RE en las capas foliculares de los quistes en relación con los folículos del mismo tamaño en mujeres con PCOS y normales respectivamente. Ellos mostraron, por RT-PCR y western blot una disminución tanto del ARNm como de las proteínas del RE β en las células de la granulosa y de la teca interna en los folículos derivados de individuos con PCOS en comparación con los folículos del mismo tamaño de mujeres sanas. En cuanto al RE α , la única diferencia encontrada por estos autores fue un marcado incremento en la expresión proteica en las células de la teca interna proveniente de los ovarios quísticos. Recientemente, se han descrito resultados análogos en ovejas tratadas prenatalmente con andrógenos donde también se observa persistencia folicular (Ortega y col., 2009).

El ambiente endocrino asociado con la formación y mantenimiento de los quistes foliculares en los bovinos ha sido estudiado por numerosos autores (Kesler y Garverick, 1982; Cook y col., 1991; Hamilton y col., 1995; Garverick, 1997; Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000; Calder y col., 2001; Silvia y col., 2002; Peter, 2004; Vanholder y col., 2006; Isobe, 2007). Las vacas predestinadas a formar quistes, poseen altas concentraciones de LH y 17β -estradiol en comparación con aquellas que ovulan normalmente, sobre todo durante los últimos días de la maduración folicular (Hamilton y col., 1995). En una condición endocrina normal, la retroalimentación positiva de los estrógenos, estimula al hipotálamo a secretar GnRH. Sin embargo, en vacas con quistes se detectaron menores niveles de GnRH en el hipotálamo con respecto a animales sin ellos (Cook y col., 1991) sugiriendo alteraciones en la esteroidogénesis, que pueden asociarse a un desequilibrio en el sistema de retroalimentación entre las gónadas y el hipotálamo (Calder y col., 2001; Isobe, 2007). Numerosos estudios han demostrado que las gonadotropinas (Byers y col., 1997) y los estrógenos (Sharma y col., 1999) inducen la expresión de los RE en los folículos y que dicha expresión cambia de acuerdo a los niveles hormonales (Cook y col., 1990; Langhout y col., 1991; Calder y col., 1999; Rosenfeld y col., 2001; Spicer y Aad, 2007). Al respecto, algunos investigadores han demostrado que los RE muestran una tendencia hacia la regulación positiva junto al aumento de los niveles de estrógenos en el líquido folicular y esto se correlaciona con una regulación positiva de RLH y RFSH (Berisha y col., 2002). Además, se ha demostrado que la progesterona, en el momento en que incrementa significativamente sus niveles, regula negativamente ambas isoformas de los RE (Roy y Kole, 1995).

La observación de que ratones que sobreexpresan el gen que codifica para $RE\alpha$ fueron subfértiles y mostraron una regulación negativa del gen $RE\beta$ (Tomic y col., 2007), plantea la posibilidad de que la disminución del $RE\beta$ observada en quistes foliculares pueden ser secundaria a la regulación positiva del $RE\alpha$. En este sentido, investigaciones realizadas con ratones $RE\alpha$ KO mostraron que estos animales presentaban folículos anovulatorios, aunque pudo observarse también que este subtipo no es necesario para el reclutamiento folicular inicial pero que sí lo es para la siguiente etapa del crecimiento folicular (Dupont y col., 2000; Brosens, 2004).

Aunque el $RE\alpha$ y el $RE\beta$ se unen a ligandos endógenos, tales como 17β -estradiol con una afinidad similar y forman homodímeros ($RE\alpha$ - $RE\alpha$ o $RE\beta$ - $RE\beta$) y heterodímeros

(RE α -RE β), muestran una actividad transcripcional diferencial en una manera dependiente del contexto celular y del promotor (McInerney y col., 1998; Pettersson y col., 2000). Así, la expresión diferencial del RE α y/o RE β , brindará un microambiente celular que regula la capacidad de respuesta a estrógenos en los genes regulados por esta hormona, como aquellos asociados a esteroidogénesis, proliferación y diferenciación celular, etc., de una manera dependiente del tipo celular (O'Brien y col., 1999; Kian Tee y col., 2004). Estudios anteriores han descrito que el RE β , cuando está presente como heterodímero, reprime la actividad del RE α disminuyendo la sensibilidad al 17 β -estradiol (Hall y McDonnell, 1999). Recientemente se ha sugerido que la actividad transcripcional del RE no está determinada por su capacidad de unión, sino más bien por la concentración individual de los subtipos RE α y RE β en las células blanco y la estructura que presenta el ligando (Gougelet y col., 2007; Bhavnani y col., 2008). Por lo tanto, un ligando dado puede ejercer actividades opuestas, dependiendo del tipo de RE expresado.

De esta manera, cualquier cambio en la expresión y concentración de las distintas isoformas del RE en las células de la granulosa y de la teca en los folículos de animales con COD podrían alterar la relación RE α :RE β , causando modificaciones en la acción o el efecto de los estrógenos sobre sus células diana. Si bien las consecuencias de estos cambios no están del todo dilucidadas, los efectos del estradiol podrían causar alteraciones en el balance proliferación/apoptosis (Das y col., 2008; Salvetti y col., 2009; 2010), en la expresión de los receptores de gonadotrofinas (Calder y col., 2001; Catteau-Jonard y col., 2008), en la acción enzimática y el metabolismo (Calder y col., 2001; Isobe y Yoshimura, 2007; Zurvarra y col., 2009), tal como ocurre en animales con COD.

Investigaciones recientes llevadas a cabo con ratones KO para RE revelaron que la presencia de ambos receptores es un prerequisite para el funcionamiento apropiado del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y para una exitosa ovulación. Couse y col. (2003) describieron que ratones con el gen RE α silenciado (ratones RE α KO) exhiben un fenotipo similar al de PCOS que se presenta en humanos con niveles de LH aumentados, y ovarios caracterizados por la presencia de múltiples folículos quísticos y hemorrágicos sin evidencias de ovulación. En contraste a los resultados observados en ratones RE α KO, los ratones KO para el gen RE β (RE β KO) sexualmente maduros son fértiles, aunque los ovarios de estos animales muestran signos morfológicos de desarrollo folicular anormal, y una capacidad ovulatoria reducida (Cheng y col., 2002; Brosens, 2004; Couse y col., 2004;

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

Estudios previos realizados sobre tejido ovárico bovino, demostraron una expresión del RP específica de célula y del estadio del desarrollo folicular (Conneely y col., 2002; Jo y col., 2002; Van den Broeck y col., 2002a). Además, se determinó que la expresión proteica del RP se mantuvo sin cambios en los folículos quísticos de animales bovinos con la enfermedad quística ovárica (Salveti y col., 2007). En este trabajo, la expresión del transcripto que comprende las tres isoformas del RP fue predominante en las células de la granulosa, y los quistes foliculares mostraron una mayor expresión en las células de la teca en comparación con los folículos sanos. Las diferencias determinadas en cuanto a los niveles de los transcriptos que abarcan las tres isoformas del RP visualizados con RT-PCR y la expresión proteica del RP, previamente detectada (Salveti y col., 2007), podrían deberse a que los anticuerpos utilizados en los estudios de inmunohistoquímica no pudieron distinguir todas las isoformas del RP. Además, la alta sensibilidad de la técnica de PCR, las modificaciones postraduccionales y el tiempo de permanencia de los quistes al momento de la recolección de las muestras podrían ser otros factores de discrepancia (Garverick, 1997; Sette y col., 2010; Kang and Han, 2011).

Las múltiples isoformas del RP presentes en una célula blanco pueden explicar parcialmente la enorme complejidad de los procesos intracelulares que participan en la respuesta a la progesterona (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000; Jo y col., 2002). Aunque las isoformas RP-A y RP-B presenten indistinguibles afinidades de unión al ADN y al ligando, varios estudios han demostrado que sus funciones transcripcionales dependen del contexto del promotor y del tipo celular (Fang y col., 2002; Brosens, 2004). Además, cada isoforma regula la expresión de diferentes genes cuyos productos modulan distintas funciones (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000). Estudios *in vitro* han descrito que

las isoformas A y B del RP pueden llevar a cabo diferentes funciones en la misma célula y también que la actividad de cada isoforma puede variar entre los distintos tipos celulares (Gava y col., 2004). El RP-B de 116 kDa aparece como un activador transcripcional de los genes de respuesta a la progesterona y en una variedad de tipos celulares, en donde el receptor A de 94 kDa es inactivo. Se ha demostrado que RP-A funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional mediada tanto por RP-B como por otros receptores de hormonas esteroides como los receptores de mineralocorticoides, RE, RA y RG (Vegeto y col., 1993; Brosens, 2004; Mulac-Jericevic y Conneely, 2004). Por lo tanto, la relación RP-A:RP-B en células específicas define la respuesta fisiológica a la progesterona (Wen y col., 1994). Acerca de la isoforma C (60 kDa), no se sabe mucho sobre sus características estructurales y funcionales, así como también se desconoce la regulación de su expresión por hormonas esteroides en los distintos órganos. Estudios realizados en ratas demostraron que RP-C presenta una expresión predominantemente citoplasmática y no tiene actividad transcripcional por si misma pero puede modular las capacidades transcripcionales de RP-B y RP-A haciéndolas menos eficientes (Ogle, 2002; Schans y col., 2003). Sin embargo, Wei y col. (1996) observaron que células *in vitro* transfectadas con ADN del RP-C incrementó la actividad transcripcional de las isoformas A y/o B del RP. Por otro lado, se ha observado que en un mismo tipo de célula en donde se co-expresan las isoformas RP-B/RP-A o RP-B/RP-C existe una modulación de la actividad transcripcional de la isoforma RP-B (Vegeto y col., 1993; Wei y col., 1997).

Si consideramos la regulación hormonal en el ovario, las isoformas del RP son inducidas específicamente en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios en respuesta a la estimulación de LH y 17 β -estradiol (Natraj y Richards, 1993; Brosens, 2004). Los niveles elevados de estas hormonas en vacas con quistes podrían causar alteraciones en la expresión de las isoformas del RP. En el presente trabajo, a pesar de que no fue posible distinguir entre los ARNm de RP-A y RP-C por separado, se observó que RP-B aumenta significativamente en la granulosa de folículos quísticos. El hecho de que su patrón de expresión se encuentre alterado en algunas enfermedades ováricas (Graham y Clarke, 2002) sugiere que cambios en la expresión relativa de las distintas isoformas podrían de este modo modificar las actividades biológicas de progesterona con su consecuente pérdida funcional, aún cuando las concentraciones séricas de esta hormona y la capacidad de unión a sus receptores específicos en los tejidos reproductivos no hallan

presentado alteraciones (Fang y col., 2002; Schams y col., 2003; Amrozi y col., 2004; Goldman y col., 2005).

Por otro lado, la inducción de la expresión del RP en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios es crítica para la ovulación (Lydon y col., 1995; Cassar y col., 2002), lo que se confirmó en estudios realizados con ratones KO para el gen que codifica el RP (RPKO). Los roedores RPKO exhibieron folículos anovulatorios o que se luteinizaron pero persistieron en el tiempo, dando un aspecto de ovarios poliquísticos (Lydon y col., 1995). Estudios realizados en ratones KO para el gen RP-A mostraron gran cantidad de folículos anovulatorios maduros detenidos en un estadio similar de desarrollo, con un número reducido de ovocitos y con evidentes fallas en la ovulación. La expresión de dos enzimas metaloproteasas (ADAMTS-1 y la catepsina L), necesarias para la disolución del ápice de los folículos preovulatorios, fue inhibida en folículos anovulatorios de ratones RPKO indicando una dependencia del RP para la expresión normal de estas proteínas (Thatcher y Wilcox, 1973; Mulac-Jericevic y Conneely, 2004; Drummond, 2006; Vanholder y col., 2006). La alteración en la expresión de las isoformas del RP encontrada en los ovarios de animales con COD podría indicar un cambio en la expresión de las enzimas necesarias para la ovulación y por consiguiente, el folículo falla en ovular contribuyendo a la formación del quiste y a la permanencia.

Aparentemente, en los folículos preovulatorios la progesterona producida por las células granulosas diferenciadas (que expresan altos niveles del RP inducidos por el pico de LH (Natraj y Richards, 1993)) disminuyen las posibilidades de morir por apoptosis, actuando esta hormona como un factor de supervivencia de las células (Svensson y col., 2000). Estudios previos han demostrado que el RP media el efecto protector de la progesterona contra la apoptosis en las células de la granulosa de folículos preovulatorios bovinos (Svensson y col., 2000; Quirk y col., 2004). Si la expresión del RP se reduce, la influencia protectora de progesterona se pierde (D'Haeseleer y col., 2007). En trabajos previos realizados en nuestro grupo de trabajo (Salvetti, 2010) se observó que el balance proliferación/apoptosis estaba alterado en los ovarios de los animales afectados por COD. En ese mismo estudio, los folículos provenientes de animales con COD evidenciaron niveles del RP-A inferiores a los encontrados en los folículos terciarios de los animales control.

Se sabe que los estrógenos inducen la expresión del RP en una variedad de tejidos (Vienonen y col., 2002) y su incremento esta asociado al desarrollo de folículos quísticos ováricos en bovinos (Yoshioka y col., 1996). Estudios previos han demostrado que esta hormona altera el patrón de expresión del RP cambiando desde la dominancia de la isoforma RP-B a la dominancia de la isoforma RP-A en el oviducto de gallinas (Syvala y col., 1997). En células T-47D (línea celular de cáncer de mama humano) se ha reportado que los estrógenos estimulan la expresión del RP-B (Graham y col., 1995), mientras que en células de MCF-7 (línea celular de cáncer de mama humano) estimulan la expresión del RP-A (Vienonen y col., 2002). Una mejor comprensión de la importancia funcional de la expresión alterada de las isoformas del RP y como esta afecta la sensibilidad a las hormonas esteroides son necesarios para dilucidar los mecanismos de la patogenia de la enfermedad quística ovárica.

5.4- Expresión de las proteínas correguladoras

La expresión génica es un proceso altamente coordinado que requiere una delicada interacción entre la maquinaria basal de transcripción, factores de transcripción y correguladores transcripcionales (York y col., 2010). Las proteínas correguladoras son requeridas por los receptores de hormonas esteroides para modular eficientemente la transcripción de un determinado gen; por lo tanto, los cambios en el patrón y/o nivel de expresión de los coactivadores o correpresores, o mutaciones en sus dominios funcionales pueden afectar la actividad transcripcional de los receptores de hormonas esteroides y así podrían causar desordenes en sus tejidos diana, incluyendo el ovario (Gao y col., 2002).

Numerosos estudios realizados en roedores y en humanos han demostrado la expresión de los genes SRC-1 y SRC-2 en diversos tejidos y tipos celulares (Takeshita y col., 1997; Aranda y Pascual, 2001; Gregory y col., 2001; Xu y Li, 2003). Sin embargo en animales domésticos, hay escasas investigaciones sobre la expresión de las proteínas correguladoras de receptores de hormonas esteroides. Hlaing y col. (2001) fueron los primeros en reportar la presencia de los cofactores SRC-1, SRC-2, SRC-3, SMRT en el ovario y el útero de las especies porcina, bovina y ovina.

En el presente trabajo, los transcriptos de SRC-1 se expresaron tanto en células de la granulosa como de teca en todas las categorías foliculares de ovarios de animales sanos y de animales con COD espontánea. En los animales con COD espontánea pudimos observar una tendencia a aumentar en la teca de los folículos quísticos en relación a los folículos antrales pequeños y grandes de animales controles pero estos niveles no fueron significativamente diferentes a los hallados en folículos antrales medianos.

A pesar de los hallazgos de la expresión de SRC-1 en los tejidos específicos del tracto reproductivo, ratones con el gen para el coactivador SRC-1 bloqueado mostraron crecimiento y fertilidad normal (Xu y Li, 2003). Sin embargo, modelos genéticos mostraron una resistencia parcial en los órganos hormono-dependientes, sugiriendo una falla en la función de SRC-1 (Hlaing y col., 2001; Xu y Li, 2003). Por ejemplo, la ablación selectiva del gen SRC-1 en ratones demostró que dicha proteína es necesaria para la función eficiente de las hormonas esteroides, tanto para la acción de los estrógenos y la progesterona en el útero y la glándula mamaria, como para la acción de andrógenos en la próstata y los testículos (Xu y col., 1998). Estas observaciones indican que SRC-1 podría intervenir en las respuestas de las hormonas esteroides. En base a lo expuesto, se podría sugerir que cambios en la expresión de receptores de hormonas esteroides hallado en los ovarios de animales con COD estaría en relación a la falta de regulación por parte de proteínas asociadas, tales como SRC-1.

En cuanto a SRC-2, se evidenció la expresión de los transcriptos en todos los tipos celulares y en todas las categorías foliculares estudiadas. Los resultados obtenidos mostraron un patrón de expresión del ARNm de SRC-2 similar entre los quistes y los folículos antrales grandes sanos.

En investigaciones realizadas sobre muestras de endometrio humano se demostró que la molécula coactivadora SRC-2 se vio aumentada en pacientes con síndrome poliquístico ovárico (Gregory y col., 2002). Estudios realizados en ratones KO para el gen SRC-2 mostraron individuos con características sexuales normales pero con fertilidad reducida (Xu y Li, 2003). Los hallazgos encontrados en el presente estudio sumado a los realizados por otros investigadores, revelarían que SRC-2 juega un papel fundamental en las respuestas hormonales de los tejidos del tracto reproductivo, incluyendo el ovario.

Las proteínas coactivadoras se han visto implicadas en procesos neoplásicos a partir de la observación de la amplificación proteica y la sobreexpresión del gen que codifica

para SRC-3 en tumores primarios de mama, como así también se ha observado que el 58% de pacientes con tumores de glándula mamaria presentaron una sobreexpresión de los transcritos de SRC-3 (Anzick y col., 1997). En un estudio posterior se ha demostrado la amplificación de SRC-3 en tumores de ovario (Tanner y col., 2000; Hussein-Fikret y Fuller, 2005). La amplificación del gen SRC-3 ha sido significativamente asociada con los niveles de los receptores esteroides en las células tumorales del ovario. El rol de SRC-3 en células tumorales del ovario se vinculó a su capacidad de aumentar la actividad de los RE y en consecuencia, la expresión de genes dependiente de estrógenos como así también la proliferación y diferenciación celular (Anzick y col., 1997; Tanner y col., 2000). Por otra parte, las investigaciones realizadas en cultivos celulares y con ratones que carecen del gen SRC-3 demostraron que SRC-3 desempeña un rol importante en múltiples procesos fisiológicos, incluyendo desarrollo de la glándula mamaria, proliferación y diferenciación celular, crecimiento somático y función reproductiva (Wang y col., 2000b; Xu y col., 2000; Yuan y col., 2002; Zhou y col., 2003; Kuang y col., 2004; Wu y col., 2004).

En nuestro trabajo, SRC-3 se evidenció en células de la teca como en granulosa. La inmunomarcación de la proteína mostró un patrón de expresión similar durante la foliculogénesis normal. Los transcritos de SRC-3 en las células de la granulosa, presentaron niveles de expresión similares en las distintas categorías de folículos antrales. Las células de la teca de los folículos antrales medianos evidenciaron una mayor expresión del ARNm en comparación a los folículos antrales grandes. La proteína SRC-3, así como su ARNm, en muestras de ovarios con COD espontánea se expresaron en mayor medida en las células de la granulosa de los folículos quísticos en comparación a las distintas categorías de folículos sanos. Sin embargo, los folículos quísticos del modelo experimental presentaron un patrón de expresión diferente a lo observado en folículos quísticos espontáneos.

Las diferencias encontradas en la expresión de SRC-3 entre lo observado en los folículos quísticos obtenidos del modelo experimental y los provenientes de frigorífico tal vez se deban a la alta heterogeneidad en estas últimas muestras ya que existen datos que se desconocen, tales como el estado del animal, tratamientos hormonales previos, gestaciones, edad de los animales, etapa del desarrollo del quiste, situaciones de estrés y otras variables ambientales a la que pudieron estar sometidos los animales al momento de la recolección de las muestras. Estos hallazgos resaltan la importancia de trabajar con modelos

experimentales en donde es posible conocer aspectos tales como la edad de los animales, estado reproductivo, la alimentación y el tiempo de persistencia de los folículos quísticos.

