

MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS GONADOTROFINAS SOBRE EL OVARIO BOVINO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA

**MARELLI, B. E.¹; DÍAZ, P. U.²; AMWEG, A. N.^{1,2} ;
REY, F.^{1,2}; SALVETTI, N. R.^{1,2} & ORTEGA, H. H.^{1,2}**

RESUMEN

Las gonadotrofinas son esenciales para la función ovárica del bovino actuando, a través de la interacción con sus receptores, en la regulación del crecimiento y la maduración folicular así como en la esteroidogénesis. Se postula que cualquier modificación en los mecanismos de transcripción y/o regulación de dichos receptores podría ser un factor desencadenante de diferentes alteraciones reproductivas entre las que se encuentra la enfermedad quística ovárica (COD). La COD se define como la interrupción de los ciclos estrales normales debido a una falla en la ovulación y consecuente persistencia de un folículo que aumenta de tamaño superando el diámetro ovulatorio. Se ha demostrado que los receptores de gonadotrofinas presentan bajos niveles de expresión en ovarios enfermos en relación a ovarios sanos. Además, se han identificado una variedad de isoformas de las gonadotrofinas que podrían ejercer un rol significativo en la regulación de la expresión de los receptores funcionales e intervenir en la patogenia de la COD, siendo además, una probable causa de la falta de respuesta a los tratamientos.

Palabras claves: receptores de gonadotrofinas, ovarios, bovinos, enfermedad quística ovárica, gonadotrofinas.

SUMMARY

Mechanism of action of gonadotrophins in the bovine ovary and its participation in cystic ovarian disease.

Gonadotrophins are essential for ovarian function in cattle acting, through interaction with their receptors, in the regulation of follicular growth and maturation as in steroidogenesis. Accordingly, any change in the transcription and/or regulation mechanisms of these receptors could trigger various reproductive abnormalities such as the Cystic Ovarian Disease (COD). COD is defined as the

1.- Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. Email: bmarelli@fcv.unl.edu.ar

2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Manuscrito recibido el 23 de octubre de 2012 y aceptado para su publicación el 8 de abril de 2013.

interruption of normal estrous cycles due to the persistence of a follicle increase in size, beyond the ovulatory diameter. It has been demonstrated lower expression levels of gonadotrophin receptors in diseased ovary relative to healthy ovaries. Furthermore, a variety of gonadotrophin isoforms have been identified which could play a significant role in the expression regulation of functional receptors intervening in the COD pathogenesis and being a likely cause for the lack of treatment response.

Key words: gonadotropin receptors, ovaries, cattle, cystic ovarian disease, gonadotrophin.

INTRODUCCIÓN

Las hormonas gonadotróficas luteinizante (LH) y folículoestimulante (FSH) son partes integrales del intercambio neuroendocrino del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal que controla el ciclo estral de los rumiantes. Dichas hormonas son sintetizadas y secretadas por las células gonadotrofas adenohipofisarias luego de ser estimuladas por la interacción de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), secretada desde el hipotálamo, con sus receptores. Luego de viajar por la circulación sanguínea, la LH y FSH se unen a sus receptores específicos en el ovario desencadenando la transducción de señales intracelulares que culminan la comunicación a la largo de dicho eje (Adams *et al.*, 2008).

La secreción pulsátil de gonadotrofinas varía durante el ciclo estral, los pulsos de LH son de mayor frecuencia en la fase folicular, para posteriormente disminuir en la fase lútea. Respecto a la FSH, la secreción ocurre en ondas durante la fase lútea del ciclo, alcanzando una meseta en la fase folicular, previo al pico de LH preovulatorio. Estas variaciones ocurren debido al efecto estimulador (*retroalimentación positiva*) e inhibidor (*retroalimentación negativa*) que ejercen las hormonas esteroideas ováricas, estrógenos y progesterona, sobre el eje hipotálamo-hipofisario, originando como consecuencia los ciclos reproductivos. La acción de las hormonas esteroides sobre el

hipotálamo determina dos tipos de secreción de gonadotrofinas: “tónica”, manteniendo niveles basales, y “cíclica”, produciendo un aumento significativo en los niveles de LH y FSH, según la fase del ciclo, como se describió anteriormente (Adams *et al.*, 2008).

Al comienzo de la fase folicular, los folículos inmaduros secretan bajas cantidades de estrógenos que inducen un efecto de retroalimentación negativa en el hipotálamo e hipófisis, provocando la secreción tónica de FSH y LH. Cuando uno de los folículos alcanza la fase preovulatoria, el aumento sostenido de los niveles circulantes de estrógenos estimula el centro cíclico del hipotálamo (*retroalimentación positiva*) produciéndose el pico preovulatorio de LH. Este pico desencadena la maduración final del folículo, la ovulación y la luteinización de la estructura folicular remanente, con la consecuente formación del cuerpo lúteo (Hafez, 1987).