Por otro lado, la discrepancia encontrada entre la expresión del ARNm y de la proteína de SRC-3 en nuestros resultados podrían explicarse de acuerdo a lo citado por Hussein-Fikret y Fuller (2005), donde postulan que la expresión de la proteína SRC-3 ocurre por mecanismos moleculares diferentes de los que regulan su transcripción. Un número creciente de trabajos han revelado que modificaciones postraduccionales regulan la actividad, asociación/disociación, localización intracelular, la estabilidad y la interacción con otras proteínas (Han y col., 2008; York y col., 2010). Se ha demostrado que cambios en los mecanismos de regulación postraduccionales son importantes para su potencial oncogénico en algunos trastornos en donde se observa una sobreexpresión en los tejidos. (Yi y col., 2005; Gojis y col., 2010).

El patrón de expresión único de SRC-3 y los distintos fenotipos identificados en los ratones que carecen del gen SRC-3 demuestran que los miembros de la familia p160 desempeñan funciones diferenciales en el desarrollo y que sus deleciones dan lugar a distintas enfermedades. A pesar del avance en el estudio de las proteínas correguladoras en relación al estudio del cáncer, los resultados presentados en este trabajo son los primeros reportes sobre su expresión en el ovario bovino normal y en relación a la persistencia folicular relacionada con COD, por lo que son necesarios estudios adicionales para comprender las funciones biológicas y patológicas de los miembros de la familia p160, así como los mecanismos de acción sobre los receptores esteroides.

Hasta la fecha, solo unos pocos trabajos de investigación han estudiado el patrón de expresión de las proteínas correpresoras en distintos tejidos y el rol que estos desempeñan en la regulación de la actividad biológica de los receptores esteroides. En el presente trabajo hemos demostrado que en vacas, la proteína correpresora SMRT se encuentra presente tanto en células de la teca como en granulosa desde los estadios temprano del desarrollo folicular ovárico. Los resultados muestran niveles alterados en la inmunomarcación de SMRT entre el grupo de animales controles en relación a los grupos de animales con COD tanto inducidos como espontáneos, sin embargo entre los grupos de animales con COD estudiados no se ha observado una correlación entre los patrones de expresión de dicha proteína.

Estudios realizados por Webb y col. (2003b) demostraron que la isoforma β del RE se une a SMRT en presencia de estradiol. Como se describe en la introducción, RE α y RE β deben interactuar diferencialmente con los factores que modulan la actividad transcripcional del RE en presencia de estrógenos. El hallazgo de que los estrógenos suprimen la unión de la proteína correpresora, N-CoR al RE α (Webb y col., 2003c), pero promueve la unión de N-CoR al RE β demuestra los modos de interacción hormona-dependiente completamente distintos de las proteínas correguladoras con las isoformas del RE. En este sentido se pudo observar que hubo una relación entre la baja expresión tanto del ARNm del RE β (en este trabajo) como de la proteína (Salvetti, 2010) y los bajos niveles proteicos de SMRT hallados en folículos quísticos, sugiriendo que cambios en el nivel y/o patrón de expresión de este corregulador podría afectar las acciones de los estrógenos a nivel ovárico.

Por otro lado, la variabilidad entre los folículos quísticos obtenidos del modelo experimental y los provenientes de frigorífico que se ha observado en la expresión de SRC-3, también se manifiesta en la expresión de SMRT.

Al realizar el análisis cuantitativo de los cortes histológicos de ovarios bovinos, a los cuales se les realizó inmunohistoquímica, pudimos observar que las células de la granulosa y de la teca son capaces de sintetizar la proteína correpresora REA observándose desde estadios tempranos del desarrollo folicular ovárico. Además, se observó expresión en los folículos quísticos con COD inducida y espontánea. En los animales con COD inducida hallamos una expresión similar de REA en estructuras quísticas en relación a lo detectado en folículos controles. Sin embargo, los folículos quísticos espontáneos presentaron un aumento significativo de los niveles de REA en las células de la granulosa en relación a todas las otras categorías estudiadas. En las células de la teca, la inmunomarcación del REA mostró una disminución en todas las categorías foliculares de los ovarios que presentaron COD en relación a ovarios controles.

Estudios de interacción de proteína-proteína *in vitro* confirmaron que la interacción RE-REA es dependiente de ligando, tanto agonistas como antagonistas (Gurevich y col., 2007). Además, estudios recientes *in vivo* revelaron que REA juega un rol significativo en la regulación transcripcional de genes regulados por estrógenos y que sus efectos parecen ser gen específico (Park y col., 2005). En un órgano como el ovario que consta de varios tipos celulares, en donde las respuestas biológicas pueden diferir, debería tenerse en cuenta

que cambios en la expresión de ciertos genes podrían deberse a efectos provocados tanto sobre el gen como sobre un tipo específico de célula.

En consonancia con su función represora de la transcripción, ratones heterocigotos que presentan un alelo mutante de REA (REA+/-) mostraron una mayor respuesta a los estrógenos en útero (Park y col., 2005) y en glándula mamaria (Mussi y col., 2006). Interesantemente, ratones REA+/- mostraron un desarrollo normal, aunque el útero presentó un mayor tamaño y una hiperproliferación celular en respuesta a estradiol (Park y col., 2005; Mussi y col., 2006; He y col., 2008). En células epiteliales mamarias, la interrupción de uno de los dos alelos de REA llevó a la manifestación de un fenotipo anormal durante el desarrollo de la glándula mamaria y evidenció una alteración en la transcripción regulada específicamente por RE α (Mussi y col., 2006).

Debido a que REA es un modulador clave de la actividad fisiológica de los RE y sabiendo que la expresión génica dependiente de los RE es esencial para el desarrollo de varios tejidos y para el funcionamiento normal de varios procesos fisiológicos y que anomalías en la expresión de RE han sido asociadas a numerosas enfermedades, una alteración en los niveles de REA o en su función represora podrían estar involucrados en la iniciación y progresión de una variedad de procesos patológicos, incluyendo a COD.

Por otro lado, debido a la variabilidad encontrada entre los grupos con COD inducida y espontánea se resalta una vez más la importancia del desarrollo de modelos experimentales en la etapa de formación de los quistes de manera de poder aclarar numerosos aspectos de los mecanismos de regulación molecular de la interacción de los receptores esteroides con las proteínas correguladoras.

La expresión de LCoR es abundante en tejidos que responden a estímulos hormonales, principalmente en cerebro y órganos reproductivos (Noriega Reyes y Langley McCarron, 2008). En el presente trabajo se demostró la expresión del ARNm de LCoR, mediante RT-PCR, tanto en células de la granulosa como en teca de ovarios bovinos, sin encontrarse cambios significativos entre folículos sanos y los quísticos. Aunque no se han encontrado diferencias en la expresión entre los grupos controles y con COD, estos resultados nos permiten inferir que la expresión de este corregulador participaría en la regulación de la foliculogénesis mediada por los receptores esteroides y que presenta características similares en ovarios de animales controles y ovarios de animales con COD.

En base a lo expuesto, y sabiendo que la formación de los complejos receptor-ligando-proteínas correguladoras es un proceso altamente dinámico, donde el equilibrio entre correpresores y coactivadores en tiempo y espacio dentro de la célula y la naturaleza del ligando determinan el estado de activación o de inhibición de los receptores nucleares (Mckenna y col., 1999; Park y col., 2005) podemos inferir que las proteínas correguladoras estudiadas en este trabajo podrían intervenir en los mecanismos de regulación de la transcripción en células ováricas y que modificaciones en los niveles de transcripción y/o traducción estarían implicados en la alteración de los mecanismos autocrinos y paracrinos intraováricos relacionados con la patogenia de la COD.

5.5- Evaluación de la expresión de receptores de hormonas esteroides y de enzimas esteroideogénicas en muestras diagnosticadas a campo

En la mayoría de los estudios previos las características endocrinas e histológicas de los quistes foliculares bovinos se han basado en el material de frigorífico (Odore y col., 1999; Ribadu y col., 2000; Calder y col., 2001; Peter, 2004), donde la historia reproductiva y la persistencia de los quistes no son conocidas. En nuestro caso, gracias a la colaboración de profesionales de la zona de influencia de la facultad, pudimos obtener muestras de quistes foliculares ocurridos espontáneamente en el ganado lechero. Esto nos permitió recolectar información relevante sobre gran cantidad de variables que se relacionan con la aparición y permanencia de estas estructuras en el ovario.

En el ganado caprino se ha observado que la presencia de un folículo quístico tiene efecto depresor sobre la población ovárica, ya que disminuye tanto el reclutamiento de folículos nuevos, como el crecimiento de aquellos existentes, lo cual coincide en parte con lo observado en el presente trabajo (Gonzalez de Bulnes y col., 1998). Se pudo apreciar que mientras estaba presente un quiste, en ese ovario cesaba el desarrollo folicular, lo que indica la influencia negativa que puede ejercer dicha estructura sobre la dinámica folicular del ovario ipsilateral. Los estudios ultrasonográficos permitieron establecer que los quistes pueden desarrollarse en ambos ovarios al mismo tiempo, o más de una estructura quística a la vez, presencia de quistes tabicados; así que también pudo observarse desarrollo folicular normal concomitante con la presencia de quistes foliculares.

También realizamos una valoración cualitativa de las muestras provenientes de quistes espontáneos diagnosticados en distintos establecimientos rurales ganaderos de la zona, con la finalidad de identificar y comparar la expresión de los receptores de hormonas esteroideas como así también de las proteínas esteroideogénicas en las distintas poblaciones celulares obtenidas mediante la técnica de aspirado folicular.

En los mamíferos, las últimas etapas del crecimiento de los folículos preovulatorios, antes del pico de LH/FSH, son acompañadas por un aumento significativo en la secreción de estradiol. Los andrógenos producidos por las células tecaes estimuladas por la LH son importantes para el sistema paracrino ovárico, dado que aumentan directamente la capacidad de respuesta de las células de la granulosa a la FSH y sirven de sustrato para la síntesis de estrógenos en los folículos preovulatorios. Las acciones específicas de la célula y temporales de LH y FSH regulan el tipo y la actividad de las enzimas esteroideogénicas expresadas dentro de las células de la granulosa y de la teca. Aunque es sabido que la LH, a través de su receptor en la superficie de las células tecaes, estimula la conversión de progesterona a androstenediona (andrógenos) en el folículo en crecimiento mediante la actividad de la enzima CyP17 y que la FSH actúa sobre las células de la granulosa para estimular la conversión enzimática de androstenediona a estradiol mediante la actividad de la enzima aromatasa, los mecanismos moleculares que median en esta fase crítica del desarrollo de los folículos aún no han sido completamente dilucidados.

En las muestras obtenidas por aspiración folicular, se evidenció la expresión del ARNm de la enzima CyP17 en las muestras que solo presentaron células de la teca y en aquellas que contenían células de la teca y de la granulosa. Numerosas publicaciones avalan un aumento en la expresión de CyP17, así como de su ARNm, en células de la teca de ovarios de pacientes con PCOS (Nelson y col., 1999; Wickenheisser y col., 2000, Jakimiuk y col., 2001; Wickenheisser y col., 2005; Perez y col., 2008). Se ha sugerido que esta alteración podría ser un evento primario o secundario al exceso de LH y/o insulina presente en pacientes con PCOS. El aumento de la LH e insulina en el PCOS lleva a una sobreexpresión de la enzima, conduciendo a una mayor producción de andrógenos intraováricos y a la anovulación por inhibición del desarrollo folicular (Perez y col., 2008). Sin embargo en bovinos, son escasas las referencias existentes respecto a la participación de la enzima CyP17 en la COD. En un estudio realizado por Hampton y col. (2004) se detectó una expresión mayor del ARNm de la enzima CyP17 en las vacas tratadas con

GnRH + LH, si se las comparaba con vacas controles. Estos hallazgos sugieren que el gen que codifica para la enzima CyP17 podría estar implicado en la etiología del COD, pero no sería necesariamente la única causa.

Al realizar el análisis cualitativo de los productos de RT-PCR correspondientes a los transcritos de la enzima CyP19 en muestras de ovario de animales con COD diagnosticados a campo, pudimos observar expresión en las células de granulosa y en aquellas muestras que presentaron ambas poblaciones celulares. Estudios realizados sobre la regulación de la expresión del gen que codifica la enzima aromatasa en células de la granulosa de ovarios bovino sanos demostraron que es regulada por múltiples vías de señalización de manera sinérgica. Se ha demostrado que la acción de FSH, a través de la vía AMPc/PKA (proteína quinasa A), presenta un efecto estimulador rápido sobre la expresión de gen de la enzima CyP19. Además, los estrógenos (a través de sus receptores específicos) juegan un rol crítico en la regulación de este gen. Los efectos indirectos mediados por el RA sobre la expresión de la enzima CyP19 probablemente se deban a un aumento en la expresión del RFSH estimulados por andrógenos tecales (Luo y Wiltbank, 2006). Una posibilidad interesante es que los estrógenos pueden estimular la producción de prostaglandinas, en particular PGE₂, y estas estimular la expresión de CyP19. Este mecanismo parece ser importante en la regulación de la expresión de CyP19 en células de cáncer de mama (Ahsan y col., 2005) y endometriosis (Zeitoun y Bulun, 1999).

En mujeres púberes con deficiencia de aromatasa se ha observado amenorrea primaria, ausencia del desarrollo de las glándulas mamarias, hipogonadismo y múltiples quistes ováricos (Lazaros y col., 2012). Estudios realizados en ratones con el gen que codifica para la enzima CyP19 silenciado mostraron individuos donde la foliculogénesis se vio interrumpida, presentaron anovulación y elevadas concentraciones séricas de LH y FSH debido al desbalance en la relación andrógenos:estrógenos (Fisher y col., 1998; Lazaros y col., 2012). En ratas adultas con ciclicidad normal la administración de inhibidores de aromatasa evidenció una falla en la síntesis de estrógenos, disminución en las concentraciones plasmáticas de estrógenos, disrupción de la ciclicidad ovárica y cambios en los niveles plasmáticos de LH así como el desarrollo de múltiples folículos quísticos (Simpson y col., 1997; Kafali y col., 2004; Baravalle y col., 2006).

Como se mencionó anteriormente, los niveles de estrógenos son controlados por la magnitud de la biosíntesis de estrógenos a partir de andrógenos tecales mediados por la

enzima aromataasa. Por lo tanto, cambios en la expresión génica, en la cantidad de aromataasa o en la actividad catalítica de la enzima podría alterar los niveles de estrógenos en los tejidos diana, incluyendo el ovario, y radicalmente modificar la acción de los estrógenos.

En este trabajo se ha podido comprobar que los transcriptos de las enzimas esteroidogénicas son detectables en las estructuras quísticas de ovario bovino dejando abierta la posibilidad de continuar con los estudios para una mejor comprensión de sus acciones durante el desarrollo folicular normal y en la patogenia de trastornos reproductivos de origen ovárico en bovino.

En las muestras a campo utilizadas en este trabajo la expresión del ARNm del RA no se detectó en las células de la teca, mientras que se expresó en gran medida en aquella muestra que solo presentó células de la granulosa y en muestras que presentaron ambas poblaciones celulares. Se ha descrito previamente que las células de la granulosa de mujeres con PCOS expresan altos niveles del ARNm del RA comparadas con ovarios controles (Vendola y col., 1998; Catteau-Jonard y col., 2008). Sin embargo, los reportes respecto a la expresión de transcriptos del RA en la patogenia de ovarios quísticos en bovinos han estado basados en muestras obtenidas en frigorífico (Alfaro y col., 2012), por lo que son escasas las referencias existentes respecto a la participación del RA en la enfermedad quística ovárica bovina, más aún en lo referido a modelos experimentales de la misma.

Numerosos estudios han descrito la distribución y la cantidad relativa de los receptores: RE α , RE β y RP en los distintos componentes tisulares de ovarios bovinos sanos y con enfermedad quística ovárica espontánea de animales sacrificados en frigorífico e inducidos experimentalmente (Garverick, 1997; Calder y col., 2001; Van den Broeck y col., 2002a,b; Jo y col., 2002; Hampton y col., 2004; Yang y Fortune, 2006; Salvetti y col., 2007; Salvetti, 2010). Analizando los transcriptos, en las células de la granulosa y de la teca de folículos quísticos de ovarios de animales con COD espontánea obtenidos de frigorífico se encontró una mayor expresión del ARNm de la isoforma α del RE en relación a la isoforma β (Alfaro y col., 2012). Estos resultados concuerdan con lo analizado en estudios previos en los cuales observaron los patrones de expresión de ambas isoformas del RE (α y β) en quistes foliculares en bovinos (Salvetti y col., 2007), ratas (Salvetti y col., 2009), ovejas (Ortega y col., 2009) y humanos (Jakimiuk y col., 2002). En este trabajo se

analizaron, además, la expresión de los transcritos de RE α y RE β en muestras de quistes espontáneos diagnosticadas a campo obtenidas por medio de aspiración folicular. La expresión del ARNm del RE β mostró una tendencia a ser similar en granulosa y en la pared completa (granulosa y teca) de los folículos quísticos diagnosticados a campo. Sin embargo, no se halló expresión en las células de teca. Con respecto al RE α , se demostró expresión del ARNm tanto en capas de la granulosa como de la teca de los folículos quísticos. El ARNm del RE α evidenció una mayor expresión con respecto al RE β similar a los resultados encontrados en quistes de animales sacrificados en frigorífico.

Estudios previos demostraron que la expresión proteica del PR permaneció sin cambios en los quistes ováricos (Salveti y col., 2007) y la expresión del ARNm evaluadas en muestras obtenidas en frigorífico revelaron un incremento significativo de la isoforma B en las células de la granulosa de folículos quísticos. Datos interesantes se observaron al analizar las distintas isoformas del RP en las muestras de quistes foliculares diagnosticados a campo. Mediante la elección de un juego de oligonucleótidos específico pudimos discriminar por RT-PCR la isoforma B del RP, lo cual nos permitió revelar que dicho ARNm se expresó en las células de la granulosa y de la teca en la mayoría de las muestras analizadas. Por otro lado, la expresión de los transcritos del RP que abarca las tres isoformas mostró una concordancia a lo hallado con la isoforma B del RP. Sin embargo, el ARNm del RP que abarca una región común de las isoformas A y B solo se expresó en dos muestras de la totalidad de las muestras evaluadas. Los resultados evidencian un predominio de una isoforma del RP en las muestras con la patología quística ovárica. En concordancia con estos resultados, varios autores describen que la expresión de las isoformas RP-A, RP-B y RP-C y la relación entre ellas en los distintos tejidos del aparato reproductor femenino varían como consecuencia del desarrollo folicular, del estado hormonal y carcinogénesis (Shyamala y col., 1990; Duffy y col., 1997; Graham y Clarke, 2002).

La evaluación de la expresión del ARNm de las distintas isoformas de los receptores de hormonas esteroides en los folículos quísticos diagnosticados a campo difieren en cierta medida a lo determinado en muestras de quistes foliculares obtenidas de frigorífico. Las diferencias encontradas con respecto a este último grupo tal vez se deban al tiempo de persistencia de las estructuras quísticas y a la alta heterogeneidad en estas muestras.

Así mismo, aportamos nuevos datos obtenidos en ciclos anovulatorios naturales, que confirman la gran variabilidad que presentan las estructuras quísticas en cuanto a su morfología, expresión del ARNm de los receptores de esteroides y de las enzimas esteroidogénicas. Además, la técnica de aspiración folicular y las técnicas de biología molecular, permitirán en futuros trabajos el estudio de mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad, teniendo en cuenta que se puede obtener una anamnesis completa de los casos de COD diagnosticados a campo y esto permitirá conocer algunos factores que pudieran influenciar en el trastorno anovulatorio.

6- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta Tesis nos permiten elaborar las siguientes conclusiones:

1. En los folículos antrales normales se lleva a cabo la síntesis del ARNm de los receptores de las hormonas gonadotróficas. Los transcritos del RFSH solo se evidenciaron en las células de la granulosa, mostrando una expresión similar en los distintos tamaños de los folículos antrales ováricos bovinos. Además, se demostró la presencia del RLH en las células de la teca de todos los folículos antrales, mientras que solamente en los folículos antrales grandes se evidenció expresión en las células de la granulosa. Los patrones de expresión se vieron alterados en los ovarios de los animales afectados por la enfermedad en comparación con los de los controles, encontrándose una baja expresión de los receptores de las hormonas gonadotróficas en las células de la granulosa de los folículos quísticos espontáneos, similar observación se halló en la expresión del ARNm de los RLH en las células de la teca.
2. La expresión del RA en las células que componen la pared folicular se detectaron en los diferentes estadios del desarrollo folicular en ovarios de animales sanos como así también en ovarios de animales con COD inducida experimentalmente y espontánea. La inmunomarcación mostró variaciones durante el desarrollo folicular normal, hallándose patrones diferentes entre los folículos ováricos de animales con enfermedad quística ovárica en relación a los controles. En cuanto a su ARNm, los folículos quísticos espontáneos evidenciaron un aumento significativo en las células de la granulosa.
3. Los juegos de oligonucleótidos elegidos para evaluar los patrones de expresión de las isoformas α y β del RE permitieron la identificación y semicuantificación en los folículos antrales de animales sanos y de animales con COD espontánea. Las células de la granulosa y de la teca de los folículos quísticos presentaron una alta expresión del ARNm que codifica para el RE α , de forma concomitante presentaron una disminución en la expresión del transcrito del RE β .

4. Se pudo constatar la existencia de al menos tres isoformas del RP mediante el diseño de oligonucleotidos que abarcaron distintas posiciones génicas del RP. En los transcritos de las distintas isoformas del RP se evidenció un patrón de expresión que se diferenciaron como consecuencia del desarrollo folicular y del estado hormonal en los animales con ciclicidad normal. En los animales con COD espontánea se observó un aumento significativo en la expresión de los transcritos que abarca las tres isoformas del RP en las células de la teca y de la isoforma B del en las células de la granulosa.
5. La enfermedad quística ovárica bovina es una importante disfunción ovárica y una de las de mayores causas de problemas reproductivos en el ganado lechero. Sabiendo que la ciclicidad normal del bovino es un complejo proceso estrictamente regulado por el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y que las hormonas esteroides y gonadotróficas son esenciales para la función ovárica de diversas especies, regulando el desarrollo, la diferenciación celular y la esteroidogénesis cualquier cambio y/o alteración en los mecanismos de transcripción y/o regulación de los receptores de hormonas esteroides y gonadotróficas podrían ser cruciales en la patogenia de esta enfermedad.
6. Las proteínas correguladoras SRC-3, REA y SMRT se evidenciaron en todos los estadios de desarrollo folicular ovárico bovino. La expresión proteica presentó variaciones a lo largo del desarrollo folicular y estos patrones de expresión se diferenciaron de los encontrados en ovarios con enfermedad quística ovárica tanto inducida como espontánea. La proteína SRC-3, así como su ARNm, en muestras de ovarios con COD espontánea se expresaron en mayor medida en folículos quísticos en comparación a las distintas categorías de folículos sanos. La expresión de REA se mantuvo similar en los folículos en crecimiento y quísticos de los animales con COD inducida, mientras que mostraron una alta expresión en las células de la granulosa de los folículos quísticos provenientes de animales con COD espontánea. En las células de la teca, la inmunomarcación del REA mostró una disminución en todas las categorías foliculares de los ovarios que presentaron COD espontánea en relación a ovarios controles. La proteína SMRT evidenció una sobreexpresión en

- las estructuras quísticas de animales con COD inducida experimentalmente y una baja expresión en las estructuras quísticas de animales con COD espontánea provenientes de frigorífico.
7. Las proteínas correguladoras SRC-1, SRC-2, SRC-3 y LCoR son sintetizadas en los distintos estratos celulares que integran el folículo ovárico. Los transcritos SRC-1 y SRC-2 mostraron diferencias en cuanto a su expresión entre las distintas estructuras foliculares analizadas. En cuanto a SRC-1, los mayores niveles se observaron en la células de la teca de los folículos antrales medianos con respecto a los folículos antrales pequeños y grandes, en los folículos quísticos espontáneos se observó un leve aumento en relación a los folículos antrales pequeños y grandes de animales controles pero estos niveles no fueron significativamente diferentes a los que se halló en los folículos antrales medianos. Los resultados de la expresión del ARNm de SRC-2 mostraron una expresión similar en la teca de los folículos antrales grandes y quísticos.
 8. La presencia de las proteínas correguladoras en las estructuras foliculares controles y quísticas sugiere que están disponibles para la interacción con los distintos receptores esteroides y por lo tanto interviniendo en la modulación de su actividad transcripcional. Los cambios en la expresión de las proteínas correguladoras hallados en los ovarios de animales con la enfermedad probablemente indiquen una contribución a las alteraciones encontradas en aquellos procesos regulados por los receptores de hormonas esteroides tales como desbalances en la proliferación y diferenciación celular así como también en la apoptosis.
 9. La falta de información sobre la historia reproductiva y de la duración de la enfermedad en los animales de los que se obtienen las muestras de quistes en playa de faena resaltan la necesidad de la utilización de modelos experimentales apropiados que reproduzcan adecuadamente la manera en que los quistes se forman. Las diferencias encontradas entre el modelo utilizado y los casos espontáneos de quistes obtenidos en frigorífico probablemente se deban a la gran cantidad de variables que intervienen en estos últimos. Este problema podría

subsanaarse a través del estudio de casos de la enfermedad espontánea que ocurre en animales diagnosticados en los rodeos de la zona, de los cuales se puede conocer la historia reproductiva además de otras variables tales como la alimentación, tratamientos, manejo general, enfermedades concomitantes, etc. Además, la utilización de técnicas poco invasivas, como por ejemplo el aspirado folicular guiado por ecografía, permitiría la obtención de muestras para el estudio de la gran cantidad de componentes que intervienen en la etiopatogenia de esta enfermedad.

7- BIBLIOGRAFÍA

- Aatinski, J.T.; Pietila, E.M.; Lakkakorpi, J.T. y Rajaniemi, H.J. (1992) *Expression of the LH/CG receptor gene in rat ovarian tissue is regulated by an extensive alternative splicing of the primary transcript*. Mol. Cell. Endocrinol. 84: 127-135.
- Adams, G.P.; Matteri, R.L.; Kastelic J.P.; Ko, J.C. y Ginther, O.J. (1992) *Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers*. J. Reprod. Fertil. 94: 177-188.
- Adams, G.P. y Pierson, R.A. (1995) *Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans*. Theriogenology. 53: 1121-1134.
- Adams, G.P.; Jaiswal, R.; Singh, J. y Malhi, P. (2008) *Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle*. Theriogenology. 69: 72-80.
- Aerts, J.M.J. y Bols, P.E.J. (2008a) *Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development*. Reprod. Dom. Anim. 45: 171-179.
- Aerts, J.M.J. y Bols, P.E.J. (2008b) *Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects*. Reprod. Dom. Anim. 45: 180-187.
- Ahsan, H.; Whittemore, A.S.; Chen, Y.; Senie, R.T.; Hamilton, S.P.; Wang, Q.; Gurvich, I. y Santella, R.M. (2005) *Variants in estrogen-biosynthesis genes CYP17 and CYP19 and breast cancer risk: a family-based genetic association study*. Breast Cancer Res. 7: R71-R81.
- Aittomäki, K.; Dieguez Lucena, J.L.; Pakarinen, P.; Sistonen, P.; Tapanainen, J.; Gromoll, J.; Kaskikari, R.; Sankila, E.M.; Lehväslaiho, H.; Engel, A.R.; Nieschlag, E.; Huhtaniemi, I. y de la Chapelle, A. (1995) *Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure*. Cell. 82: 959-968.
- Alfaro, N.S.; Salvetti, N.R.; Velázquez, M.M.L.; Stangaferro, M.L.; Rey, F. y Ortega, H.H. (2012) *Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease*. Res. Vet. Sci. 92: 478-485.
- Álvarez Díaz, A.; Pérez Esteban, H.; Martín Hernández, T.; Quincosa Torres, J.; Sánchez Puzo, A. (2009) *Fisiología de la reproducción*. En: *Fisiología animal aplicada* (Eds.: Álvarez Díaz, A.; Pérez Esteban, H.; Martín Hernández, T.; Quincosa Torres, J.; Sánchez Puzo, A.) Universidad de Antioquia, Colombia, p. 90-109.
- Amrozi, Kamimura, S.; Ando, T.; Hamana, K. (2004) *Distribution of estrogen receptor α in the dominant follicles and corpus luteum at the three stages of estrous cycle in Japanese black cows*. J. Vet. Med. Sci. 66: 1183-1188.
- Amweg, A.N.; Paredes, A.; Salvetti, N.R.; Lara, H.E. y Ortega, H.H. (2011) *Expression of melanocortin receptors mRNA, and direct effects of ACTH on steroid secretion in the bovine ovary*. Theriogenology. 75: 628-637.
- Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M. y Meltzer, P.S. (1997) *AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer*. Science. 277: 965-968.

- Aranda, A. y Pascual, A. (2001) *Nuclear hormone receptors and gene expression*. *Physiol. Rev.* 81: 1269-1304.
- Armstrong, D.G. y Webb, R. (1997) *Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins*. *Reproduction*. 2: 139-146.
- Bacich, D.J.; Rohan, R.M.; Norman, R.J. y Rodgers, R.J. (1994) *Characterization and relative abundance of alternately spliced luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the ovine ovary*. *Endocrinology*. 135: 735-744.
- Bao, B.; Garverick, H.A.; Smith, G.W.; Smith, M.F., Salfen, B.E. y Youngquist, R.S. (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.
- Bao, B. y Garverick, H.A. (1998) *Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review*. *J. Anim. Sci.* 76: 1903-1921.
- Bao, B.; Kumar, N.; Karp, R.M.; Garverick, H.A. y Sundaram, K. (2000) *Estrogen receptor- β expression in relation to the expression of luteinizing hormone receptor and cytochrome P450 enzymes in rat ovarian follicles*. *Biol. Reprod.* 63: 1747-1755.
- Baravalle, C.; Salvetti, N.R.; Mira, G.A.; Pezzone, N. y Ortega, H.H. (2006) *Microscopic Characterization of Follicular Structures in Letrozole-Induced Polycystic Ovarian Syndrome in the Rat*. *Arch. Med. Res.* 37: 830-839.
- Barioglio, C.F. (2001) *Diccionario de Producción Animal*. Brujas, Córdoba, Argentina, p. 220.
- Bartolomé, J.A.; Thatcher, W.W.; Melendez, P.; Risco, C.A. y Archbald, L.F. (2005) *Strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cysts in dairy cattle*. *Javma*. 227: 1409-1415.
- Beam, S.W. (1995) *Follicular development in postpartum cattle: effects of energy balance and dietary lipid*. Cornell University, p. 124-136.
- Beg, M.A.; Bergfelt, D.R.; Kot, K. y Ginther, O.J. (2002) *Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance*. *Biol. Reprod.* 66: 120-126.
- Beg, M.A. y Ginther, O.J. (2006) *Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors*. *Reproduction*. 132: 365-377.
- Berisha, B.; Pfaffl, M. y Schams, D. (2002) *Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrous cycle and pregnancy*. *Endocrine*. 17: 207-214.
- Bhavnani, B.R.; Tam, S.P. y Lu, X. (2008) *Structure activity relationships and differential interactions and functional activity of various equine estrogens mediated via estrogen receptors (ERs) ERalpha and ERbeta*. *Endocrinology*. 149: 4857-4870.
- Billig, H.; Furuta, I. y Hsueh, A.J. (1993) *Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis*. *Endocrinology*. 133: 2204-2212.

- Björnström, L. y Sjöberg, M. (2005) *Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes*. Mol. Endocrinol. 19: 833-842.
- Bo, G. *Actualización del ciclo estral bovino*. IV Jornadas Nacionales CABIA y I del Mercosur. Buenos Aires, Argentina, 27 al 29 de agosto de 1998.
- Bo, G. y Caccia, M. (2003) *Dinamica Folicular Ovarica en el Ganado Bovino*. En: *Reproducción de los animales domésticos* (Ed.: Ungerfeld, R.) Medibea, Montevideo, Uruguay, p. 57-69.
- Bonafos, L.D.; Kot, K. y Ginther, O.J. (1995) *Physical characteristics of the uterus during the bovine estrous cycle and early pregnancy*. Theriogenology. 43: 713-721.
- Bosu, W.T. y Peter, A.T. (1987) *Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows*. Theriogenology. 28: 725-736.
- Braun, T.; Schofield, P.R. y Sprengel, R. (1991) *Amino-terminal leucine repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity*. Embo. J. 10: 1885-1890.
- Brinkmann, A.O. (2001) *Lessons to be learned from the androgen receptor*. Eur. J. Dermatol. 11: 301-303.
- Britt, K.L. y Findlay, J.K. (2002) *Oestrogens actions in the ovary revisited*. J. Endocrinol. 175: 269-276.
- Brosens, J.J. (2004) *Steroid receptor action*. Best. Pract. Res. Cl. Ob. 18: 265-283.
- Brown, E.M.; Elmore, R.G.; Garverick, H.A. y Kesler, D.J. (1982) *Gonadotropin releasing hormone treatment of dairy cows with ovarian cysts. II. Histology of ovarian cyst walls*. Theriogenology. 17: 689-696.
- Busato, A.; Romagnoli, S.; Küpfer, U.; Rossi, G.L. y Bestetti, G.E. (1995) *LH, FSH, PRL and ACTH cells in pituitary glands of cows with ovarian cysts*. Theriogenology. 44: 233-246.
- Byers, M.; Kuiper, G.G.; Gustafsson, J.A. y Park-Sarge, O.K. (1997) *Estrogen receptor- β mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins*. Mol. Endocrinol. 11: 172-182.
- Cairolì, F.; Vigo, D.; Battocchio, M.; Faustini, M.; Veronesi, M.C. y Maffeo, G. (2002) *17 β -Estradiol, Progesterone and Testosterone Concentrations in Cystic Fluids and Response to GnRH Treatment after Emptying of Ovarian Cysts in Dairy Cows*. Reprod. Dom. Anim. 37: 294-298.
- Calder, M.D.; Salfen, B.E.; Bao, B.; Youngquist, R.S. y Garverick, H.A. (1999) *Administration of progesterone to cows with ovarian follicular cysts results in a reduction in mean LH and LH pulse frequency and initiates ovulatory follicular growth*. J. Anim. Sci. 77: 3037-3042.
- Calder, M.D.; Manikkam, M.; Salfen, B.E.; Youngquist, R.S.; Lubahn, D.B.; Lamberson, W.R. y Garverick, H.A. (2001) *Dominant bovine ovarian follicular cysts express increased levels of messenger RNAs for luteinizing hormone receptor and 3 β hydroxysteroid dehydrogenase delta (4),delta(5) isomerase compared to normal dominant follicles*. Biol. Reprod. 65: 471-476.

- Campbell, B.K. y Baird, D.T. (2001) *Inhibin A is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep*. J. Endocrinol. 169: 333-345.
- Cantley, T.C.; Garverick, H.A.; Bierschwal, C.J.; Martin, C.E. y Youngquist, R.S. (1975) *Hormonal responses of dairy cows with ovarian cysts to GnRH*. J. Anim. Sci. 41: 1666-1673.
- Caravaca Rodríguez, F.P.; Castel Genís, J.M.; Guerrero Mena, Y.; Alcalde Aldea, M.J. y González Redondo P. (2003) *Endocrinología de la reproducción*. En: *Bases de la producción animal* (Ed.: Caravaca Rodríguez, F.P.) Publicaciones de la Universidad de Sevilla, España, p. 93-96.
- Cárdenas, H. y Pope, W.F. (2002) *Androgen receptor and follicle-stimulating hormone receptor in the pig ovary during the follicular phase of the estrous cycle*. Mol. Reprod. Dev. 62: 92-98.
- Carroll, D.J.; Pierson, R.A.; Hauser, E.R.; Grummer, R.R. y Combs, D.K. (1990) *Variability of ovarian structures and plasma progesterone profiles in dairy cows with ovarian cysts*. Theriogenology. 34: 349-370.
- Casida, L.E. y Chapman A.B. (1951) *Factors affecting the incidence of cystic ovaries in a herd of Holstein cows*. J. Dairy Sci. 34: 1200-1205.
- Cassar, C.A.; Dow, M.P.; Pursley, J.R. y Smith, G.W. (2002) *Effect of the preovulatory LH surge on bovine follicular progesterone receptor mRNA expression*. Domest. Anim. Endocrin. 22: 179-187.
- Catteau-Jonard, S.; Jamin, S.P.; Leclerc, A.; Gonzales, J.; Dewailly, D. y di, C.N. (2008) *Anti-Mullerian hormone, its receptor, FSH receptor, and androgen receptor genes are overexpressed by granulosa cells from stimulated follicles in women with polycystic ovary syndrome*. J. Clin. Endocr. Metab. 93: 4456-4461.
- Cheng, G.; Weihua, Z.; Makinen, S.; Makela, S.; Saji, S.; Warner, M.; Gustafsson, J.A. y Hovatta, O. (2002) *A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary*. Biol. Reprod. 66: 77-84.
- Conneely, O.M. (2001) *Perspective: female steroid hormone action*. Endocrinology. 142: 2194-2199.
- Conneely, O.M.; Mulac-Jericevic, B.; DeMayo, F.; Lydon, J.P. y O'Malley, B.W. (2002) *Reproductive functions of progesterone receptors*. Recent. Prog. Horm. Res. 57: 339-355.
- Cook, D.L.; Smith, C.A.; Parfet, J.R.; Youngquist, R.S.; Brown, E.M. y Garverick, H.A. (1990) *Fate and turnover rate of ovarian follicular cysts in dairy cattle*. J. Reprod. Fertil. 90: 37-46.
- Cook, D.L.; Parfet, J.R.; Smith, C.A.; Moss, G.E.; Youngquist, R.S. y Garverick, H.A. (1991) *Secretory patterns of LH and FSH during development and hypothalamic and hypophyseal characteristics following development of steroid-induced ovarian follicular cyst in dairy cattle*. J. Reprod. Fertil. 91: 19-28.
- Cooke, R.G. y Benhaj K.M. (1989) *Effects of ACTH and cortisol on luteolysis in the ewe*. Anim. Reprod. Sci. 20: 201-211.

- Couse, J.F.; Yates, M.M.; Walker, V.R. y Korach, K.S. (2003) *Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ER α but not ER β* . Mol. Endocrinol. 17: 1039-1053.
- Couse, J.F.; Yates, M.M.; Sanford, R.; Nyska, A.; Nilson, J.H. y Korach, K.S. (2004) *Formation of cystic ovarian follicles associated with elevated luteinizing hormone requires estrogen receptor- β* . Endocrinology. 145: 4693-4702.
- Das, M.; Djahanbakhch, O.; Hacihanefioglu, B.; Saridogan, E.; Ikram, M.; Ghali, L.; Raveendran, M. y Storey, A. (2008) *Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovarysyndrome*. J. Clin. Endocr. Metab. 93: 881-887.
- DeFranco, D.B. (2002) *Navigating Steroid Hormone Receptors through the Nuclear Compartment*. Mol. Endocrinol. 16: 1449-1455.
- Delage-Mourroux, R.; Martini, P.G.V; Choi, I.; Kraichely, D.M.; Hoeksema, J. y Katzenellenbogen, B.S. (2000) *Analysis of Estrogen Receptor Interaction with a Repressor of Estrogen Receptor Activity (REA) and the Regulation of Estrogen Receptor Transcriptional Activity by REA*. J. Biol. Chem. 275: 35848-35856.
- Dellmann, H.D. y Eurell, J.A. (1998) *Textbook of veterinary histology*, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Estados Unidos.
- De Silva, M. y Reeves, J.J. (1988) *Hypothalamic-Pituitary function in chronically cystic and regularly cycling dairy cows*. Biol. Reprod. 38: 264-269.
- D'Haeseleer, M.; Van Poucke, M. y Van den Broeck, W. (2005) *Cell-specific localization of oestrogen receptor β (ESR2) mRNA within various bovine ovarian cell types using in situ hybridization*. Anat. Histol. Embryol. 34: 265-272.
- D'Haeseleer, M.; Cocquyt, G.; Van Cruchten, S.; Simoens, P. y Van Den Broeck, W. (2006). *Cell-specific localisation of apoptosis in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle*. Theriogenology. 65: 757-772.
- D'Haeseleer, M.; Simoens, P. y Van den Broeck, W. (2007) *Cell-specific localization of progesterone receptors in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle*. Anim. Reprod. Sci. 98: 271-281.
- Dinsmore, R.P.; White, M.E.; Guard, C.L.; Jasko, D.J.; Perdrizet, J.R.; Powers, P.M. y Smith, M.C. (1987) *A randomized double blind clinical trial of two GnRHanalogs for the treatment of cystic ovaries in dairy cows*. Cornell. Vet. 77: 235-243.
- Dobson, H. y Smith, R.F. (1995) *Stress and reproduction in farms animals*. J. Reprod. Fertil. 49: 451-461.
- Dobson, H.; Ribadu, A.Y.; Noble, K.M.; Tebble, J.E. y Ward, W.R. (2000) *Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle*. J. Reprod. Fertil. 120: 405-410.
- Donadeu, F.X. y Ginther, O.J. (2002) *Changes in concentrations of follicular-fluid factors during follicle selection in mares*. Biol. Reprod. 66: 1111-1118.