Por otro lado, los folículos en crecimiento secretan inhibina, la cual actúa sobre la hipófisis inhibiendo hasta niveles muy bajos la secreción de FSH sin alterar la secreción de LH. Estos niveles hormonales producen la atresia de los folículos subordinados de la onda folicular (Bo Caccia, 2003). La razón por la cual el folículo dominante puede crecer con niveles reducidos de FSH mientras que los subordinados se atresian, se relacionaría con la síntesis del receptor de LH (LHR) en las células de la granulosa del folículo dominante (Ginther *et al.*, 1996). To-

dos los folículos poseen LHR en las células de la teca y receptores de FSH (FSHR) en las células de la granulosa (Ireland Richards, 1978), pero sólo el folículo dominante adquiere niveles significativos de LHR en las células de la granulosa. La LH se unirá a los receptores de las células de la granulosa estimulando su desarrollo y una mayor producción de estrógenos que le permitirán al folículo continuar su crecimiento aunque disminuyan los niveles de FSH circulantes (Adams *et al.*, 2008).

La ovulación determina finalmente la culminación de la fase folicular y el comienzo de la fase lútea del ciclo estral. En la fase luteal, la elevada concentración de progesterona, producida por el cuerpo lúteo, en asociación con la baja concentración de estrógenos, originan nuevamente la retroalimentación negativa, de forma que las gonadotrofinas disminuyen a niveles basales. No obstante, durante esta fase, se producen ondas de FSH (dos o tres en el bovino) que permiten un igual número de ondas de crecimiento folicular (Adams *et al.*, 2008).

Por último, la luteólisis o regresión del cuerpo lúteo y el paso al período de proestro se produce por la secreción de prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) proveniente del endometrio uterino no gestante. Este autacoide surge a través de un mecanismo complejo que involucra la exposición del endometrio a los estrógenos liberados por el folículo ovárico en crecimiento, los cuales estimulan la expresión de receptores de oxitocina en el endometrio. Estos responden al estímulo de oxitocina de origen hipotalámico y también luteal, estimulando finalmente a la enzima fosfolipasa A_2 y posterior síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Esta última, al actuar mediante un complejo mecanismo de señalización sobre células luteas y endoteliales provoca la disminución en los niveles sanguíneos de progesterona y un consiguiente cese de la retroalimentación

negativa que ejerce esta hormona sobre el centro cíclico del hipotálamo. Desde este centro surge una oleada de GnRH que estimulará la liberación de una nueva onda de hormona FSH por parte de la adenohipófisis. Por último, en el ovario esta gonadotrofina iniciará una nueva onda de crecimiento folicular. (Pederson, 1970; Labadía Mazuecos, 1995; Richards *et al.*, 2000).

Acciones de las gonadotrofinas sobre las células ováricas

Las acciones biológicas de las hormonas gonadotróficas sobre las células del ovario están mediadas a través de su unión a receptores específicos localizados en la membrana plasmática (Kawate, 2004). La FSH es la responsable del crecimiento y la maduración folicular así como del proceso de esteroidogénesis ovárica, cumpliendo una función relevante en el inicio de la formación de la cavidad antral. Así, los folículos preantrales en su etapa tardía, y los folículos antrales tempranos, expresan FSHR. La FSH estimula la mitosis de las células de la granulosa, la formación del líquido folicular y la actividad esteroidogénica del folículo maduro (Bao Garverick, 1998; Webb *et al.*, 1999; Zurvarra *et al.*, 2009; Pretheeban *et al.*, 2010; Alfaro *et al.*, 2012).

Por su parte, la LH interviene en el proceso de esteroidogénesis, además de participar en la ovulación y en la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. La LH, en concentraciones basales, interacciona con sus receptores (LHR) presentes en las células de la teca interna de los folículos antrales estimulando la producción de andrógenos. Estos andrógenos poseen dos destinos posibles, por un lado serán liberados a la circulación donde actuarán sobre las células blanco a través de sus receptores específicos y por otro, tanto los andrógenos circulantes como

aquellos recién sintetizados y secretados por las células de la teca, pueden ser captados por las células de la granulosa donde se producirá su aromatización a estrógenos por acción de las enzimas esteroidogénicas. Al mismo tiempo, conforme avanza el desarrollo del folículo dominante, los niveles basales de LH actúan conjuntamente con la FSH en la estimulación de la síntesis y secreción de estrógenos, dada la presencia del LHR en las células de la granulosa de los folículos dominantes (Bodensteiner *et al.*, 1996; Robert *et al.*, 2003). El incremento de la expresión de LHR en el folículo maduro, lo hace sensible a las altas concentraciones de LH de la onda preovulatoria, al mismo tiempo que lo prepara para el proceso de luteinización posterior a la ovulación (Jolly *et al.*, 1994; Mihm Austin, 2002; Wiltbank *et al.*, 2002).