- Drummond, A.E.; Britt, K.L.; Dyson, M.; Jones, M.E.; Kerr, J.B.; O'donnell, L.; Simpson, E.R. y Findlay, J.K. (2002) *Ovarian steroid receptors and their role in ovarian function*. Mol. Cell. Endocrinol. 191: 27-33.
- Drummond, A.E. (2006) *The role of steroids in follicular growth*. Reprod. Biol. Endocrinol. 4: 16.
- Duchens, M.; Forsberg, M.; Edqvist, L-E.; Gustafsson, H. y Rodríguez-Martínez, H. (1994) *Effect of induced suprabasal progesterone levels around estrus on plasma concentrations of progesterone, estradiol-17 β and LH in heifers*. Theriogenology. 42: 1159-1169.
- Dufau, M.L., Tsai-Morris, C.H.; Hu, Z.Z. y Buczko, E. (1995) *Structure and regulation of the luteinizing hormone receptor gene*. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 53: 283-291.
- Dufau, M.L. (1998) *The Luteinizing Hormone Receptor*. Annu. Rev. Physiol. 60: 461-496.
- Duffy, D.M.; Wells, T.R.; Haluska, G.J. y Stouffer, R.L. (1997) *The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle*. Biol. Reprod. 57: 693-699.
- Dupont, S.; Krust, A.; Gansmuller, A.; Dierich, A.; Chambon, P. y Mark, M. (2000) *Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ER alpha) and beta (ER beta) on mouse reproductive phenotypes*. Development. 127: 4277-4291.
- Dyce, K.M.; Sack, W.O. y Wensing C.J.G. (1991) *Anatomía Veterinaria*. Paramericana, Buenos Aires, Argentina.
- Echternkamp, S.E. (1984) *Relationship between LH and cortisol in acutely stressed beef cows*. Theriogenology. 22: 305-311.
- Edwards, D.P. (2000) *The Role of Coactivators and Corepressors in the Biology and Mechanism of Action of Steroid Hormone Receptors*. J. Mammary Gland. Biol. 5: 307-324.
- Emmen, J.M.; Couse, J.F.; Elmore, S.A.; Yates, M.M.; Kissling, G.E. y Korach, K.S. (2005) *In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER)- α and ER β null mice indicate a role for ER β in follicular maturation*. Endocrinology. 146: 2817-2826.
- Enmark, E.; Pelto-Huikko, M.; Grandien, K.; Lagercrantz, S.; Lagercrantz, J.; Fried, G.; Nordenskjod, M. y Gustafsson, J.A. (1997) *Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization and expression pattern*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 4258-4265.
- Espey, L.L. y Lipner, H. (1994) *Ovulation*. En: *Physiology of Reproduction* (Eds: Knobil, E. y Neill, J.D) Raven, Nueva York, Estados Unidos.
- Espinoza-Villavicencio, J.L.; Ortega Pérez, R.; Palacios Espinosa, A.; Valencia Méndez, J. y Aréchiga Flores, C.F. (2007) *Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión*. Interciencia. 32: 93-99.
- Evans, A.C.O. (2003) *Characteristics of Ovarian Follicle Development in Domestic Animals*. Reprod. Dom. Anim. 38: 240-246.
- Eyestone, W.H. y Ax, R.L. (1984) *A review of ovarian follicular cysts in cows, with comparisons to the condition in women, rats and rabbits*. Theriogenology. 22: 109-125.

- Fang, X.; Wong, S. y Mitchell, B.F. (2002) *Messenger RNA for progesterone receptor isoforms in the late-gestation rat uterus*. Am. J. Physiol. Endoc. M. 283: E1167-E1172.
- Farookhi, R. (1980) *Effects of androgen on induction of gonadotrophin receptors and gonadotrophin-stimulated adenosin 3', 5'- monophosphate production in rat ovarian granulosa cells*. Endocrinology. 106: 1216-1223.
- Fathala, M.A.; Geissenger, H.D. y Liptrap, R.M. (1978) *Effects of endometrial damage and prostaglandin F2a in experimental cystic ovarian follicles in the cow*. Res. Vet. Sci. 25: 269-279.
- Fernández, I.; Bastien, Y.; Wai, T.; Nygard, K.; Lin, R.; Cormier, O.; Lee, H.S.; Eng, F.; Bertos, N.R.; Pelletier, N.; Mader, S.; Han, V.K.; Yang, X.J. y White, J.H. (2003) *Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms*. Mol. Cell. 11: 139-150.
- Fernández Sánchez, M.Á. (2008a) *El aparato reproductor de la vaca. Morfología, estructura y función*. En: *El ciclo estral de la vaca. Diagnóstico fotográfico*. (Ed.: Fernández Sánchez, M.Á.) Servet, Zaragoza, España, p. 2-10.
- Fernández Sánchez, M.Á. (2008b) *Ovogénesis, foliculogénesis y dinámica folicular*. En: *El ciclo estral de la vaca. Diagnóstico fotográfico*. (Ed.: Fernández Sánchez, M.Á.) Servet, Zaragoza, España, p. 12-14.
- Fisher, C.R.; Graves, K.H.; Parlow, A.F. y Simpson, E.R. (1998) *Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 6965-6970.
- Fitzpatrick, S.I.; Funkhouser, J.M.; Sindoni, D.M.; Stevis, P.E.; Deecher, D.C.; Bapat, A.R.; Merchenthaler, I. y Frail, D.E. (1999) *Expression of Estrogen Receptor- β Protein in Rodent Ovary*. Endocrinology. 140: 2581-2591.
- Fleischer, P.; Metzner, M.; Beyersbach, M.; Hoedemaker, M. y Klee, W. (2001) *The relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows*. J. Dairy Sci. 84: 2025-2035.
- Fang, X.; Wong, S. y Mitchell, B.F. (2002) *Messenger RNA for progesterone receptor isoforms in the late-gestation rat uterus*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 283: E1167-E1172.
- Fu, M.; Wang, C.; Wang, J.; Zhang, X.; Sakamaki, T.; Yeung, Y.G.; Chang, C.; Hopp, T.; Fuqua, S.A. y Jaffray, E. (2002) *Androgen receptor acetylation governs trans activation and MEKK1-induced apoptosis without affecting in vitro sumoylation and trans-repression function*. Mol. Cell. Biol. 22. 3373-3388.
- Gao, X.; Loggie, B.W. y Nawaz, Z. (2002) *The roles of sex steroid receptor coregulators in cancer*. Mol. Cancer. Res. 1: 1-7.
- Garnero, O. y Perusia, O. (2002) *Manual de anestias y cirugías del bovino*. San Cayetano, Santa Fe, Argentina, p. 125.
- Garverick, H.A. (1997) *Ovarian follicular cysts in dairy cows*. J. Dairy Sci. 80: 995-1004.

- Gaub, M.P.; Bellard, M.; Scheuer, I.; Chambon, P. y Sassone-Corsi, P. (1990). Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell*. 63: 1267-1276.
- Gava, N.; Clarke, C.L.; Byth, K.; Arnett-Mansfield, R.L. y De Fazio, A. (2004) *Expression of progesterone receptors A and B in the mouse ovary during the estrous cycle*. *Endocrinology*. 145: 3487-3494.
- Geneser, F. (2005) *Organos de la Reproducción*. En: *Histología*. (Ed.: Geneser, F.) Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, p. 680- 693.
- Gerasimova, T.; Thanasoula, M.N.; Zattas, D.; Seli, E.; Sakkas, D. y Lalioti, M.D. (2010) *Identification and in Vitro Characterization of Follicle Stimulating Hormone (FSH) Receptor Variants Associated with Abnormal Ovarian Response to FSH*. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 95: 529-536.
- Gigli, I; Russo, A. y Agüero, A. (2006) *Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos*. *InVet*. 8: 183-204.
- Ginther, O.J.; Wiltbank, M.C.; Fricke, P.M.; Gibbons, J.R. y Kot, K. (1996) *Selection of the dominant follicle in cattle*. *Biol. Reprod*. 55: 1187-1194.
- Ginther, O.J.; Kot, K.; Kulic, L.J. y Wiltbank, M.C. (1997) *Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle*. *Theriogenology*. 48: 75-87.
- Gojis, O.; Rudraraju, B.; Alifrangis, C.; Krell, J.; Libalova, P. y Palmieri, C. (2010) *The role of steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) in human malignant disease*. *EJSO*. 36: 224-229.
- Goldman, S.; Weiss, A.; Almalah, I. y Shalev, E. (2005) *Progesterone receptor expression in human decidua and fetal membranes before and after contractions: possible mechanism for functional progesterone withdrawal*. *Mol. Hum. Reprod*. 11: 29-77.
- Gonzalez de Bulnes, A.; Santiago, J.; Gómez, A. y López, A. *Influencia de la presencia de quistes foliculares sobre la dinámica folicular en el ganado caprino*. XXIII Jornadas científicas SEOC, Vitoria, España, 1998, p. 571-574.
- Gougelet, A.; Mueller, S.O.; Korach, K.S. y Renoir, J.M. (2007) *Oestrogen receptors pathways to oestrogen responsive elements: the transactivation function-1 acts as the keystone of oestrogen receptor (ER) beta-mediated transcriptional repression of ERalpha*. *J. Steroid. Biochem*. 104: 110-122.
- Graham, J.D.; Yeates, C.; Balleine, R.L.; Harvey, S.S.; Milliken, J.S.; Bilous, A.M. y Clarke C.L. (1995) *Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer*. *Cancer Res*. 55: 5063-5068.
- Graham, J.D. y Clarke, C.L. (1997) *Physiological Action of Progesterone in Target Tissues*. *Endocr. Rev*. 18: 502-519.
- Graham, J.D. y Clarke, C.L. (2002) *Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells*. *Breast Cancer Res*. 4: 187-190.

- Gregory, C.W.; He, B.; Johnson, R.T.; Ford, O.H.; Mohler, J.L.; French, F.S. y Wilson, E.M. (2001) *A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy*. *Cancer Res.* 61: 4315-4319.
- Gregory, C.W.; Wilson, E.M.; Apparao, K.B.C.; Lininger, R.A.; Meyer, W.R.; Kowalik, A.; Fritz, M.A. y Lessey, B.A. (2002) *Steroid Receptor Coactivator Expression throughout the Menstrual Cycle in Normal and Abnormal Endometrium*. *J. Clin. Endocr. Metab.* 87: 2960-2966.
- Griswold, M.D.; Heckert, L. y Linder, C. (1995) *The Molecular Biology of the FSH Receptor*. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 53: 215-218.
- Gromell, J.; Gudermann, T. y Nieschlag, E. (1992) *Molecular cloning of a truncated isoform of the human follicle stimulating hormone receptor*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188: 1077-1083.
- Grunert, E. y Berchtold, M. (1982) *Fertilitäts störungen beim weiblichen Rind*. Berlin and Hamburg. Paul Parey, p. 72.
- Guerra-Araiza, C. y Camacho-Arroyo, I. (2000) *Las isoformas del receptor de progesterona: función y regulación*. *Rev. Invest. Clin.* 52: 686-691.
- Gümen, A.; Guenther, J.N. y Wiltbank, M.C. (2003) *Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovulatory and ovulatory lactating dairy cows*. *J. Dairy Sci.* 86: 3184-3194.
- Gümen, A. y Wiltbank, M.C. (2005) *Length of progesterone exposure needed to resolve large follicle anovulatory condition in dairy cows*. *Theriogenology*. 63: 202-218.
- Gurevich, I.; Flores, A.M. y Aneskievich, B.J. (2007) *Corepressors of Agonist-Bound Nuclear Receptors*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 223: 288-298.
- Hackett, A.J. y Batra T.R. (1985) *The incidence of cystic ovaries in dairy cattle housed in a total confinement system*. *Can. J. Comp. Med.* 49: 55-57.
- Hafez, E.S.E. (1987) *Reproductive Cycles*. En : *Reproduction in farm animals*. (Eds.: Hafez, E.S.E. y Hafez, B.) Lea & Febiger, Filadelfia, Estados Unidos, p. 68-81.
- Hall, J.M. y McDonnell, D.P. (1999) *The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens*. *Endocrinology*. 140: 5566-5578.
- Hamilton, S.A.; Garverick, H.A.; Keisler, D.H.; Xu, Z.Z.; Loos, K.; Youngquist, R.S. y Salfen, B.E. (1995) *Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows*. *Biol. Reprod.* 53: 890-898.
- Hampton, J.H.; Manikkam, M.; Lubahn, D.B.; Smith, M.F. y Garverick, H.A. (2004) *Androgen receptor mRNA expression in the bovine ovary*. *Domest. Anim. Endocrin.* 27: 81-88.
- Han, S.J.; Lonard, D.M. y O'Malley, B.W. (2008) *Multi-modulation of nuclear receptor coactivators through posttranslational modifications*. *Trends. Endocrin. Met.* 20: 8-15.

- Handel, M.A. y Eppig, J.J. (1997) *Sexual dimorphism in the regulation of mammalian meiosis*. En: *Current topics in developmental biology meiosis and gametogenesis* (Ed.: Handel, M.A.). Academic Press, Orlando, Estados Unidos, p. 333-358.
- Hatler, T.B.; Hayes, S.H.; Laranja, D.A.; Fonseca, L.F. y Silvia, W.J. (2003) *Relationship between endogenous progesterone and follicular dynamics in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts*. Biol. Reprod. 69: 218-223.
- He, B.; Feng, Q.; Mukherjee, A.; Lonard, D.M.; DeMayo, F.J.; Katzenellenbogen, B.S.; Lydon, J.P. y O'Malley, B.W. (2008) *A Repressive Role for Prohibitin in Estrogen Signaling*. Mol. Endocrinol. 22: 344-360.
- Hickey, T.E.; Marrocco, D.L.; Gilchrist, R.B.; Norman, R.J. y Armstrong, D.T. (2004) *Interactions between androgen and growth factors in granulosa cell subtypes of porcine antral follicles*. Biol. Reprod. 71: 45-52.
- Hillier, S.G. y Tetsuka, M. (1997) *Role of androgens in follicle maturation and atresia*. Baillieres. Clin. Obstet. Gynaecol. 11: 249-260.
- Hillier, S.G.; Tetsuka, M. y Fraser, H.M. (1997) *Location and developmental regulation of androgen receptor in primate ovary*. Hum. Reprod. 12: 107-111.
- Hillier, S.G. (2001) *Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development*. Mol. Cell. Endocrinol. 179: 39-46.
- Hiroi, H.; Inoue, S.; Watanabe, T.; Goto, W.; Orimo, A.; Momoeda, M.; Tsutsumi, O.; Taketani, Y. y Muramatsu, M. (1999) *Differential immunolocalization of estrogen receptor α and β in rat ovary and uterus*. J. Mol. Endocrinol. 22: 37-44.
- Hlaing, M.; Nam, K.; Lou, J.; Pope, W.F. y Nephew, K.P. (2001) *Evidence for expression of estrogen receptor cofactor messenger ribonucleic acid in the ovary and uterus of domesticated animals (sheep, cow and pig)*. Life Sci. 68: 1427-1438.
- Hooijer, G.A. (2003) *Cystic Ovarian Disease. Treatment, Heritability and Epidemiology*. Tesis Doctoral. Groningen, Suecia.
- Hsueh, A.J.; Billig, H. y Tsafriiri, A. (1994) *Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process*. Endocr. Rev. 15: 707-724.
- Hu, Y-C.; Wang, P-H.; Yeh, S.; Wang, R-S.; Xie, C.; Xu, Q.; Zhou, X.; Chao, H-T.; Tsai, M-Y. y Chang, C. (2004) *Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor*. PNAS. 101: 11209-11214.
- Hussein-Fikret, S. y Fuller, P.J. (2005) *Expression of nuclear receptor coregulators in ovarian stromal and epithelial tumours*. Mol. Cell. Endocrinol. 229: 149-160.
- Ireland, J.J. y Richards, J.S. (1978) *Acute effects of estradiol and follicle stimulating hormone on specific binding of human [125 I]iodo-follicle-stimulating hormone to rat ovarian granulosa cells in vivo and in vitro*. Endocrinology. 102: 876-883
- Ireland, J.L.H.; Jiménez-Krassel, F.; Winn, M.E.; Burns, D.S. y Ireland, J.J. (2004) *Evidence for autocrine and paracrine roles of α 2-macroglobulin in regulation of estradiol production by granulosa cells and development of dominant follicles*. Endocrinology. 145: 2784-2794.

- Isobe, N. y Yoshimura, Y. (2000a) *Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: a DNA-end labelling histochemical study*. Theriogenology. 53: 897-904.
- Isobe, N. y Yoshimura, Y. (2000b) *Immunocytochemical study of cell proliferation in the cystic ovarian follicles in cow*. Theriogenology. 54: 1159-1169.
- Isobe, N. (2007) *Follicular cysts in dairy cows*. Anim. Sci. 78: 1-6.
- Isobe, N. y Yoshimura, Y. (2007) *Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle*. J. Reprod. Dev. 53: 1119-1124.
- Jainudeen, M.R. y Hafez, E.S. (2000) *Cattle and buffalo*. En: *Reproduction in farm animals* (Eds.: Hafez, E.S. y Hafez, B.) Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Estados Unidos, p. 161.
- Jakimiuk, A.J.; Weitsman, S.R.; Navab, A. y Magoffin, D.A. (2001) *Luteinizing Hormone Receptor, Steroidogenesis Acute Regulatory Protein, and Steroidogenic Enzyme Messenger Ribonucleic Acids Are Overexpressed in Thecal and Granulosa Cells from Polycystic Ovaries*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86: 1318-1323.
- Jakimiuk, A.J.; Weitsman, S.R.; Yen, H.W.; Bogusiewicz, M. y Magoffin, D.A. (2002) *Estrogen receptor alpha and beta expression in theca and granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 87: 5532-5538.
- Jepsen, K. y Rosenfeld, M.G. (2002) *Biological roles and mechanistic actions of corepressor complexes*. J. Cell. Sci. 115: 689-698.
- Jo, M.; Komar, C.M. y Fortune, J.E. (2002) *Gonadotropin surge induces two separate increases in messenger RNA for progesterone receptor in bovine preovulatory follicles*. Biol. Reprod. 67: 1981-1988.
- Johnson, C.J. (2004) *Cystic Ovarian Disease in Cattle on Dairies in Central and Western Ohio: Ultrasonic, Hormonal, Histologic, and Metabolic Assessments*. Partial Fulfillment of the Tesis Doctoral. School of The Ohio State University. Estados Unidos.
- Johnson, C.J.; Canning, J.; Kaneko, T.; Pru, J.K. y Tilly, J.L. (2004) *Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary*. Nature. 428: 145-150.
- Juengel, J.L.; Heath, D.A.; Quirke, L.D. y McNatty, K.P. (2006) *Oestrogen receptor alpha and beta, androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep*. Reproduction. 131: 81-92.
- Jun, J.K.; Yoon, J.S.; Ku, S.-Y.; Choi, Y.M.; Hwang, K.R.; Park, S.Y.; Lee, G.H.; Lee, W.D.; Kim, S.H.; Kim, J.G. y Moon, S.Y. (2006) *Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian responses to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET*. J. Hum. Genet. 51: 665-670.
- Kafali, H.; Iriadam, M.; Ozardali, I. y Demir, N. (2004) *Letrozole-Induced Polycystic Ovaries in the Rat: A New Model for Cystic Ovarian Disease*. Arch. Med. Res. 35: 103-108.
- Kastner, P.; Krust, A.; Turcotte, B.; Stropp, U.; Tora, L.; Gronemeyer, H. y Chambon, P. (1990) *Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B*. Embo J. 9: 1603-1614.

- Kawate, N. (2004) *Studies on the Regulation of Expression of Luteinizing Hormone Receptor in the Ovary and the Mechanism of Follicular Cyst Formation in Ruminants*. J. Reprod. Dev. 50: 1-8.
- Kesler, D.J.; Garverick, H.A.; Elmore, R.G.; Youngquist, R.S. y Bierschwal, C.J. (1979) *Reproductive hormones associated with the ovarian cyst response to GnRH*. Theriogenology. 12: 109-114.
- Kesler, D.J.; Garverick H.A.; Caudle A.B.; Elmore R.G.; Youngquist R.S. y Bierschwal C.J. (1980) *Reproductive hormone and ovarian changes in cows with ovarian cysts*. J. Dairy Sci. 63: 166-170.
- Kesler, D.J. y Garverick H.A. (1982) *Ovarian cysts in dairy cattle: a review*. J. Anim. Sci. 55: 1147-1159.
- Keller, E.T.; Ershler, W.B. y Chang, C. (1996) *The Androgen Receptor: A Mediator of Diverse Responses*. Front. Biosci. 1: 59-71.
- Kian Tee, M.; Rogatsky, I.; Tzagarakis-Foster, C., Cvorov, A.; An, J.; Christy, R.J.; Yamamoto, K.R. y Leitman, D.C. (2004) *Estradiol and Selective Estrogen Receptor Modulators Differentially Regulate Target Genes with Estrogen Receptors α and β* . Mol. Biol. Cell. 15: 1262-1272.
- Kimura, S.; Matsumoto, T.; Matsuyama, R.; Shiina, H.; Sato, T.; Takeyama, K. y Kato, S. (2007) *Androgen receptor function in folliculogenesis and its clinical implication in premature ovarian failure*. Trends. Endocrin. Met. 18: 183-189.
- Knight, P.G. y Glistler, C. (2001) *Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary*. Reproduction. 121: 503-512.
- Knopf, L.; Kastelic, J.P.; Schallenberger, E. y Ginther, O.J. (1989) *Ovarian follicular dynamics in heifers: Test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles*. Domest. Anim. Endocrin. 6: 111-119.
- Koning, H.E. (1994) *La morfología del ovario en el bovino y en el equino*, Universidad de Viena, Austria, p. 182-186.
- Kronenberg, H.M.; Melmed, S.; Polonsky, K.S. y Larsen, P.R. (2009) *Williams Tratado de Endocrinología*. Elsevier, Saunders, 11 edición, p. 559-570.
- Kuang, S.Q.; Liao, L.; Zhang, H.; Lee, A.V.; O'Malley, B.W. y Xu, J. (2004) *AIB1/SRC-3 deficiency affects insulin-like growth factor I signaling pathway and suppresses v-Ha-ras-induced breast cancer initiation and progression in mice*. Cancer Res. 64: 1875-1885.
- Kuiper, G.G.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S. y Gustafsson, J.A. (1996) *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 5925-5930.
- Labadía Mazuecos, A. (1995) *Bases fisiológicas de la reproducción en la hembra*. En: *Fisiología Veterinaria*. (Ed.: García Sacristán, A.) Interamericana, Madrid, España, p. 841-860.

- Langhout, D.J.; Spicer, L.J. y Geisert, R.D. (1991) *Development of a culture system for bovine granulosa cells: Effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis*. J. Anim. Sci. 69: 3321-3334.
- Laporte, H.M.; Hogeveen, H.; Schukken, Y.H. y Noordhuizen, J.P.T.M. (1994) *Cystic ovarian disease in Dutch dairy cattle, I- Incidence, risk-factors and consequences*. Livest. Prod. Sci. 38: 191-197.
- Lazaros, L.A.; Hatzi, E.G.; Kita, N.V.; Makrydimas, G.V.; Kaponis, A.I.; Takenaka, A.; Kosmas, I.P.; Sofikitis, N.V.; Stefos, T.I. Zikopoulos, K.A. y Georgiou, I.A. (2012) *Aromatase (CYP19) gene variants influence ovarian response to standard gonadotrophin stimulation*. J. Assist. Reprod. Genet. 29: 203-209.
- Li, P.S. y Wagner, W.C. (1983) *In vivo and in vitro studies on the effect of adrenocorticotrophic hormone or cortisol on the pituitary response to gonadotropin releasing hormone*. Biol. Reprod. 29: 25-37.
- Li, S. y Shang, Y. (2007) *Regulation of SRC family coactivators by post-translational modifications*. Cell. Signal. 19: 1101-1112.
- Liptrap, R.W. y McNally, P.J. (1976) *Steroid concentrations in cows with corticotrophin- induced cystic ovarian follicles and the effects of prostaglandin F2a and indomethacin given by intrauterine injection*. Am. J. Vet. Res. 37: 369-375.
- Lopez-Diaz, M.C. y Bosu, W.T.K. (1992) *A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants*. Theriogenology. 37: 1163-1183.
- Lucy, M.C.; Savio, J.D.; Badinga, L.; De La Sota, R.L. y Thatcher, W.W. (1992) *Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle*. J. Anim. Sci. 70: 3615-3626.
- Lucy, M.C. (2003) *Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows*. Reproduction. 61: 415-427.
- Lucy, M.C. (2007) *The bovine dominant ovarian follicle*. J. Anim. Sci. 85: E89-E99.
- Luo, W. y Wiltbank, M.C. (2006) *Distinct Regulation by Steroids of Messenger RNAs for FSHR and CYP19A1 in Bovine Granulosa Cells*. Biol. Reprod. 75: 217-225.
- Lydon, J.P.; Demayo, F.J.; Funk, C.R.; Mani, S.K.; Hughes, A.R.; Montgomery, J.C.A.; Shyamala, G.; Conneely, O.M. y O'Malley, B.W. (1995) *Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities*. Genes Dev. 9: 2266-2278.
- Maizon, D.O.; Oltenacu, P.A.; Grön, Y.T.; Strawderman, R.L. y Emanuelson, U. (2004) *Effects of diseases on reproductive performance in Swedish red and white dairy cattle*. Prev. Vet. Med. 66: 113-126.
- Malven, P.V. (1986) *Inhibition of pituitary LH release resulting from endogenous opioid peptides*. Dom. Anim. Endocrinol. 3: 135-144.
- Manikkam, M.; Calder, M.D.; Salfen, B.E.; Youngquist, R.S.; Keisler, D.H. y Garverick, H.A. (2001) *Concentrations of steroids and expression of messenger RNA for steroidogenic enzymes and gonadotropin receptors in bovine ovarian follicles of first and second waves*

- and changes in second wave follicles after pulsatile LH infusion.* Anim. Reprod. Sci. 67: 189-203.
- Martinat-Botté, F.; Renaud, G.; Madec, F.; Costiou, P. y Terqui, M. (2005) *Gestación.* En: *Ultrasonografía y Reproducción en Cerdas: principios y aplicaciones prácticas.* Intermédica, Buenos Aires, Argentina, p. 65.
- Matsuzaki, S.; Fukaya, T.; Suzuki, T.; Murakami, T.; Sasano, H. y Yajima, A. (1999) *Oestrogen receptor α and β mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle.* Mol. Human Reprod. 5: 559-564.
- McGee, E.A. y Hsueh, A.J. (2000) *Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles.* Endocr. Rev. 21: 200-214.
- McInerney, E.M.; Weis, K.E.; Sun, J.; Mosselman, S. y Katzenellenbogen, B.S. (1998) *Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras.* Endocrinology. 139: 4513-4522.
- Mckenna, N.J.; Lanz, R.B. y O'Malley, B.W. (1999) *Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology.* Endocrine Reviews. 20: 321-344.
- McNatty, K.P.; Heath, D.A.; Henderson, K.M.; Lun, S.; Hurst, P.R.; Ellis, L.M.; Montgomery, G.W.; Morrison, L. y Thurley, D.C. (1984) *Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary.* J. Reprod. Fertil. 72: 39-53.
- Moberg, G.P. (1991) *How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals.* J. Dairy Sci. 74: 304-311.
- Monniaux, D.; di Clemente, N.; Touzè, J.L.; Belville, C. y Rico, C. (2008) *Intrafollicular Steroids and Anti-Müllerian Hormone During Normal and Cystic Ovarian Follicular Development in the Cow.* Biol. Reprod. 79: 387-396.
- Montano, M.M.; Ekena, K.; Delage-Mourroux, R.; Chang, W., Martini, P. y Katzenellenbogen, B.S. (1999) *An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 6947-6952.
- Mulac-Jericevic, B. y Conneely, O.M. (2004) *Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors.* Reproduction. 128: 139-146.
- Murphy, M.G.; Enright, W.J.; Crowe, M.A.; McConnell, K.; Boland, M.P. y Roche, J.F. (1991) *Effect of dietary intake of pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle in beef heifers.* J. Reprod. Fertil. 92: 333-338.
- Mussi, P.; Liao, L.; Park, S.; Ciana, P.; Maggi, A.; Katzenellenbogen, B.S.; Xu, J. y O'Malley, B.W. (2006) *Haploinsufficiency of the corepressor of estrogen receptor activity (REA) enhances estrogen receptor function in the mammary gland.* PNAS. 103: 16716-16721.
- Nakao, T.; Tsurubayashi, M.; Horiuchi, S.; Nomura, T.; Ishibashi, Y.; Kubo, M. y Kawata, K. (1979) *Effects of systematic application of human Chorionic Gonadotropin, Gonadotropin-releasing hormone analog and bovine anterior pituitary gonadotropin in cows with cystic ovarian disease.* Theriogenology. 11: 385-397.

- Nakao, T.; Sugihashi, A.; Kawata, K.; Nakamura, H.; Shirakawa, J.; Inuma, M.; Tsurubayashi, M. y Horiuchi, S. (1985) *Effects of an analog of PGF₂ α (Ono-1052) on cows with luteinized ovarian cysts following treatment with GnRH analog (Fertirelin acetate)*. Theriogenology. 24: 425-433.
- Nakao, T. y Grünert, E. (1990) *Effects of dystocia on postpartum adrenocortical function in dairy cows*. J. Dairy Sci. 73: 2801-2806.
- Nanda, A.S.; Ward, W.R. y Dobson, H. (1989) *The relationship between milk yield and cystic ovarian disease in cattle*. Br. Vet. J. 145: 39-45.
- Natraj, V. y Richards, J.S. (1993) *Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles*. Endocrinology. 133: 761-769.
- Nelson, V.L.; Legro, R.S.; Strauss III, J.F. y McAllister, J.M. (1999) *Augmented Androgen Production Is a Stable Steroidogenic Phenotype of Propagated Theca Cells from Polycystic Ovaries*. Mol. Endocrinol. 13: 946-957.
- Nilsson, E.E. y Skinner, M.K. (2001) *Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis*. J. Soc. Gynecol. Invest. 8: 17-20.
- Niswender, G.D.; Juengel, J.L.; Silva, P.J.; Rollyson, M.K. y McIntush, E.W. (2000) *Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum*. Physiol. Rev. 80: 1-29.
- Noble, K.M.; Tebble, J.E.; Harvey, D. y 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.
- Noma, K.; Allis, C.D. y Grewal S.I.S. (2001) *Transitions in Distinct Histone H3 Methylation Patterns at the Heterochromatin Domain Boundaries*. Science. 293: 1150-1155.
- Noriega Reyes, M.Y. y Langley McCarron, E. (2008) *Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario*. Cancerología. 3: 29-40.
- O'Brien, M.L.; Park, K.; In, Y. y Park-Sarge, O.K. (1999) *Characterization of estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid and protein expression in rat granulosa cells*. Endocrinology. 140: 4530-4541.
- Odore, R.; Re, G.; Badino, P.; Donn, A.; Vigo, D.; Biolatti, B. y Girardi, C. (1999) *Modifications of receptor concentrations for adrenaline, steroid hormones, prostaglandin F₂ α and gonadotropins in hypophysis and ovary of dairy cows with ovarian cysts*. Pharmacol. Res. 39: 297-304.
- Ogle, T.F.; Dai, D.; George, P. y Mahesh, V.B. (1998) *Regulation of the progesterone receptor and estrogen receptor in decidua basalis by progesterone and estradiol during pregnancy*. Biol. Reprod. 58: 1188-1198.
- Ogle, T.F. (2002) *Progesterone-action in the decidual mesometrium of pregnancy*. Steroids. 67: 1-14.
- Okada, A.; Sato, T.; Ohta, Y. y Iguchi, T. (2005) *Sex steroid hormone receptors in the developing female reproductive tract of laboratory rodents*. J. Toxicol. Sci. 30: 75-89.

- Onate, S.A.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.J. y O'Malley, B.W. (1995) *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily*. Science. 270: 1354-1357.
- Opsomer, G.; Wensing, T.; Laevens, H.; Coryn, M. y De Kruif, A. (1999) *Insulin resistance: the link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows?* Anim. Reprod. Sci. 56: 211-222.
- Orisaka, M.; Tajima, K.; Tsang, B.K. y Kotsuji, F. (2009) *Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development*. Journal of Ovarian Research. 2: 1-9.
- Ortega, H.H.; Amable, P.; Salvetti, N.R.; Dallard, B.E.; Baravalle, C.; Barbeito, C.G. y Gimeno, E.J. (2007a) *Intraovarian localization of growth factors in induced cystic ovaries in rats*. Anat. Histol. Emryol. 36: 94-102.
- Ortega, H.H.; Salvetti, N.R.; Müller, L.A.; Amable, P.; Lorente, J.A.; Barbeito, C.G. y Gimeno, E.J. (2007b) *Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with Cystic Ovarian Disease*. J. Comp. Pathol. 136: 222-230.
- Ortega, H.H.; Palomar, M.M.; Acosta, J.C.; Salvetti, N.R.; Dallard, B.E.; Lorente, J.A.; Barbeito, C.G. y Gimeno, E.J. (2008) *Insulin-like growth factor I in ovarian follicles and follicular fluid from cows with spontaneous and induced Cystic Ovarian Disease*. Res. Vet. Sci. 84: 419-427.
- Ortega, H.H.; Salvetti, N.R. y Padmanabhan, V. (2009) *Developmental programming: prenatal androgen excess disrupts ovarian steroid receptor balance*. Reproduction. 137: 865-877.
- Ortega, H.H.; Rey, F.; Velazquez, M.M.L. y Padmanabhan, V. (2010) *Developmental Programming: Effect of Prenatal Steroid Excess on Intraovarian Components of Insulin Signaling Pathway and Related Proteins in Sheep*. Biol. Reprod. 82: 1065-1075.
- Oursler, M.J.; Kassem, M.; Turner, R.; Riggs, B.L. y Spelsberg, T.C. (1996) *Regulation of bone cell function by gonadal steroids*. En: *Osteoporosis* (Eds.: Marcus, R.; Feldman, D. y Kelsey, J.) Elsevier, San Diego, California, Estados Unidos, p. 237-260.
- Paech, K.; Webb, P.; Kuiper, G.G.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.; Kushner, P.J. y Scanlan, T.S. (1997) *Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites*. Science. 277: 1508-1510.
- Palomar, M.M.; Acosta, J.C.; Salvetti, N.R.; Müller, L.A.; Taboada, A.F.; Manzini, R.A. y Ortega H.H. (2007) *Valoración de la exposición a luz permanente como modelo de enfermedad quística ovárica (COD) en bovinos*. Rev. Med. Vet. 87: 223-226.
- Palomar, M.M.; Acosta, J.C.; Salvetti, N.R.; Barberis, F.; Beldomenico, P.M.; Garnero, O. y Ortega H.H. (2008) *Treatment of cystic ovarian disease with Naloxone in high production Dairy cows*. J. vet. Pharmacol. Therap. 31: 184-186.
- Park, S.E.; Xu, J.; Frolova, A.; Liao, L.; O'Malley, B.W. y Katzenellenbogen, B.S. (2005) *Genetic Deletion of the Repressor of Estrogen Receptor Activity (REA) Enhances the Response to Estrogen in Target Tissues In vivo*. Mol. Cell. Biol. 25: 1989-1999.
- Parrott, J.A. y Skinner, M.K. (1998) *Developmental and Hormonal Regulation of Keratinocyte Growth Factor Expression and Action in the Ovarian Follicle*. Endocrinology. 139: 228-235.

- Payne, A.H. (1990) *Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side chain cleavage and 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in Leydig cells*. Biol. Reprod. 42: 399-404.
- Pederson, T. (1970) *Follicular kinetics in the ovary of the cyclic mouse*. Acta Endocrinol. 64: 304-323.
- Pelletier, G.; Labrie, C. y Labrie, F. (2000) *Localization of oestrogen receptor α , oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs*. J. Endocrinol. 165: 359-370.
- Perrone, M.S.; Peter, A.T. y Asem, E.K. (1995) *Fibronectins: role in reproduction and future applications*. Assist. Reprod. Technol. Androl. 7: 103-125.
- Pérez, C.C; Rodríguez, I.; España, F.; Hidalgo, M.; Dorado, J. y Sanz, J. (2002) *Utilidad del perfil de progesterona plasmática y ecografía en el diagnóstico de quistes ováricos en vacas repetidoras de celos*. Rev. Col. Cienc. Pec. 15: 51-62.
- Perez, M.S.; Cerrone, G.E.; Benencia, H.; Marquez, N.; De Piano, E. y Frechtel, G.D. (2008) *Polimorfismos en los genes Cyp11a y Cyp17 y Etiología del Hiperandrogenismo en Pacientes con Poliquistosis Ovarica*. Medicina. 68: 129-134.
- Perez Mayorga, M.; Gromoll, J.R.; Behre, G.H.M.; Gassner, C.; Nieschlag, E. y Simoni, M. (2000) *Ovarian Response to Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Stimulation Depends on the FSH Receptor Genotype*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 85: 3365-3369.
- Perissi, V. y Rosenfeld, M.G. (2005) *Controlling Nuclear Receptors: The Circular Logic of Cofactor Cycles*. Nat. Rev. Mol. Cell. Bio. 6: 542-554.
- Peter, A.T. (1997) *Infertility due to abnormalities of the ovaries*. En: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (Ed.: Youngquist, R.S.) WB Saunders, Philadelphia, p. 349-354.
- Peter, A.T. y Dhanasekaran, N. (2003) *Apoptosis of granulosa cells: a review on the role of MAPK-signaling modules*. Reprod. Dom. Anim. 38: 209-213.
- Peter, A.T. (2004) *An update on cystic ovarian degeneration in cattle*. Reprod. Domest. Anim. 39: 1-7.
- Peter, A.T.; Levine, H.; Drost, M. y Bergfelt, D.R. (2009) *Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle*. Theriogenology. 71: 1343-1357.
- Pettersson, K.; Delaunay, F. y Gustafsson, J.A. (2000) *Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling*. Oncogene. 19: 4970-4978.
- Pursley, J.R., Mee, M.O. y Wiltbank, M.C. (1995) *Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF (2-alpha), and GnRH*. Theriogenology 44: 915-923.
- Qi, C.; Chang, J.; Zhu, Y.; Yeldandi, A.V.; Rao, S.M. y Zhu, Y.J. (2002) *Identification of protein arginine methyltransferase 2 as a coactivator for estrogen receptor alpha*. J. Biol. Chem. 277: 28624-28630.

- Quirk, S.M.; Cowan, R.G.; Harman, R.M.; Hu, C.L. y Porter, D.A. (2004) *Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival*. J. Anim. Sci. 82: E40-E52.
- Rahe, C.H.; Owens, R.E.; Fleeger, J.L.; Newton, H.J. y Harms, P.G. (1980) *Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle*. Endocrinology. 107: 498-503.
- Redmer, D.A. y Reynolds, L.P. (1996) *Angiogenesis in the ovary*. Rev. Reprod. 1: 182-192.
- Refsal, K.R.; Jarrin-Maldonado, J.H. y Nachreiner, R.F. (1987) *Endocrine profiles in cows with ovarian cysts experimentally induced by treatment with exogenous estradiol or adrenocorticotrophic hormone*. Theriogenology. 28: 871-889.
- Refsal, K.R.; Jarrin-Maldonado, J.H. y Nachreiner, R.F. (1988) *Basal and estradiol induced release of gonadotropins in dairy cows with naturally occurring ovarian cysts*. Theriogenology. 30: 679-693.
- Reinholz, M.M.; Zschunke, M.A. y Roche, P.C. (2000) *Loss of Alternately Spliced Messenger RNA of the Luteinizing Hormone Receptor and Stability of the Follicle-Stimulating Hormone Receptor Messenger RNA in Granulosa Cell Tumors of the Human Ovary*. Gynecol. Oncol. 79: 264-271.
- Rey, F.; Rodríguez, F.M.; Salvetti, N.R.; Palomar, M.M.; Barbeito, C.G.; Alfaro, N.S. y Ortega, H.H. (2010) *Insulin-Like Growth Factor-II and Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins in Bovine Cystic Ovarian Disease* J. Comp. Path. 142: 193-204.
- Ribadu, A.Y. (1993) *Ultrasonography and endocrinology of ovarian cysts in cattle*. Tesis Doctoral, University of Liverpool, Reino Unido.
- Ribadu, A.Y.; Nakada, K.; Tanaka, Y.; Moriyoshi, M.; Zhang, W.C.; Nakao, T. (1999) *Lack of LH response to exogenous estradiol in heifers with ACTH-induced ovarian follicular cysts*. J. Vet. Med. Sci. 61: 979-981.
- Ribadu, A.Y.; Nakada, K.; Moriyoshi, M.; Zhang, W.C.; Tanaka, Y. y Nakao, T. (2000) *The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers*. Anim. Reprod. Sci. 64: 21-31.
- Richards, J.S.; Russell, D.L.; Ochsner, S.; Hsieh, M.; Doyle, K.H.H.; Falender, A.E.; Lo, Y.K. y Sharma, S.C. (2000) *Novel Signaling Pathways That Control Ovarian Follicular Development, Ovulation, and Luteinization*. Endocrine. 1: 195-220.
- Richards, J.S.; Liu, Z. y Shimada, M. (2008) *Immune-like mechanisms in ovulation*. Cell. 19: 191-196.
- Rivera, G.M. y Fortune, J.E. (2003) *Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid*. Endocrinology. 144: 437-446.
- Roberts, S.J. (1986) *Hormonal disturbances resulting in infertility: cystic ovaries*. En: *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases* (Ed.: Roberts, S.J.) Woodstock, p. 478-514.