Receptores de gonadotrofinas

Como se mencionó anteriormente, el FSHR se expresa en las células de la granulosa de los folículos preantrales primarios, secundarios y antrales. Por su parte, el LHR únicamente se expresa en células de la teca en folículos preantrales y antrales (Xu *et al.*, 1995; Kronenberg *et al.*, 2009), mientras que su expresión en células de la granulosa sólo se observa en los folículos dominantes preovulatorios (Xu *et al.*, 1995; Bao Garverick, 1998; Luo Wiltbank, 2006).

En un principio se sugirió que la expresión del FSHR se regulaba por los niveles de estrógenos y FSH. No obstante, estudios más recientes proporcionan una fuerte evidencia acerca de que el receptor de andrógenos activado por su ligando provoca un aumento en la expresión de FSHR en células de la granulosa (Luo Wiltbank, 2006; Alfaro, 2012). Por otra parte, la expresión de LHR en células de la granulosa es inducida por la acción conjunta de estrógenos y de FSH, como parte de los cambios que sufre el

folículo dominante al acercarse al momento de la ovulación (Xu *et al.*, 1995).

Desde un punto de vista estructural, los receptores de gonadotrofinas son glicoproteínas que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. La activación de estos receptores presentes en la superficie celular, mediante la interacción con su ligando, puede desencadenar diferentes vías de respuestas intracelulares a través de la activación de una o más proteínas G. Dichos receptores constan de una única cadena polipeptídica de longitud variable que contiene siete regiones transmembrana conectadas por tres segmentos extracelulares y tres intracelulares. Los receptores de gonadotrofinas, junto con el receptor de la tirotropina (TSHR), constituyen una subfamilia que presentan como característica distintiva un dominio extracelular inusualmente largo que abarca casi la mitad del tamaño del receptor (Vassart *et al.*, 2004).

Las secuencias génicas de estos receptores presentan estructuras complejas de exones e intrones (Segaloff *et al.*, 1990; Simoni *et al.*, 1997; Tena-Sempere *et al.*, 1999). En bovinos, el LHR está codificado por un gen que comprende 11 exones y 10 intrones, mientras que el gen que codifica para el FSHR está constituido por 10 exones y 9 intrones. El dominio extracelular está codificado por los exones 1 al 10 en el LHR y por los exones 1 al 9 en el FSHR, mientras que en ambos casos, el último exón codifica para los dominios transmembrana, intracelular y una pequeña región del dominio extracelular contigua a la membrana plasmática (Rajapaksha *et al.*, 1996; Hillier, 2001; Nogueira *et al.*, 2010). Se ha demostrado que el ARNm que codifica para el receptor completo (receptor full-length) es co-expresado junto a diferentes transcritos alternativos (isoformas) en las gónadas de varias especies incluyendo ovejas, ratas, ratones, bovinos,

cerdos, conejos y humanos (Rajapaksha *et al.*, 1996; Nogueira *et al.*, 2010). Por lo tanto, se propuso que estas isoformas del receptor podrían cumplir funciones reguladoras de los efectos celulares de las gonadotrofinas. Aunque el número de isoformas de los receptores parece ser específico de la especie estudiada o depender del método empleado para su análisis, en bovinos se han identificado al menos 3 transcritos alternativos para FSHR (Rajapaksha *et al.*, 1996; Vannier *et al.*, 1996; Simoni *et al.*, 1997) y al menos 4 transcritos alternativos para el LHR (Robert *et al.*, 2003; Kawate, 2004).

El análisis de los transcritos alternativos permitió establecer que codificaban para dos tipos de receptores truncados: por un lado, los que contienen una región del dominio extracelular pero no poseen el dominio transmembrana; y por otro, los que carecen de un segmento del dominio extracelular o intracelular pero que aún conservan el dominio transmembrana. Un FSHR que presenta una estructura con estas últimas características mencionadas ha sido descrito en ovinos (Sairam *et al.*, 1996). Dicho receptor está localizado en la membrana plasmática, mantiene la capacidad de unión a FSH, pero es incapaz de transducir la señal al interior de la célula por activación de la adenilato ciclasa. Además, fue demostrado mediante un ensayo *in vitro* que la co-expresión de FSHR truncado junto con el receptor completo da como resultado una atenuación en la transducción de la señal mediada por este último (Sairam *et al.*, 1996). En cuanto a las isoformas carentes del dominio transmembrana, se propuso que podrían ser secretadas al exterior de la célula, aunque no ha sido confirmado aún. La expresión de un LHR de este tipo en células de la línea HEK292 permitió establecer que el mismo no se secreta al exterior celular (Xie *et al.*, 1990). Sin embargo, un receptor con características