- Robinson, R.S.; Hammond, A.J.; Hunter, M.G. y Mann, G.E. (2005) *The induction of a delayed post-ovulatory progesterone rise in dairy cows: a novel model*. Domest. Anim. Endocrin. 28: 285-295.
- Robinson, R.S.; Hunter, M.G. y Mann, G.E. (2006) *Supra-basal progesterone concentrations during the follicular phase are associated with development of cystic follicles in dairy cows*. Vet. J. 172: 340-346.
- Robker, R.L. y Richards, J.S. (1998) *Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27KIP1*. Mol. Endocrinol. 12: 924-940.
- Rodríguez, F.M.; Salvetti, N.R.; Panzani, C.G.; Barbeito, C.G.; Ortega, H.H. y 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.
- Rosenfeld, C.S.; Yuan, X.; Manikkam, M.; Calder, M.D.; Garverick, H.A. y Lubahn, D.B. (1999) *Cloning, sequencing, and localization of bovine estrogen receptor-beta within the ovarian follicle*. Biol. Reprod. 60: 691-697.
- Rosenfeld, C.S.; Wagner, J.S.; Roberts, R.M. y Lubahn, D.B. (2001) *Intraovarian actions of oestrogen*. Reproduction. 122: 215-226.
- Rossing, M.A.; Daling, J.R.; Weiss, N.S.; Moore, D.E. y Self, S.G. (1994) *Ovarian tumors in a cohort of infertile women*. N. Engl. J. Med. 331: 771-776.
- Roy, S.K. y Kole, A.R. (1995) *Transforming growth factor- β receptor type II expression in the hamster ovary: cellular site(s), biochemical properties, and hormonal regulation*. Endocrinology. 136: 4610-4620.
- Ruizeveld de Winter, J.A.; Van Weerden, W.M.; Faber, P.W.; Van Steenbrugge, G.J.; Brinkmann, A.O. y Van der Kwast, T.H. (1992) *Regulation of androgen receptor expression in the human heterotransplantable prostate carcinoma PC-82*. Endocrinol. 131: 3045-3050.
- Rutter, B. y Russo A.F. (2000) *Enfoques sobre la Dinámica, el Diagnóstico y el Tratamiento de los quistes ováricos en el Bovino*. (Ed.: Dr. Edgardo Segismundo Allignani) Santa Fe, Argentina, p. 37.
- Sairam, M.R.; Jiang, L.G.; Yarney, T.A. y Khan, H. (1996) *Follitropin signal transduction: alternative splicing of the FSH receptor gene produces a dominant negative form of receptor which inhibits hormone action*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 226: 717-722.
- Salvetti, N.R.; Canal, A.M.; Gimeno, E.J. y Ortega, H.H. (2003) *Histochemical study of the extracellular matrix components in the follicular wall of induced polycystic ovaries*. Braz. J. Morphol. Sci. 20: 93-100.
- Salvetti, N.R.; Gimeno, E.J.; Lorente, J.A. y Ortega, H.H. (2004) *Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts*. Cells Tissues Organs. 178: 117-125.
- Salvetti, N.R.; Muller, L.A.; Acosta, J.C.; Gimeno, J.E. y Ortega, H.H. (2007) *Estrogen receptors α and β and progesterone receptors in ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease*. Vet. Pathol. 44: 373-378.

- Salveti, N.R., Panzani, C.G., Gimeno, E.J., Neme, L.G., Alfaro, N.S. y Ortega, H.H. (2009) *An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 68: 1477-7827.
- Salveti, N.R. (2010) *Caracterización de la expresión de receptores hormonales y del balance proliferación/apoptosis en las diferentes estructuras ováricas en la enfermedad quística ovárica bovina*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral. Argentina.
- Salveti, N.R.; Stangaferro, M.L.; Palomar, M.M.; Alfaro, N.S.; Rey, F.; Gimeno, E.J. y Ortega, H.H. (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.
- Saunders, P.T.K.; Maguire, S.M.; Gaughan, J. y Millar, M.R. (1997) *Expression of oestrogen receptor beta (ER β) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry*. *J. Endocrinol.* 154: R13-R16.
- Savio, J.D.; Boland, M.P. y Roche, J.F. (1990) *Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows*. *J. Reprod. Fert.* 88: 581-588.
- Savio, J.D.; Thatcher, W.W.; Badinga, L.; de la Sota, R.L. y Wolfenson, D. (1993) *Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows*. *J. Reprod. Fertil.* 97: 197-203
- Schams, D.; Kohlenberg, S.; Amselgruber, W.; Berisha, B.; Pfaffl, M.W. y Sinowatz, F. (2003) *Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution*. *J. Endocrinol.* 177: 305-317.
- Sciorsci, R.L.; Robbe, D.; Di Matteo, A.; Lacalandra, G.M. y Minoia, P. (2000) *Treatment of ovarian follicular cysts in dairy cows with epidural calcium-naloxone and systemic GnRH administration: a preliminary field study*. 14th International Congress on Animal Reproduction, Estocolmo.
- Segaloff, D.L.; Sprengel, R.; Nikolics, K. y Ascoli, M. (1990) *Structure of the lutropin/choriogonadotropin receptor*. *Rec. Prog. Horm. Res.* 46: 261-303.
- Senger, P.L. (2003) *Pathways to pregnancy and parturition*. En: *Current Conceptions*. (Ed.: Senger, P.L.) Universidad de Wisconsin, Madison, Estados Unidos, p. 54-62.
- Sharma, S.C.; Clemens, J.W.; Pisarska, M.D. y Richards, J.S. (1999) *Expression and function of estrogen receptor subtypes in granulosa cells: regulation by estradiol and forskolin*. *Endocrinology.* 140: 4320-4334.
- Shibaya, M.; Matsuda, A.; Hojo, T.; Acosta, T.J. y Okuda, K. (2007) *Expressions of Estrogen Receptors in the Bovine Corpus Luteum: Cyclic Changes and Effects of Prostaglandin F2 α and Cytokines*. *J. Reprod. Dev.* 53: 1059-1068.
- Short, R.V. (1962) *Steroid concentrations in normal follicular fluid and ovarian cyst fluid from cows*. *J. Reprod. Fertil.* 4: 27-45.
- Shyamala, G.; Schneider, W. y Schott, D. (1990) *Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression*. *Endocrinology.* 126: 2882-2889.
- Silvia, W.J.; Hatler, T.B.; Nugent, A.M. y Laranja Da Fonseca, L.F. (2002) *Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis*. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23: 167-177.

- Silvia, W.J.; McGinnis, A.S. y Hatler, T.B. (2005) *A comparison of adrenal gland function in lactating dairy cows with or without ovarian follicular cysts*. Biol. Reprod. 5: 19-29.
- Silva, J.R.V.; Figueiredo, J.R. y Van den Hurk, R. (2009) *Involvement of growth hormone (GH) and insulin-growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis*. Theriogenology. 71: 1193-1208.
- Simoni, M.; Gromoll, J. y Nieschlag, E. (1997) *The Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology*. Endocr. Rev. 18: 739-773.
- Simoni, M.; Nieschlag, E. y Gromoll, J. (2002) *Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction*. Hum. Reprod. Update. 8: 413-421.
- Simpson, E.R.; Bhatnagar, A.; Brodie, A.M., Brueggemeier, R.W.; Chen, S.; DeCoster, R.; Dowsett, M.; Harada, N.; Naftolin, F.; Osawa, Y.; Plourde, P.; Reed, M.J. y Santen, R.J. (1997) *Proceedings of the Fourth International Aromatase Conference*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 61: 107-425.
- Sirois, J. y Fortune, J.E. (1988) *Ovarian follicular dynamics during estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography*. Biol. Reprod. 39: 308-317.
- Sisson, S. (1982) *Sistema urogenital de los rumiantes*. En: *Anatomía de los animals domésticos*. (Ed.: Getty, R.) Masson, Barcelona, España, p. 1049-1056.
- Spicer, L.J. y Aad, P.Y. (2007) *Insulin-Like Growth Factor (IGF) 2 Stimulates Steroidogenesis and Mitosis of Bovine Granulosa Cells Through the IGF1 Receptor: Role of Follicle-Stimulating Hormone and IGF2 Receptor*. Biol. Reprod. 77: 18-27.
- Stoebel, D.P. y Moberg, G.P. (1982) *Effect of adrenocorticotrophin and cortisol on luteinizing hormone surge and estrous behavior of cows*. J. Dairy Sci. 65: 1016-1024.
- Suen, C.S.; Berrodin, T.J.; Mastroeni, R.; Cheskis, B.J.; Lyttle, C.R. y Frail, D.E. (1998) *A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity*. J. Biol. Chem. 1998: 273: 27645-27653.
- Suzuki, T.; Sasano, H.; Kimura, N.; Tamura, M.; Fukaya, T.; Yajima, A. y Nagura, H. (1994) *Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes*. Hum. Reprod. 9: 1589-1595.
- Svensson, E.C.; Markstrom, E.; Andersson, M. y Billig H. (2000) *Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotropin*. Biol. Reprod. 63: 1457-1464.
- Syvala, H.; Vienonen, A.; Ylikomi, T.; Blauer, M.; Zhuang, Y. y Tuohimaa, P. (1997) *Expression of the chicken progesterone receptor forms A and B is differentially regulated by estrogen in vivo*. Biochem. Bioph. Res. Co. 231: 573-576.
- Takeo, J. y Yamashita, S. (1999) *Two Distinct Isoforms of cDNA Encoding Rainbow Trout Androgen Receptors*. J. Biol. Chem. 274: 5674-5680.

- Takeshita, A.; Cardona, G.R.; Koibuchi, N.; Suen, C.S. y Chin, W.W. (1997) *TRAM-1, a novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1*. J. Biol. Chem. 272: 27629-27634.
- Tanner, M.M.; Grenman, S.; Koul, A.; Johannsson, O.; Meltzer, P.; Pejovic, T.; Borg, A. y Isola J.J. (2000) *Frequent Amplification of Chromosomal Region 20q12-q13 in Ovarian Cancer*. Clin. Cancer. Res. 6: 1833-1839.
- Taylor, C. y Rajamahendran, R. (1991) *Follicular dynamics corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle*. Can. J. Anim. Sci. 71: 61-67.
- Tena-Sempere, M.; Manna, P.R. y Huhtaniemi, I.T. (1999) *Molecular Cloning of the Mouse Follicle-Stimulating Hormone Receptor Complementary Deoxyribonucleic Acid: Functional Expression of Alternatively Spliced Variants and Receptor Inactivation by a C566T Transition in Exon 7 of the Coding Sequence*. Biol. Reprod. 60: 1515-1527.
- Tetsuka, M.; Whitelaw, P.F.; Bremner, W.J.; Millar, M.R.; Smyth, C.D. y Hillier, S.G. (1995) *Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary*. J. Endocrinol. 145: 535-543.
- Thatcher, W.W. y Wilcox, C.J. (1973) *Post partum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow*. J. Dairy. Sci. 56: 608-610.
- Tomic, D.; Frech, M.S.; Babus, J.K.; Symonds, D.; Furth, P.A.; Koos, R.D. y Flaws, J.A. (2007) *Effects of ERalpha overexpression on female reproduction in mice*. Reprod. Toxicol. 23: 317-325.
- Trounson, A.; Anderiesz, C.; Kaushe, G.M. y Wood, L.N. (1998) *Oocyte maturation*. Human Reprod. 3: 52-62.
- Tsafriri, A. y Chun, S-Y. (1996) *Ovulation*. En: *Reproductive Endocrinology, surgery, and technology*. (Eds.: Adashi, E.Y.; Rock, J.A. y Rosenwaks, Z.) Lippincott-Raven, Filadelfia, Estados Unidos, p. 235-249.
- Tsai-Morris, C.H.; Buczko, E.; Wang, W. y Dufau, M.L. (1990) *Intronic nature of rat luteinizing hormone receptor gene defines a soluble receptor subspecies with hormone binding activity*. J. Biol. Chem. 265: 19385-19388.
- Tsai, S.J. y Wiltbank, M.C. (1998) *Prostaglandin F2 alpha regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea*. Biol. Reprod. 58: 346-352.
- Tung, L.; Mohamed, M.K.; Hoeffler, J.P.; Takimoto, G.S. y Horwitz, K.B. (1993) *Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by Areceptors*. Mol. Endocrinol. 7: 1256-1265.
- Umayahara, Y.; Kawamori, R.; Watada, H.; Imano, E.; Iwama, N.; Morishima, T.; Yamasaki, Y.; Kajimoto, Y. y Kamada, T. (1994) *Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer*. J. Biol. Chem. 269: 16433-16442.
- Urroz, C. (2010) *Fisiología de la reproducción*. En: *Elementos de anatomía y fisiología animal*. (Ed.: Urroz, C.) EUNED, Costa Rica, p. 187-217.

- Valdez, K.E.; Cuneo, S.P.; Gorden, P.J. y Turzillo, A.M. (2005) *The role of thecal androgen production in the regulation of estradiol biosynthesis by dominant bovine follicles during the first follicular wave*. J. Anim. Sci. 83: 597-603.
- Van den Broeck, W.; D'haeseleer, M.; Coryn, M. y Simoens, P. (2002a) *Cell-specific distribution of progesterone receptors in the bovine ovary*. Reprod. Domest. Anim. 37: 314-320.
- Van Den Broeck, W.; Coryn, M.; Simoens, P. y Lauwers. H. (2002b) *Cell-specific distribution of oestrogen receptor-alpha in the bovine Ovary*. Reprod. Dom. Anim. 37: 291-293.
- Vanholder, T.; Opsomer, G. y De Kruif, A. (2006) *Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review*. Reprod. Nutr. Develop. 46: 105-119.
- Vegeto, E.; Shabaz, M.M.; Wen, D.X.; Goldman, M.E.; O'Malley, B.W. y McDonnell, D.P. (1993) *Human progesterone receptor A form is a cell and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function*. Mol. Endocrinol. 7: 1244-1255.
- Vendola, K.A.; Zhou, J.; Adesanya, O.O.; Weil, S.J. y Bondy, C.A. (1998) *Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary*. J. Clin. Invest. 101: 2622-2629.
- Vienonen, A.; Syväälä, H.; Miettinen, S.; Tuohimaa, P. y Ylikomi, T. (2002) *Expression of progesterone receptor isoforms A and B is differentially regulated by estrogen in different breast cancer cell lines*. J. Steroid. Biochem. 80: 307-313.
- Vu-Hai, M.T.; Misrahi, M.; Houllier, A.; Jolivet, A. y Milgrom, E. (1992) *Variant forms of the pig lutropin/choriogonadotropin receptor*. Biochemistry. 31: 8377-8383.
- Walters, K.A.; Allan, C.M. y Handelsman, D.J. (2008) *Androgen Actions and the Ovary*. Biol. Reprod. 78: 380-389.
- Wang, X.N. y Greenwald, G.S. (1993) *Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH- and hCG receptors in hypophysectomized mice*. J. Reprod. Fertil. 99: 403-413.
- Wang, H.; Masironi, B.; Eriksson, H. y Sahlin, L. (1999) *A comparative study of estrogen receptors α and β in the rat uterus*. Biol. Reprod. 61: 955-964.
- Wang, H.; Eriksson, H. y Sahlin, L. (2000a) *Estrogen receptors α and β in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle*. Biol. Reprod. 63: 1331-1340.
- Wang, Z.; Rose, D.W.; Hermanson, O.; Liu, F.; Herman, T.; Wu, W.; Szeto, D.; Gleiberman, A.; Kronos, A. y Pratt, K. (2000b) *Regulation of somatic growth by the p160 coactivator p/CIP*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 13549-13554.
- Webb, P.; Valentine, C.; Nguyen, P.; Price J.R.H.; Marimuthu, A.; West, B.L.; Baxter, J.D. y Kushner, P.J. (2003b) *ER β binds N-CoR in the presence of Estrogens via an LXXLL-like Motif in the N-CoR C-terminus*. BioMed. Central. 1: 1-15.
- Webb, P.; Nguyen, P. y Kushner, P.J. (2003c) *Differential SERM effects on corepressor binding dictate ER alpha activity in vivo*. J. Biol.Chem. 278: 6912-6920.
- Wei, L.L. y Miner, R.S. (1994) *Evidence for a third progesterone receptor isoform in human breast cancer cells, T47D*. Cancer Res. 54: 340-343.

- Wei, L.L.; Hawkins, P.; Baker, C.; Norris, B., Sheridan, P.L. y Quinn, P.G. (1996) *An Amino-Terminal Truncated Progesterone Receptor Isoform, PRc, Enhances Progestin-Induced Transcriptional Activity*. Mol. Endocrinol. 10: 1379-1367.
- Wei, L.L.; Norris, B.M. y Baker, C.J. (1997) *An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding*. J Steroid. Biochem. 62: 287-297.
- Weil, S.J.; Vendola, K.; Zhou, J. y Bondy, C.A. (1999) *Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 84: 2951-2956.
- Wen, D.X.; Xu, Y.F.; Mais, D.E.; Goldman, M.E. y McDonnell, D.P. (1994) *The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells*. Mol. Cell. Biol. 14: 8356-8364.
- Westergaard, L.; Christensen, I.J. y McNatty, K.P. (1986) *Steroid levels in ovarian follicular fluid related to follicle size and health status during the normal menstrual cycle in women*. Hum. Reprod. 1: 227-232.
- Whitney, E.A.; Layman, L.C.; Chan, P.J.; Lee, A.; Peak, D.B. y McDonough, P.G. (1995) *The follicle-stimulating hormone receptor gene is polymorphic in premature ovarian failure and normal controls*. Fertil. Steril. 64: 518-524.
- Wickenheisser, J.K.; Quinn, P.G.; Nelson, V.L.; Legro, R.S.; Strauss III, J.F. y Callister, J.M. (2000) *Differential Activity of the Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase and Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene Promoters in Normal and Polycystic Ovary Syndrome Theca Cells*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 85: 2304-2311.
- Wickenheisser, J.K.; Nelson-DeGrave, V.L. y McAllister, J.M. (2005) *Dysregulation of Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase Messenger Ribonucleic Acid Stability in Theca Cells Isolated from Women with Polycystic Ovary Syndrome*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 90: 1720-1727.
- Wilson, C.M. y McPhaul, M.J. (1994) *A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 1234-1238.
- Wong, H.Y.; Burghoorn, J.A.; Van Leeuwen, M.; De Ruiter, P.E.; Schippers, E.; Blok, L.J.; Li, K.W.; Dekker, H.L.; De Jong, L.; Trapman, J.; Grootegoed, J.A. y Brinkmann, A.O. (2004) *Phosphorylation of androgen receptor isoforms*. Biochem. J. 383: 267-276.
- Woolums, A.R. y Peter, A.T. (1994) *Cystic Ovarian Condition in Cattle. Part I Folliculogenesis and Ovulation*. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. (Food Animal). 16: 935-942.
- Wu, R-C.; Qin, J.; Yi, P.; Wong, J.; Tsai, S.Y.; Tsai, M-J. y O'Malley, B.W. (2004) *Selective Phosphorylations of the SRC-3/AIB1 Coactivator Integrate Genomic Responses to Multiple Cellular Signaling Pathways*. Mol. Cell. 15: 937-949.
- Wu, R-C.; Smith, C.L. y O'Malley, B.W. (2005) *Transcriptional Regulation by Steroid Receptor Coactivator Phosphorylation*. Endocr. Rev. 26: 393-399.

- Xie, Y.B.; Wang, H. y Segaloff, D.L. (1990) *Extracellular domain of lutropin/choriogonadotropin receptor expressed in transfected cells binds choriogonadotropin with high affinity*. J. Biol. Chem. 265: 21411-21414.
- Xu, Z.; Garverick, H.A.; Smith, G.W.; Smith, M.F.; Hamilton, S.A. y Youngquist, R.S. (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.
- Xu, J.; Qiu, Y.; DeMayo, F.J.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.J. y O'Malley, B.W. (1998) *Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene*. Science. 279: 1922-1925.
- Xu, J.; Liao, L.; Ning, G.; Yoshida-Komiya, H.; Deng, C. y O'Malley, B.W. (2000) *The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6379-6384.
- Xu, J. y Li, Q. (2003) *Review of the in Vivo Functions of the p160 Steroid Receptor Coactivator Family*. Mol. Endocrinol. 17: 1681-1692.
- Yang, P.; Kriatchko, A. y Shyamal, R. (2002) *Expression of ER- α and ER- β in the Hamster Ovary: Differential Regulation by Gonadotropins and Ovarian Steroid Hormones*. Endocrinology. 143: 2385-2398.
- Yang, M.Y. y Fortune, J.E. (2006) *Testosterone stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro*. Biol. Reprod. 75: 924-932.
- Yi, P.; Wu, R.; Sandquist, J.; Wong, J.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.; Means, A.R. y O'Malley, B.W. (2005) *Peptidyl-Prolyl Isomerase 1 (Pin1) Serves as a Coactivator of Steroid Receptor by Regulating the Activity of Phosphorylated Steroid Receptor Coactivator 3 (SRC-3/AIB1)*. Mol. Cell. Biol. 25: 9687-9699.
- York, B.; Yu, C.; Sagen, J.V.; Liu, Z.; Nikolai, B.C.; Wu, R.; Finegold, M.; Xu, J. y O'Malley, B.W. (2010) *Reprogramming the posttranslational code of SRC-3 confers a switch in mammalian systems biology*. PNAS. 107: 11122-11127.
- Yoshioka, K.; Iwamura, S. y 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.
- Yuan, Y.; Liao, L.; Tulis, D.A. y Xu, J. (2002) *Steroid receptor coactivator-3 is required for inhibition of neointima formation by estrogen*. Circulation 105: 2653-2659.
- Zaied, A.A.; Garverick, H.A.; Kesler, D.J.; Bierschwal, C.J.; Elmore, R.J. y Youngquist, R.S. (1981) *Luteinizing hormone response to estradiol benzoate in cows with ovarian cyst*. Theriogenology. 16: 349-358.
- Zeitoun, M.M.; Rodriguez, H.F. y Randel, R.D. (1996) *Effect of Seaton on ovarian follicular dynamics in Brahman cows*. Theriogenology. 45: 1577-1581.
- Zeitoun, K.M. y Bulun, S.E. (1999) *Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target*. Fertil. Steril. 72: 961-969.

- Zhou, G.; Hashimoto, Y.; Kwak, I.; Tsai, S.Y. y Tsai, M.J. (2003) *Role of the steroid receptor coactivator SRC-3 in cell growth*. Mol. Cell. Biol. 23: 7742-7755.
- Zhou, X. (2010) *Roles of Androgen Receptor in Male and Female Reproduction: Lessons From Global and Cell-Specific Androgen Receptor Knockout (ARKO) Mice*. J. Androl. 31: 235-243.
- Zulu, V.C. y Penny, C. (1998) *Risk Factors of Cystic Ovarian Disease in Dairy Cattle*. J. Reprod. Physiol. 44: 191-195.
- Zurvarra, F.M.; Salvetti, N.R.; Mason, J.I.; Velazquez, M.M.; Alfaro, N.S. y Ortega, H.H. (2009) *Disruption in the expression and immunolocalisation of steroid receptors and steroidogenic enzymes in letrozole-induced polycystic ovaries in rat*. Reprod. Fert. Develop. 21: 827-839.

8-PUBLICACIONES

Publicaciones en revistas con referato:

En relación con la Tesis

- **Alfaro NS**, Salvetti NR, Velázquez MML, 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.
- Ortega HH, **Alfaro NS**, Velazquez MMV, Rey F, Stangaferro ML, Marelli BE, Salvetti NR. (2012) “*Steroids receptors involvement in the pathogenesis of the abnormal persistence of ovarian follicular cysts*”. En: “*Steroids: Biosynthesis, Functions and Health Implications*” (Amada Figueiredo, C. y Cação Garces, L.) Nova Science Publishers, Inc. New York. (Aceptado).

Otras publicaciones

- Rey F, Rodríguez FM, Palomar M, Salvetti NR, **Alfaro NS**, Barbeito C, Ortega HH. (2008) “*Participación de las Proteínas de Unión a IGF-II ene. Ovario de Vacas con Enfermedad Quística*”. Internacional Jornal of Morphology. 26 (3):773.
- 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.
- Zurvarra FM, Salvetti NR, Ian Mason J, Velazquez MML, **Alfaro NS**, Ortega HH. (2009) “*Disruption in the expression and immunolocalisation of steroid receptors and steroidogenic enzymes in letrozole-induced polycystic ovaries in rat*”. Reprod. Fertil. Dev. 21: 827-839.
- Velázquez MML, **Alfaro NS**, Dupuy CRF, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. (2010) “*Heat shock protein patterns in the bovine ovary and relation with cystic ovarian disease*”. Anim. Reprod. Sci. 118: 201- 209.
- Salvetti NR, Stangaferro ML, Palomar MM, **Alfaro NS**, Rey F, Gimeno EJ, Ortega HH. (2010) “*Cell proliferation and survival mechanisms underlying the abnormal persistence of follicular cysts in bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH*”. Anim Reprod Sci. 122 (1-2): 98-110.
- Rey F, Rodriguez FM, Salvetti N R, 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.
- Velázquez MML, **Alfaro NS**, Salvetti NR, Stangaferro ML, Rey F, Panzani C, Ortega HH. (2011) “*Levels of heat shock proteins transcripts in normal follicles and ovarian follicular cysts*”. Reprod. Biol. 11: 276-283.
- Velázquez MML, **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*”. Reproductive Biology. Trabajo Enviado.
- Salvetti NR, Velazquez MML, **Alfaro NS**, Amweg AN, Ortega HH (2011). “*Expression of steroid receptors, corregulators, and associated molecules in ovarian follicles of cows with induced cystic ovarian disease*”. Theriogenology. Trabajo enviado.

Presentaciones a Congresos:

En relación con la Tesis

- **Alfaro NS**, Rodríguez F, Salvetti, NR, Ortega HH. “*Disminución en la Expresión del ARNm del Receptor de Estrógenos β en la Pared Folicular de Quistes Ováricos Bovinos*”. LIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC 2008). Mar del Plata. Buenos Aires. 19 al 22 de Noviembre de 2008.
- **Alfaro NS**, Salvetti NR, Rodriguez F, Panzani C, Velázquez M, Ortega HH. “*Expresión del coactivador de receptor de esteroides 3 (SRC-3) en ovarios bovinos normales y con enfermedad quística ovárica (COD)*”. LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC 2010). Mar del Plata. Buenos Aires. 17 al 20 de Noviembre de 2010.
- **Alfaro NS**, Salvetti NR, Velázquez M, Stangaferro M, Rey F, Ortega HH. “*Expresión de receptores de hormonas esteroides en folículos antrales de bovinos con enfermedad quística ovárica*”. II Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción animal. Buenos Aires. 25 al 26 de noviembre de 2010.
- Ortega HH, **Alfaro NS**, Velazquez MML, Amweg AN, Salvetti NR. “*Steroid Receptors and Coregulators in Ovarian Follicles of Cows with Induced Cystic Ovarian Disease*”. US-Latinoamerican Workshop in Neuroendocrinology. Viña del Mar, CHILE. 07 al 10 de Agosto, 2011.
- **Alfaro NS**, Salvetti NR, Rodríguez FM, Panzani CG, Ortega HH. “*Expresión del Correpresor de la Actividad de Receptores de Estrógeno en Folículos Ováricos Bovinos Normales y Quísticos*”. XII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, FCV – UNR. Segunda Reunión Conjunta UNL – UNR. Esperanza, Santa Fe. 16 de septiembre 2011.
- **Alfaro NS**, Amweg AN, Matiller V, Rodriguez FM, Velazquez MML, Salvetti NR, Stangaferro ML, Ortega HH. “*Expresión del receptor de andrógenos durante el desarrollo folicular en ovarios bovinos de animales sanos y su variación en animales con enfermedad quística ovárica*”. LVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC 2011). Mar del Plata. Buenos Aires. 16 al 19 de Noviembre de 2011.

Otras presentaciones

- Baravalle C, **Alfaro NS**, Andreotti C, Dallard BE, Clavinho LF, Ortega HH “*Puesta a punto de extracción de ARN total y expresión de Interleuquina-1 (alfa y beta) mediante RT-PCR en muestras de leche bovina*”. XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. I Congreso Internacional de Educación e Investigación en Ciencias Morfológicas. I Encuentro de Histotecnólogos. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba 14, 15 y 16 de Mayo de 2008.
- Amweg A, Paredes A, Salvetti N, **Alfaro NS**, Lara H, Ortega H. “*Expresión de la isoforma tipo I de la enzima 11 β -Hidroxiesteroide deshidrogenada en folículos ováricos bovinos*”. XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. I Congreso Internacional de Educación e Investigación en Ciencias Morfológicas. I Encuentro de Histotecnólogos. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba 14, 15 y 16 de Mayo de 2008.

-
- Rey F, Rodríguez F, Palomar M, Salvetti N, **Alfaro NS**, Barbeito C, Ortega H. “*Participación de las Proteínas de Unión a IGF-II en el Ovario de Vacas con Enfermedad Quística*”. XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. I Congreso Internacional de Educación e Investigación en Ciencias Morfológicas. I Encuentro de Histotecnólogos. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba 14, 15 y 16 de Mayo de 2008.
 - Amweg AN, **Alfaro NS**, Paredes A, Ortega HH. “*Expresión de la isoforma tipo I de 11 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa en las distintas estructuras ováricas bovinas con Enfermedad Quística Ovárica*”. XII Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral y II Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe. Santa Fe. Octubre 2008.
 - Rodríguez F, **Alfaro NS**, Palomar M. “*Expresión de ARNm codificante para IGF-II durante el crecimiento de folículos ováricos bovinos y en una situación patológica: enfermedad quística ovárica*”. XII Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral y II Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe. Octubre 2008.
 - Rey F, Rodríguez F, **Alfaro NS**, Salvetti NR, Barbeito CG, Ortega HH. “*Expresión de Componentes del Sistema de Factores de Crecimiento Análogos a Insulina (IGF) en el Ovario Bovino: Relación con la Enfermedad Quística Ovárica*”. LIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC 2008). Mar del Plata. Buenos Aires. 19 al 22 de Noviembre de 2008.
 - Rodríguez F, Palomar M, **Alfaro NS**, Salvetti N, Ortega HH, Rey F. “*El Factor de crecimiento análogo a Insulina –II y sus proteínas de unión en la enfermedad quística ovárica bovina*”. I Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas Veterinarias - VI Jornadas sobre la enseñanza y la Investigación en Ciencias Morfológicas Veterinarias. Rosario, Santa Fe 4, 5 y 6 de junio de 2009.
 - Velazquez M, **Alfaro NS**, Stangaferro M, Salvetti NR, Ortega HH. “*Proteínas de golpe térmico (HSPs) involucradas en la enfermedad quística ovárica bovina: sus perfiles de expresión*”. LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC 2010). Mar del Plata. Buenos Aires. 17 al 20 de Noviembre de 2010.
 - Silva MA, Stangaferro ML, Salvetti NR, **Alfaro NS**, Amweg AN, Ortega HH. “*Expresión de activita in situ en ovarios de vacas con quistes foliculares*”. II Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción animal. Buenos Aires. 25 al 26 de noviembre de 2010.

9- Anexo I

PREPARACIÓN BUFFERS Y SOLUCIONES UTILIZADAS EN IHQ

1- Solución fijadora de formol bufferado 10%:

Na ₂ HPO ₄	4,00 g	(o Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O)	10,08 g
NaH ₂ PO ₄	5,00 g	(o NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	6,50 g
Formol	100 ml		
Agua destilada	900 ml		

2- Buffer Fosfato Salino (PBS) 0,01M, pH 7,2

Solución stock (PBS 10X):

Na ₂ HPO ₄	11,4 g
(o Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O)	28,75 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	3,3 g
(o NaH ₂ PO ₄)	2,54 g
Agua destilada	1.000 ml

Solución de trabajo (PBS 1X):

NaCl	8 g
Solución Stock	100 ml
Completar con agua destilada hasta	1.000 ml

Observación:

Controlar pH y ajustar con NaHO 1N o HCl 1N gota a gota.

3- Buffer Citrato 0,01M, pH 6,00

Solución stock:

Ácido Cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ PM 192.13)	19,2 g
Disolver en 500 ml de agua destilada	
Controlar pH y ajustar con NaHO 2N gota a gota.	
Completar con agua destilada hasta	1.000 ml

Solución de trabajo:

Solución Stock	1 volumen
Completar con agua destilada hasta	500 ml
Controlar pH	

4- Solución de Bloqueo para IHQ: Suero Normal de Cabra al 10%Solución de trabajo:

Buffer Salino de Fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,2	90 ml
Suero Normal de Cabra	10 ml
Azida Sódica	0,1 g
Azul de metileno (trazas hasta lograr un leve color azul)	

5- PBS-BSA para dilución de anticuerposSolución de trabajo:

Buffer Salino de Fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,2	100 ml
Albúmina Sérica Bovina	1 g
Azida Sódica	0,1 g

PREPARACIÓN BUFFERS Y SOLUCIONES UTILIZADAS EN WB**1- Buffer de Lysis RIPA (*RadioImmuno Precipitation Assay*)**

1% IGEPAL CA630	10 ml
0.5% Desoxicolato de Sodio	5 g
0.1% SDS	1 g
1 mM EDTA	0.3722 g
50 mM Fluoruro de Sodio	2.0995 g
0.1 M PBS Csp	1000 ml

2- Solución Acrilamida/Bis-acrilamida

Acrilamida	29.2 g
N'N'-bis-metilen-acrilamida	0.8g
Agua bidestilada	100 ml
Resina de intercambio iónico (conservante)	1 cucharada

3- Buffer gel acrilamida/Bis-acrilamida 1.5M Tris-HCl, pH 8.8

Tris Base	18.15 g
Completar con agua destilada hasta	100 ml

4- Buffer gel acrilamida/Bis-acrilamida 0.5M Tris-HCl, pH 6.8

Tris Base	6 g
Completar con agua destilada hasta	100 ml

5- Persulfato de Amonio (APS) 10%

APS	100 mg
Agua destilada	1 ml

6- Buffer de corrida Tris-Glicina, pH 8,3Solución stock 4X:

Tris Base (25 mM)	6.06 g
Glicina (192mM)	28.80 g
Agua bidestilada	500 ml

Solución de trabajo 1X, 0.1 % de SDS:

Buffer 4X	250 ml
SDS	1g

7- Buffer de Transferencia pH 8.3 (Towbin transfer buffer)

Buffer de corrida 4X	250 ml
Metanol	200 ml
Agua bidestilada	550 ml

8- Rojo Ponceau (0.2% en ácido acético 0.5% en agua destilada)

Rojo Ponceau S	0.1 g
Ácido acético	0.25 ml
Agua bidestilada	49.75 ml

9- Coomasie Brilliant Blue Solución del colorante stock

Solución de Coomasie Brilliant Blue R-250 al 1% en agua desionizada.	
Solución de Uso (Coomasie 0.125%. Metanol 50%, Ácido acético 10%):	
Coomasie Brilliant Blue R-250 1%	12.5 ml
Metanol	50.0 ml
Ácido acético	10.0 ml
Agua desionizada Csp	100.0 ml

10- Solución Decolorante 1

Metanol 40%	200 ml
Ácido acético 10%	50 ml
Agua desionizada	250 ml

11- Solución Decolorante 2

Metanol 5%	25 ml
Ácido acético 7%	35 ml
Agua desionizada Csp	500 ml

12- TBS 1X

NaCl	8.065 g
KCl	0.2 g
Tris Base	2.422 g
Agua Desionizada c.s.p.	1000 ml

13- TBS 10X

NaCl (1.38M)	40.32 g
KCl (27mM)	1 g
Tris Base (200mM)	12.11 g
Agua Desionizada c.s.p.	500 ml

14- TBS-Tween (TBS-T)

TBS	1000 ml
Tween 20	0.5 ml

15- TBS-Tween-Leche 3%

TBS- Tween	100 ml
Leche en polvo descremada	3 g

16- Reactivo Quimioluminiscente Amersham ECL Plus Western Blotting Detection• **Reagents (GE.)**

Solución A	1 ml
Solución B	25 µl

- **Solución Reveladora**

Revelador (Kodak)	50 ml
Agua destilada	50 ml

- **Solución Fijadora**

Fijador y Fortalecedor (Kodak)	25 ml
Agua destilada	90 ml

PREPARACIÓN BUFFERS Y SOLUCIONES UTILIZADAS EN RT-PCR

1- Buffer Salino de Fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,2 estéril

Solución stock (PBS 10X):

Na ₂ HPO ₄	11,4 g
(o Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O)	28,75 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	3,3 g
(o NaH ₂ PO ₄)	2,54 g
Agua DEPC (0,1%)	1.000 ml

Solución de trabajo (PBS 1X):

NaCl	8 g
Solución Stock	100 ml
Completar con agua DEPC (0,1%) hasta	1.000 ml

2- Agua DEPC 0,1%

DEPC (Diethylphyrocarbonate)	1 ml
Completar con Agua bidestilada estéril	1000 ml

3- Buffer de dilución de primers TE (10mM Tris-HCL, pH 8, 1 mM EDTA)

Tris- HCl (1 M)	1 ml
EDTA (0,5 M)	0,2 ml
Agua destilada	98,8 ml

4- Buffer TAE 50XSolución Stock:

Tris base	121g
Ácido acético glacial	28.55 ml
EDTA 0.5M pH 8	50.00 ml
Agua destilada estéril	21.45 ml

Solución de trabajo (TAE 1X):

TAE 50X (Stock)	10 ml
Agua destilada	490 ml

5- Buffer de Carga FA 10X (Formaldehyde gel-Loading Buffer)

Glicerol 87% en agua DEPC	57.47 ml
EDTA 0.5mM	2 ml
0.25 % de xylencyanol FF	250 mg
0.25 %Azul de bromofenol	250 mg

6- Gel de agarosa 2%

Agarosa Ultra Pure	1.2 g
Agua destilada	58.8 ml
Buffer TAE 50X	1.2 ml

10- Anexo II

Resultado BLASTn para amplificadores de GAPDH en muestras de ovario bovino

ref|NW_001494990.1| **D** Bos taurus breed Hereford chromosome 5 genomic scaffold, Btau_4.2
 Chr5.scaffold14, whole genome shotgun sequence
 Length=3257037

Features in this part of subject sequence:
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Score = 195 bits (105), Expect = 2e-47
 Identities = 105/105 (100%), Gaps = 0/105 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 63      CCAGGTTGTCTCCTGCGACTTCAACAGCGACTCACTCT 103
              |||
Sbjct 1353539  CCAGGTTGTCTCCTGCGACTTCAACAGCGACTCACTCT 1353579

Query 104     TCTACCTTCGATGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACC 144
              |||
Sbjct 1353580  TCTACCTTCGATGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACC 1353620

Query 145     ACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTA 170
              |||
Sbjct 1353621  ACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTA 1353646
  
```

Resultados BLASTn: secuencias de los receptores de hormonas esteroides

- Resultado de Blast para amplificadores del RE α en muestras de ovario bovino

ref|NW_001495612.2| **D** Bos taTrTs breed Hereford chromosome 9 genomic scaffold, BtaT_4.2
 Chr9.scaffold91, whole genome shotgun seqTence
 Length=449753

Featres in this part of sTbject seqTence:
estrogen receptor

Score = 202 bits (109), Expect = 1e-49
 Identities = 109/109 (100%), Gaps = 0/109 (0%)
 Strand=PlTs/PlTs

```

QTery 142     AGGAACCAGGGAAAATGTGTGGAAGGCATGGTGGAGATC 181
              |||
Sbjct 346879  AGGAACCAGGGAAAATGTGTGGAAGGCATGGTGGAGATC 346879

QTery 182     TTTGACATGTTGCTGGCTACTTCGTCTCGGTTTCGTCTCG 220
              |||
Sbjct 346878  TTTGACATGTTGCTGGCTACTTCGTCTCGGTTTCGTCTCG 346801

QTery 221     GTTCCGTATGATGAATCTCCAGGGAGAAGAGTTTGTGTGCC 261
              |||
Sbjct 346800  GTTCCGTATGATGAATCTCCAGGGAGAAGAGTTTGTGTGCC 346760
  
```

- Resultado de Blast para amplificadores del RE β en muestras de ovario bovino

ref|NW_001492860.2| D Bos taurus breed Hereford chromosome 10 genomic scaffold, Btau_4.2
Chr10.scaffold73, whole genome shotgun sequence
Length=3153087

Features in this part of subject sequence:
estrogen receptor beta

Score = 143 bits (77), Expect = 5e-32
Identities = 77/77 (100%), Gaps = 0/77 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 74      AGGGATGAAGGGAAATGTGTTGAAGGAATTCTAGA 109
           |||
Sbjct 2313930  AGGGATGAAGGGAAATGTGTTGAAGGAATTCTAGA 2313895

Query 110     AATCTTTGACATGCTCCTGGCAACGACTTCAAGGTTTCGTGA 150
           |||
Sbjct 2313894  AATCTTTGACATGCTCCTGGCAACGACTTCAAGGTTTCGTGA 2313854
```