similares fue secretado en forma parcial a partir de células COS-7 y se demostró que la co-expresión del LHR truncado con el receptor completo mejora la producción de AMPc inducida por la gonadotrofina coriónica humana (hCG) (VuHai-LuuThi *et al.*, 1992).

Regulación de la expresión de las diferentes isoformas de los receptores de gonadotrofinas mediante mecanismos de corte y empalme alternativos

Los genes eucariotas están divididos en pequeños fragmentos de secuencia codificadora (secuencias expresadas o exones), separadas por otras secuencias de mayor longitud, las denominadas secuencias intercaladas o intrones. Por lo tanto, la secuencia que realmente codifica un gen eucariota suele representar sólo una pequeña fracción de la longitud total del gen. Durante la síntesis de ARN, ambos tipos de secuencias son transcritas dando lugar al transcripto primario o pre-ARNm. No obstante, los intrones deben ser eliminados de la molécula de ARN recién sintetizada mediante un proceso conocido como maduración por corte y empalme del ARN (RNA splicing) (Fig. 1). Por su parte, los exones se unen para producir una molécula de ARNm que puede ser traducida. Los exones, sin embargo, se pueden unir de diferentes maneras. Como resultado de este proceso, múltiples isoformas de ARNm y proteínas son producidas a partir de un número relativamente pequeño de genes. Los mecanismos de empalmes alternativos afectan a la mayoría de los genes eucariotas y son una de las principales fuentes de diversidad de proteínas, permitiendo la síntesis de múltiples isoformas de receptores, moléculas de adhesión, hormonas proteicas, etc. (Alberts *et al.*, 2010).

Los mecanismos de corte y empalme alternativos son un proceso complejo que

implica secuencias consenso específicas en los exones e intrones del transcrito primario además de múltiples proteínas regulatorias. Dichas reacciones dan como resultado diferentes isoformas del ARN debido al uso diferencial de los sitios de corte, la inclusión/exclusión de exones o incluso la retención de intrones (Witkowska Nauman, 2011).

Alteraciones en estos mecanismos de corte y empalme alternativos se observan frecuentemente en diferentes tipos de enfermedades, incluyendo trastornos neurológicos, enfermedades metabólicas hereditarias y cáncer. Las isoformas de ARNm que son empalmadas de forma incorrecta, si se traducen, pueden conducir a la síntesis de proteínas con longitud, secuencia, o estructura alteradas. Esto puede llevar a un mal funcionamiento de las mismas, alteraciones de la fisiología celular, y finalmente a una enfermedad (Witkowska Nauman, 2011).

En bovinos y ovinos han sido descritas isoformas del LHR con una delección del exón

10 y/o parte del exón 11 (Abnedennebi *et al.*, 2002; Robert *et al.*, 2003). Asimismo, la presencia de cuatro transcritos alternativos del LHR fue confirmada posteriormente en células de la granulosa de vaquillonas Nelore (Nogueira *et al.*, 2010) y en células de la granulosa y células de la teca de vacas Nelore (Nogueira *et al.*, 2007) (Fig. 2). Estos estudios identificaron una isoforma con una delección del exón 3, además de las descritas anteriormente. En la bibliografía, no se ha encontrado información acerca de la implicancia funcional que involucra una delección en el exón 3 en los bovinos, y aunque los autores, en base a la información obtenida en humanos y en ratas, infieren un menor potencial de unión de LH a esta isoforma, no existe una hipótesis certera acerca del rol fisiológico que cumpliría este tipo de receptores. En otro estudio, Kawate *et al.* (2002) demostraron que una isoforma del LHR bovino con una delección del exón 10 es transportada y posicionada en la superficie celular aunque dicha delección implica una