- Resultado de Blast para amplificadores del RA en muestras de ovario bovino

ref|NW_001508789.2| D Bos taurus breed Hereford chromosome X genomic scaffold, Btau_4.2
ChrX.scaffold66, whole genome shotgun sequence
Length=1510751

Features in this part of subject sequence:
androgen receptor

Score = 243 bits (131), Expect = 5e-62
Identities = 131/131 (100%), Gaps = 0/131 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 12      GTACCGCATGCACAAGTCCCGGATGTACAGCCAGTGTGTCCGAAT 57
           |||
Sbjct 437507    GTACCGCATGCACAAGTCCCGGATGTACAGCCAGTGTGTCCGAAT 437462

Query 58      GAGGCACCTCTCCCAAGAATTTGGATGGCTCCAAATCACCCCCCA 103
           |||
Sbjct 437463    GAGGCACCTCTCCCAAGAATTTGGATGGCTCCAAATCACCCCCCA 437417

Query 104     GGAATTCCTGTGCATGAAGGCACTGCTGCTCTTTAGCATT 142
           |||
Sbjct 437387    GGAATTCCTGTGCATGAAGGCACTGCTGCTCTTTAGCATT 437377
```


- Resultado de Blast para amplificadores de la isoforma RP-B en muestras de ovario bovino

ref|NW_001493276.1| **D** Bos taurus breed Hereford chromosome 15 genomic scaffold, Btau_4.2
Chr15.scaffold5, whole genome shotgun sequence
Length=844293

Features in this part of subject sequence:
progesterone receptor

Score = 137 bits (74), Expect = 9e-31
Identities = 74/74 (100%), Gaps = 0/74 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1      GCTGCGAGACCCCCAGAGAAGGACGGCGGGTTGCT 36
           |||
Sbjct 620836 GCTGCGAGACCCCCAGAGAAGGACGGCGGGTTGCT 620871

Query 37      GGACAGCGTCCTGGACACCCTGCTGGCGCCCCCGGGCCC 74
           |||
Sbjct 620872 GGACAGCGTCCTGGACACCCTGCTGGCGCCCCCGGGCCC 620909
```

- Resultado de Blast para amplificadores de la región común de las isoformas RP-A y RP-B en muestras de ovario bovino

ref|NW_001493276.1| **D** Bos taurus breed Hereford chromosome 15 genomic scaffold, Btau_4.2
Chr15.scaffold5, whole genome shotgun sequence
Length=844293

Features in this part of subject sequence:
progesterone receptor

Score = 283 bits (153), Expect = 3e-74
Identities = 153/153 (100%), Gaps = 0/153 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1      GGCGTCGCCCCGGTGCCCAAAGAAGATGCCCGCTTCTC 39
           |||
Sbjct 621307 GGCGTCGCCCCGGTGCCCAAAGAAGATGCCCGCTTCTC 621345

Query 40      GGCGCCCAGGGCCGCCCGGGCGGAGCATGACGCACCCG 78
           |||
Sbjct 621346 GGCGCCCAGGGCCGCCCGGGCGGAGCATGACGCACCCG 621383

Query 79      CCGCGCCCGGGCGCGCCTCGGTGGCCACCGCGGTGATG 116
           |||
Sbjct 621384 CCGCGCCCGGGCGCGCCTCGGTGGCCACCGCGGTGATG 621421

Query 117     GACTTCATCCACGTGCCCATCCTGCCGCTCAACTCAGCC 156
           |||
Sbjct 621422 GACTTCATCCACGTGCCCATCCTGCCGCTCAACTCAGCC 621461
```

- Resultado de Blast para amplificadores de la región E del RP en muestras de ovario bovino

ref|NW_001493276.1| D Bos taurus breed Hereford chromosome 15 genomic scaffold, Btau_4.2
Chr15.scaffold5, whole genome shotgun sequence
Length=844293

Features in this part of subject sequence:

progesterone receptor

Score = 270 bits (146), Expect = 6e-70
Identities = 146/146 (100%), Gaps = 0/146 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query  199      AGTTCCTTTAGAAAGGACTAAGAAGTCAAAACCAGTTTG  237
          |||
Sbjct  733692     AGTTCCTTTAGAAAGGACTAAGAAGTCAAAACCAGTTTG  733730

Query  238      AAGAGATGAGATAGAGAGCTCATCAAGGCAATTGGTTT  275
          |||
Sbjct  733731     AAGAGATGAGATAGAGAGCTCATCAAGGCAATTGGTTT  733768

Query  276      GAGGCAAAAAGGAGTTGTCCCTAGCTCACAGCGTTTCT  313
          |||
Sbjct  733769     GAGGCAAAAAGGAGTTGTCCCTAGCTCACAGCGTTTCT  733806

Query  315      ATCAGCTTACAAAACCTTCTTG  334
          |||
Sbjct  733807     ATCAGCTTACAAAACCTTCTTG  733827

```

Resultados BLASTn: secuencias de los receptores de hormonas gonadotróficas

- Resultado de Blast para amplificadores del RFSH en muestras de ovario bovino

ref|NW_003104293.1| D Bos taurus breed Hereford chromosome 11 genomic scaffold, alternate assembly Bos_taurus_UMD_3.1, whole genome shotgun sequence
Length=27308287

Features in this part of subject sequence:

follicle-stimulating hormone receptor

Score = 468 bits (253), Expect = 2e-129
Identities = 253/253 (100%), Gaps = 0/253 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query  48          CTCTGACCTTCATCCAGTTTGCAACAAATCTATTTTAA  86
          |||
Sbjct  13241651    CTCTGACCTTCATCCAGTTTGCAACAAATCTATTTTAA  13241613

```

```

Query 87      GGCAAGAAGTTGATGACATGACTCAGGCTAGGGGTCAG 124
          |||
Sbjct 13241612 GGCAAGAAGTTGATGACATGACTCAGGCTAGGGGTCAG 13241575

Query 125     AGAGTCTCTTTGGCAGAAGATGATGAGCCCAGCTATGC 162
          |||
Sbjct 13241574 AGAGTCTCTTTGGCAGAAGATGATGAGCCCAGCTATGC 13241537

Query 163     CAAAGGATTTGACGTGATGTACAGTGAATTTGACTATG 200
          |||
Sbjct 13241536 CAAAGGATTTGACGTGATGTACAGTGAATTTGACTATG 13241499


Query 201     ACTTATGCAATGAAGTGGTTGATGTGACTTGCTCCCCT 238
          |||
Sbjct 13241498 ACTTATGCAATGAAGTGGTTGATGTGACTTGCTCCCCT 13241461

Query 239     GAGCCAGACGCATTTAATCCATGTGAAGATATCATGGG 276
          |||
Sbjct 13241460 GAGCCAGACGCATTTAATCCATGTGAAGATATCATGGG 13241423

Query 277     GGATGATATTCTCAGAGTCTTGATA 300
          |||
Sbjct 13241423 GGATGATATTCTCAGAGTCTTGATA 13241399

```

- Resultado de Blast para amplificados del RLH en muestras de ovario bovino

ref|NW_001492928.2|  Bos taurus breed Hereford chromosome 11 genomic scaffold, Btau_4.2
Chr11.scaffold24, whole genome shotgun sequence
Length=2053381

Features in this part of subject sequence:

lutropin-choriogonadotropic hormone receptor precursor

Score = 259 bits (140), Expect = 4e-67
Identities = 140/140 (100%), Gaps = 0/140 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      TGAGTGGCTGGGATTATGACTATGGTTTCTGCTTACCC 60
          |||
Sbjct 1695993 TGAGTGGCTGGGATTATGACTATGGTTTCTGCTTACCC 1695955

Query 61     AAGACACTCCAGTGTGCTCCTGAACCAGATGCTTTCAA 99
          |||
Sbjct 1695954 AAGACACTCCAGTGTGCTCCTGAACCAGATGCTTTCAA 1695917

Query 100    TCCCTGTGAAGACATTATGGGCTACAACCTCCTTAGAG 138
          |||
Sbjct 1695916 TCCCTGTGAAGACATTATGGGCTACAACCTCCTTAGAG 1695879

Query 139    TCCTGATTTGGCTGATTAATATCCTA 165
          |||
Sbjct 1695878 TCCTGATTTGGCTGATTAATATCCTA 1695854

```

Resultados BLASTn: secuencias de las enzimas CyP17 y CyP19

- Resultado de Blast para amplificadores de CyP17 en muestras de ovario bovino

ref|NW_003104582.1| **D** Bos taurus breed Hereford chromosome 26 genomic scaffold, alternate assembly Bos_taurus_UMD_3.1, whole genome shotgun sequence
Length=1249555

Features in this part of subject sequence:
steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase

Score = 198 bits (107), Expect = 1e-48
Identities = 107/107 (100%), Gaps = 0/107 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 33      CAGCATTGGCGACCTTACCATTGACAAAGGCACAGACG 71
          |||
Sbjct 9585835  CAGCATTGGCGACCTTACCATTGACAAAGGCACAGACG 9585797

Query 72      TTGTGGTCAACCTGTGGGCACTGCATCACAGTGAGAAG 109
          |||
Sbjct 9585796  TTGTGGTCAACCTGTGGGCACTGCATCACAGTGAGAAG 9585759

Query 110     GAGTGGCAGCATCCCGACCTGTTCATGCCCCG 140
          |||
Sbjct 9585758  GAGTGGCAGCATCCCGACCTGTTCATGCCCCG 9585729
```

- Resultado de Blast para amplificadores de CyP19 en muestras de ovario bovino

ref|NW_001492841.2| **D** Bos taurus breed Hereford chromosome 10 genomic scaffold, Btau_4.2
Chr10.scaffold59, whole genome shotgun sequence
Length=1212348

Features in this part of subject sequence:
cytochrome P450 19A1

Score = 340 bits (184), Expect = 2e-91
Identities = 194/199 (97%), Gaps = 0/199 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 2      GAAGCAACAGGAGTCCTAAATGTACATTTTGGGGATTT 40
          |||
Sbjct 167309  GAAGCAACAGGAGTCCTAAATGTACATTTTGGGGATTT 167271

Query 41     TGTAATTGGTCCACTATTCTGATCTCCACAGGACTTTA 78
          |||
Sbjct 167270  TGTAATTGGTCCACTATTCTGATCTCCACAGGACTTTA 167233

Query 79     AATTACTTCCCCTGAGATCAAGTAAAACAAAATGCTTT 116
          |||
Sbjct 167232  AATTACTTCCCCTGAGATCAAGTAAAACAAAATGCTTT 167195
```

```

Query 117      TGGAAAGTGCTGAACCCAAGGCATTACAACGTCACCAGC 154
                |||
Sbjct 167194   TGGAAAGTGCTGAACCCAAGGCATTACAACGTCACCAGC 167157


Query 155      ATGGTGTCCGAAGTTGTGCCTATTGCCAGCATTGCAAT 192
                |||
Sbjct 167156   ATGGTGTCCGAAGTTGTGCCTATTGCCAGCATTGCAAT 167119

Query 193      CCTGCTGCT 202
                |||
Sbjct 167118   CCTGCTGCT 167109

```

Resultados BLASTn: secuencias de las proteínas correguladoras

- Resultado de Blast para amplificadores de SRC-1 en muestras de ovario bovino

ref|NW_001492965.1|  Bos taurus breed Hereford chromosome 11 genomic scaffold, Btau_4.2
 Chr11.scaffold51, whole genome shotgun sequence
 Length=1190367

Features in this part of subject sequence:
nuclear receptor coactivator 1

Score = 955 bits (517), Expect = 0.0
 Identities = 517/517 (100%), Gaps = 0/517 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 1      CCAACATTAAGCTCCCCGTTAGCATGACAAGTACTGC 39
                |||
Sbjct 797656   CCAACATTAAGCTCCCCGTTAGCATGACAAGTACTGC 797618

Query 40     CTGTAATAATAGTAACCGATCCTATTCAAACATCCCAG 77
                |||
Sbjct 797617   CTGTAATAATAGTAACCGATCCTATTCAAACATCCCAG 797542

Query 78     TAACACCTTTACAGAGTATGAATGAAGGACCCAATAAC 115
                |||
Sbjct 797541   TAACACCTTTACAGAGTATGAATGAAGGACCCAATAAC 797504

Query 116    TCTGTTGGCTTCTCTGCCAGTTCTCCAGTCCTCAGGCA 153
                |||
Sbjct 797503   TCTGTTGGCTTCTCTGCCAGTTCTCCAGTCCTCAGGCA 797466

Query 154    GATGAGCTCACAGAAATTCACCTAGCAGATTAATATAAC 191
                |||
Sbjct 797465    GATGAGCTCACAGAAATTCACCTAGCAGATTAATATAAC 797428

Query 192    AACCAGCAAAGCTGAATCCAAAGATAACAAAGAGATT 229
                |||
Sbjct 797427    AACCAGCAAAGCTGAATCCAAAGATAACAAAGAGATT 797390

```

```

Query 230      GCATCCATTTTAAATGAAATGATTCAGTCTGACAACAG 267
                |||
Sbjct 797389    GCATCCATTTTAAATGAAATGATTCAGTCTGACAACAG 797352

Query 268      CTCTAATGACAGCAAACCTCTGGATTCTGGGCTTCTAC 305
                |||
Sbjct 797351    CTCTAATGACAGCAAACCTCTGGATTCTGGGCTTCTAC 797314

Query 306      ATAACAATGACAGACTCTCAGATGGAGACAATAAATAC 343
                |||
Sbjct 797313    ATAACAATGACAGACTCTCAGATGGAGACAATAAATAC 797276

Query 344      TCTCAAACCAGTCACAAACTAGTGCAGCTTTTGACAAC 381
                |||
Sbjct 797275    TCTCAAACCAGTCACAAACTAGTGCAGCTTTTGACAAC 797238

Query 382      GACTGCAGAGCAGCAGTTACGGCATGCTGACATAGACA 419
                |||
Sbjct 797237    GACTGCAGAGCAGCAGTTACGGCATGCTGACATAGACA 797200


Query 420      CAAGTTGCAAAGAGGTACTGTCTTGCACAGGCACTTCC 457
                |||
Sbjct 797199    CAAGTTGCAAAGAGGTACTGTCTTGCACAGGCACTTCC 797162

Query 458      ACCTCTGCCTCTACTAACTCTTCAAGTGGTTCTTGCCC 495
                |||
Sbjct 797161    ACCTCTGCCTCTACTAACTCTTCAAGTGGTTCTTGCCC 797124

Query 496      CTCCTCTCATAGCTCACTGACCG 518
                |||
Sbjct 797123    CTCCTCTCATAGCTCACTGACCG 797100

```

- Resultado de Blast para amplificadores de SRC-2 en muestras de ovario bovino

ref|NW_001493217.2|  Bos taurus breed Hereford chromosome 14 genomic scaffold, Btau_4.2
 Chr14.scaffold27, whole genome shotgun sequence
 Length=875163

Features in this part of subject sequence:
nuclear receptor coactivator 2

Score = 315 bits (170), Expect = 4e-83
 Identities = 170/170 (100%), Gaps = 0/170 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 237      ACAGGCAGCCATTCGGCAGCTCTCCCGACGACTTGCTG 275
                |||
Sbjct 606564    ACAGGCAGCCATTCGGCAGCTCTCCCGACGACTTGCTG 606602

Query 276      TGTCCACATCCCGCAGCAGAGTCTCCGAGTGATGAAGG 314
                |||
Sbjct 606603    TGTCCACATCCCGCAGCAGAGTCTCCGAGTGATGAAGG 606640

```

```

Query 315      CGCTCTCCTGGACCAGCTGTACATGGCCTTGAGGAACT 353
          |||
Sbjct 606641   CGCTCTCCTGGACCAGCTGTACATGGCCTTGAGGAACT 606679

Query 354      TTGATGGCCTGGAGGAGATCGACAGAGCCCTGGGGATA 392
          |||
Sbjct 606680   TTGATGGCCTGGAGGAGATCGACAGAGCCCTGGGGATA 606718

Query 393      CCCGAGCTCGTCAGCCAG 411
          |||
Sbjct 606719   CCCGAGCTCGTCAGCCAG 606737

```

- Resultado de Blast para amplificadores de SRC-3 en muestras de ovario bovino

ref|NW_001493168.2| D Bos taurus breed Hereford chromosome 13 genomic scaffold, Btau_4.2
 Chr13.scaffold47, whole genome shotgun sequence
 Length=4057382

Features in this part of subject sequence:
nuclear receptor coactivator 3

Score = 366 bits (198), Expect = 1e-98
 Identities = 198/198 (100%), Gaps = 0/198 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 259      GGTTTGAGGAGTCCGCAGCCTGTACAGTCTGTCCGTCC 297
          |||
Sbjct 3586159   GGTTTGAGGAGTCCGCAGCCTGTACAGTCTGTCCGTCC 3586197

Query 298      TCCGTATAACCGGGCAGTATCTCTAGACAGTCCTGTTT 336
          |||
Sbjct 3586198   TCCGTATAACCGGGCAGTATCTCTAGACAGTCCTGTTT 3586236

Query 337      CCGTTGGCTCAAGTCCTCCAGTAAAGAATATTGGTGCT 375
          |||
Sbjct 3586237   CCGTTGGCTCAAGTCCTCCAGTAAAGAATATTGGTGCT 3586275


Query 376      TTCCCCATGTTACCAAAGCAACCCATGTTGGGCGGCAA 414
          |||
Sbjct 3586276   TTCCCCATGTTACCAAAGCAACCCATGTTGGGCGGCAA 3586314

Query 415      TCCAAGAATGATGGATAATCAGGAAAATTACGGCTCAA 453
          |||
Sbjct 3586315   TCCAAGAATGATGGATAATCAGGAAAATTACGGCTCAA 3586353

Query 454      ATA 457
          |||
Sbjct 3586354   ATA 3586357

```

- Resultado de Blast para amplificadores de LCoR en muestras de ovario bovino

ref|NW_003104582.1|  Bos taurus breed Hereford chromosome 26 genomic scaffold, alternate assembly Bos_taurus_UMD_3.1, whole genome shotgun sequence
Length=1249555

Features in this part of subject sequence:
ligand-dependent corepressor

Score = 647 bits (350), Expect = 0.0
Identities = 350/350 (100%), Gaps = 0/350 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	1	CAGCTGCCAGCCTTGGGCCGTCTGGATTACAGAATCAT	38
Sbjct	3983913	CAGCTGCCAGCCTTGGGCCGTCTGGATTACAGAATCAT	3983951
Query	39	GGACAGCACTTAATATTATCCAGGGAAGCCTCTTGGGC	77
Sbjct	3983952	GGACAGCACTTAATATTATCCAGGGAAGCCTCTTGGGC	3983990
Query	78	AAAACCACATTATGAGTTCAACCTCAGCCGTATGAAGT	116
Sbjct	3983991	AAAACCACATTATGAGTTCAACCTCAGCCGTATGAAGT	3984029
Query	117	TCAGGGGAAATGGTGCACTCAACAACATCAGTGACCTT	155
Sbjct	3984030	TCAGGGGAAATGGTGCACTCAACAACATCAGTGACCTT	3984068
Query	156	CCTTTTCTTGCGAAAACTCTGCCTTTCCAAAAATGGC	194
Sbjct	3984069	CCTTTTCTTGCGAAAACTCTGCCTTTCCAAAAATGGC	3984107
Query	195	ACTTCAAGCAAAACAAGATGGGAAAAAGGATGTGAGCC	233
Sbjct	3984108	ACTTCAAGCAAAACAAGATGGGAAAAAGGATGTGAGCC	3984146
Query	234	ATTCATCTCCTGTAGATTTAAAGATACCACAAGTTCGA	272
Sbjct	3984147	ATTCATCTCCTGTAGATTTAAAGATACCACAAGTTCGA	3984185
Query	273	GGAATGGATCTTTCTTGGGAATCTCGCACTGGTGATCA	311
Sbjct	3984186	GGAATGGATCTTTCTTGGGAATCTCGCACTGGTGATCA	3984224
Query	312	GTACAGCTATAGCTCTTTGGTAATGGGTTACAAACGG	350
Sbjct	3984225	GTACAGCTATAGCTCTTTGGTAATGGGTTACAAACGG	3984263