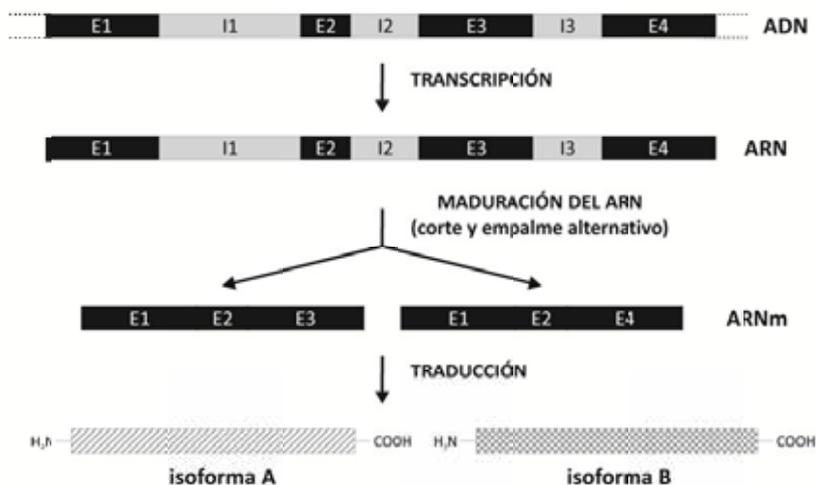


Fig. 1: Mecanismo de corte y empalme alternativo. Este proceso permite obtener distintas moléculas de ARNm a partir de un único transcrito de ARN primario.

disminución de la afinidad del receptor hacia la LH pero no hacia la hCG. En cuanto a las isoformas que presentan una delección en el exón 11 se ha demostrado que son traducidas como una proteína truncada (Kawate *et al.*, 2002). Este receptor no es transportado a la superficie celular y es mantenido en el citoplasma conservando su capacidad de unión al ligando. En esta condición estas isoformas no serían funcionales.

Sin embargo, la hipótesis de cooperación de dímeros, trímeros u oligómeros de receptores en la obtención de las formas funcionales (mediante el transporte y posicionamiento del receptor completo o el control de la biodisponibilidad del ligando) podría asignar una función de relevancia a las isoformas truncadas.

En ovinos se ha descrito que la modulación de la expresión del LHR está directamente relacionada con la actividad ovárica estacional. Es decir, la presencia de transcritos alternativos de dicho receptor puede estar parcialmente relacionada con las características reproductivas estacionales de los ovinos (Abdennebi *et al.*, 2002). La

regulación de los eventos de corte y empalme alternativos por hormonas o factores específicos en numerosos genes está bien documentada. El efecto de tales factores sería favorecer la utilización de ciertos sitios de corte localizados corriente arriba o corriente abajo del exón 11 dando como resultado el LHR completo (durante el estro) o sus isoformas (durante el anestro) (Zahler *et al.*, 1993; Chabot, 1996).

Por otra parte, los transcritos completos del FSHR en el bovino desaparecen cuando las células de la granulosa del folículo que ovuló comienzan a luteinizarse, mientras que los transcritos truncados persisten en el medio extracelular (Fig. 3). Estas observaciones sugieren que los mismos pueden tener diferente vida media y/o pueden sintetizarse en una sucesión regulada. Teniendo en cuenta que los múltiples transcritos del FSHR podrían ejercer un rol biológico diferente, es de esperar que existan diversos mecanismos de regulación para asegurar que se produzca el transcrito correcto en la cantidad necesaria en respuesta a señales biológicas específicas (Rajapaksha *et al.*, 1996).

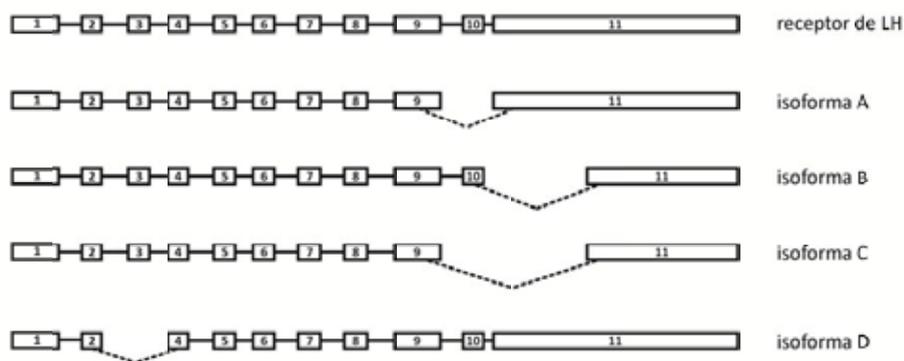


Fig. 2: Esquema que representa al receptor de LH bovino completo y a sus variantes generadas por un mecanismo de empalme alternativo.

Enfermedad quística ovárica

La enfermedad quística ovárica (COD, del inglés: Cystic Ovarian Disease) es uno de los desórdenes reproductivos más frecuentes en vacas lecheras, en especial las de alta producción, provocando cuantiosas pérdidas económicas para la producción pecuaria debido al incremento en los intervalos parto-concepción y parto-parto (Vanholder *et al.*, 2006). Dicha enfermedad puede afectar hasta un 15% de las vacas en el periodo posparto, antes del reinicio de la actividad cíclica regular (Garverick, 1997; Peter, 2004).

La COD se caracteriza por la presencia de estructuras foliculares dinámicas, descriptas como folículos anovulatorios únicos o múltiples, localizados en uno o ambos ovarios, que tienen un diámetro mayor al diámetro ovulatorio, 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 *et al.*, 2002; Bartolomé *et al.*, 2005; Vanholder *et al.*, 2006). Los mismos pueden regresar y ser reemplazados por nuevos; pueden atresiar o luteinizarse, e inclusive puede producirse la ovulación en presencia de ellos, lo que evidencia el dinamismo de la enfermedad (Hamilton *et al.*, 1995; Silvia *et al.*, 2002; Vanholder *et al.*, 2006). Los signos clínicos

que acompañan la presencia de quistes ováricos son: anestro, intervalos interestrales irregulares y en algunos casos, ninfomanía (Vanholder *et al.*, 2006).

El desarrollo de los quistes foliculares tiene una etiología multifactorial debido a la participación de numerosos factores clínicos, medioambientales y hereditarios (Peter, 2004).

La hipótesis más aceptada en la actualidad acerca de la patogenia de la COD involucra un desequilibrio neuroendocrino a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Liptrap McNally, 1976; Kesler Garverick, 1982; Eyestone Ax, 1984; Bosu Peter, 1987; Lopez-Diaz Bosu, 1992; Woolums Peter, 1994; Hamilton *et al.*, 1995; Garverick, 1997; Zulu Penny, 1998; Dobson *et al.*, 2000; Ribadu *et al.*, 2000; Peter, 2004; Monniaux *et al.*, 2008). Según esta hipótesis, la causa principal de la enfermedad es una deficiencia en la onda preovulatoria de LH o un patrón de liberación aberrante de dicha hormona.

La secreción de estrógenos por parte de los folículos preovulatorios ejerce un mecanismo de retroalimentación positiva sobre el eje hipotálamo-hipofisario causando la liberación del pico de LH desencadenante de la ovulación. Una alteración en este mecanismo puede

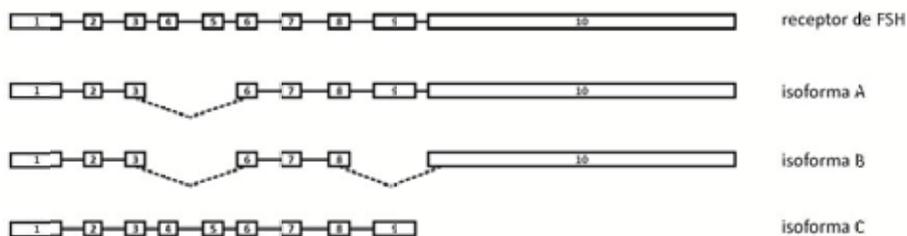


Fig. 3: Esquema que representa al receptor de FSH bovino completo y a sus variantes generadas por un mecanismo de empalme alternativo.

dar como resultado una falla en la liberación de GnRH desde el hipotálamo y por ende, en su acción a nivel hipofisario. La respuesta a este evento es un pulso de LH inadecuado en tiempo y forma durante la maduración del folículo preovulatorio (Kesler Garverick, 1982; Woolums Peter, 1994; Peter, 2004, Gümen Wiltbank, 2005). Silvia *et al.* (2005) encontraron que aquellos folículos destinados a formar quistes secretan altas concentraciones de estradiol mientras que el pico preovulatorio de LH no ocurre. Además, se ha demostrado que vacas con COD y con niveles elevados de estrógenos endógenos son incapaces de generar un pico de LH en respuesta a una dosis de estradiol exógeno, indicando que se ha perdido la capacidad de responder a los mecanismos de retroalimentación positiva del estradiol sobre el eje hipotálamo-hipofisario (Zaied *et al.*, 1981; De Silva Reeves, 1988; Refsal *et al.*, 1988).

Por otro lado, niveles elevados de estrógenos podrían inhibir la secreción de FSH y producir 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. Al parecer, luego de tres a cinco días la hembra se adapta a los niveles elevados 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 en presencia de un único quiste, comienza una nueva onda folicular y un folículo dominante (o múltiples folículos dominantes) se desarrolla (Cook *et al.*, 1991).

Se ha observado que niveles suprabasales de progesterona 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 *et al.*, 2002). Hatler *et al.* (2003) han observado que al momento del diagnóstico de COD en bovinos, la mayoría de los casos estaban acompañados por concentraciones suprabasales de progesterona. Se postula que la concentración elevada de progesterona presente en las vacas afectadas por la enfermedad es suficiente para mantener la retroalimentación negativa sobre el hipotálamo produciendo una disminución en la frecuencia de los pulsos de LH e inhibiendo el pico preovulatorio de LH (Savio *et al.*, 1993; Duchens *et al.*, 1994; Noble *et al.*, 2000; Hatler *et al.*, 2003). En este contexto, Silvia *et al.* (2002) sugieren que la ausencia de sensibilidad del hipotálamo al estradiol es debido a las concentraciones intermedias de la progesterona. En consecuencia, se ha planteado la hipótesis de que las concentraciones suprabasales de progesterona pueden actuar como un disparador para la formación de quistes foliculares (Silvia *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2005; 2006).

Numerosos estudios han caracterizado la dinámica del crecimiento folicular, sin embargo, 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.

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 *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1995) como en aquellas que presentan quistes ováricos (Hamilton *et al.*, 1995). Sin embargo, el inicio de las ondas foliculares puede ocurrir a intervalos más largos o más irregulares en estas últimas (Hamilton *et al.*, 1995; Calder *et al.*, 2001). Estudios previos han demostrado que los cambios en la concentración o patrones de

secreción de FSH no parecen estar asociados a la aparición de quistes ováricos (Brown *et al.*, 1982; Cook *et al.*, 1990; Busato *et al.*, 1995; Hamilton *et al.*, 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 *et al.*, 1990; Hamilton *et al.*, 1995). Utilizando la técnica de hibridación *in situ*, Calder *et al.* (2001) no hallaron variación en el patrón de expresión del FSHR en folículos antrales normales en relación a folículos quísticos. Estos hallazgos se contradicen con resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo de trabajo (Alfaro, 2012), y podríamos atribuir estas diferencias a la mayor sensibilidad de la técnica utilizada en nuestro caso (RT-PCR). Asimismo, los nuevos conocimientos surgidos a partir del descubrimiento de la presencia de transcritos alternativos del FSHR (explicados anteriormente) podrían aportar nuevos datos sobre aspectos fisiológicos y fisiopatológicos de las funciones de la FSH.

En relación al LHR se ha postulado que las alteraciones en su patrón de expresión pueden ser causa de anovulación. Resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo de trabajo coinciden con los reportados por Kawate (2004), demostrando una menor expresión en células foliculares de los quistes con respecto a los controles normales. Sin embargo, estos resultados son un punto de discrepancia con otros autores que obtuvieron resultados opuestos. Por un lado, Odore *et al.* (1999) describieron niveles proteicos similares del LHR en vacas normales respecto a vacas con quistes, sugiriendo una posible alteración en el proceso de retroalimentación positiva de los estrógenos sobre el eje hipotálamo-hipofisario. Por otro, Calder *et al.* (2001) detectaron mediante hibridación *in situ*, un aumento en los niveles de expresión del ARNm de LHR en células de la granulosa de folículos quísticos dominantes

en comparación con las de folículos antrales normales. Estos resultados concuerdan con la descripción de folículos persistentes, los cuales presentan niveles elevados del LHR, capacidad estrogénica por períodos prolongados, bajos niveles de progesterona y alta frecuencia de LH (Hatler *et al.*, 2003). Sin embargo, algunos folículos quísticos no dominantes de animales con la enfermedad expresaron cantidades detectables de ARNm del LHR en células de la teca, mientras que la expresión fue significativamente menor en las células de la granulosa. En ese mismo estudio se evaluó el desarrollo de “quistes jóvenes” estableciéndose una ausencia de diferencias significativas en la expresión del ARNm de LHR entre los quistes jóvenes y los folículos dominantes (Calder *et al.*, 2001). Las diferencias en los resultados de distintos autores podrían explicarse en parte, por los diferentes métodos empleados. Sin embargo, estos estudios son incapaces de establecer claramente una relación causa-efecto, dado que cualquier cambio detectado puede ser primario o secundario a la formación de quistes. Además, no se han hallado trabajos comparativos que incluyan el análisis de las isoformas de LHR y FSHR en el ovario bovino sano respecto a otros con trastornos reproductivos, pudiendo ser ésta otra posible explicación a estos resultados contradictorios.

Además de los cambios en la expresión de receptores, las alteraciones en la capacidad esteroidogénica de los folículos dominantes podrían desencadenar la formación de quistes. Esto se debe a que el estímulo a nivel hipotalámico, para la consecuente liberación del pico preovulatorio de LH, depende de una secreción adecuada y suficiente de estradiol por parte de la estructura folicular dominante (Calder *et al.*, 2001). Beam (1995) sugirió que la esteroidogénesis está aumentada durante el desarrollo temprano de

quistes, lo cual podría alterar la señal hacia el eje hipotálamo-hipofisario. En este sentido, a través de una fuerte retroalimentación positiva, podría verse sobre-estimulada la liberación de LH llevando a la aparición de la onda preovulatoria de manera temprana en relación al desarrollo folicular. El folículo inmaduro, en consecuencia, no ovularía y daría lugar a la formación del quiste.

Estudios dirigidos a comprender 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 Dhanasekaran, 2003; Isobe *et al.*, 2007; Salvetti *et al.*, 2010). Al respecto, algunos investigadores sugieren que la apoptosis, así como la proliferación celular, se encuentran disminuidas en las estructuras foliculares de animales con la enfermedad contribuyendo a la persistencia de dichas estructuras (Isobe Yoshimura, 2000 a,b; Isobe *et al.*, 2007; Salvetti *et al.*, 2010).

Por otro lado, los cambios celulares pueden presentarse como una producción aberrante de factores de crecimiento por las células de la granulosa (Ortega *et al.*, 2007 a, 2008; Rey *et al.*, 2010), mediante alteraciones en las proteínas que componen el citoesqueleto, ya sea en cantidad o tipo de proteínas, (Salvetti *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2007 b) o por la secreción inapropiada de proteínas de la matriz extracelular (Salvetti *et al.*, 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 *et al.*, 1995).

Aún resta discernir porqué una vez establecida la enfermedad, el porcentaje de

animales que responde a los tratamientos basados en gonadotrofinas es reducido. Uno de los tratamientos utilizados en los casos de COD consiste en la administración de GnRH o sus análogos, la cual induce un pico de LH, similar al pico preovulatorio, 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 *et al.*, 1989). Sin embargo, la tasa de recuperación luego del tratamiento es del 49-56% (Cantley *et al.*, 1975; Nakao *et al.*, 1985; Dinsmore *et al.*, 1987; Nanda *et al.*, 1989), incrementándose cuando la administración de GnRH se combina con Naloxona (Palomar *et al.*, 2008). La falla en la recuperación de casi el 50% de los animales podría explicarse por la incapacidad de las estructuras quísticas de responder al pico de LH, tal vez asociado a alteraciones en las células de la granulosa y de la teca (Kesler *et al.*, 1979), a un número insuficiente de LHR en las células foliculares y/o a la disminución de la sensibilidad a la hormona LH por alteración del sitio de unión a sus receptores específicos (Nakao *et al.*, 1979; Cairoli *et al.*, 2002). Además, es factible pensar que la presencia de las distintas isoformas del LHR podría ser responsable de la falla en la respuesta frente a los tratamientos hormonales utilizados en la resolución de trastornos reproductivos o como herramientas en técnicas de biotecnología reproductiva, como ser la superovulación. Por su parte, el estudio de los mecanismos de expresión y regulación del FSHR, así como la dinámica del funcionamiento de sus isoformas, resulta de gran interés ya que dicho receptor tendrá un rol fundamental en la correcta reanudación de la actividad ovárica.

CONCLUSIONES

Considerando que la ciclicidad normal del bovino es un proceso complejo estrictamente regulado por el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y que las hormonas gonadotróficas LH y FSH son esenciales para la función ovárica de diversas especies, es de suponer que cualquier modificación en los mecanismos de transcripción y/o regulación de los receptores de dichas hormonas podrían ser cruciales en la patogenia de la COD. Como se ha mencionado anteriormente, numerosos cambios a nivel celular han sido descriptos como consecuencia del desarrollo de quistes, sin arribar a una conclusión definitiva. Recientemente, algunos de los trabajos de nuestro grupo han permitido dilucidar cambios que podrían estar asociados a componentes de la etiopatogenia de esta enfermedad. En este sentido serán necesarios estudios complementarios tendientes a dilucidar las alteraciones que ocurren a nivel molecular, especialmente en relación de la expresión de genes y la transducción de señales que podrían verse afectadas en las estructuras quísticas y ser responsables de una respuesta aberrante frente a estímulos gonadotróficos. Actualmente se ha demostrado que los receptores de gonadotropinas LHR y FSHR presentan un patrón de expresión alterado en ovarios de animales afectados por la enfermedad en relación a ovarios sanos, evidenciándose una disminución en la expresión de los mismos en los folículos quísticos. En este contexto, la identificación de numerosas isoformas para ambos tipos de receptores hace suponer que las mismas podrían estar desempeñando un rol significativo en la regulación de la expresión de las formas funcionales afectando la respuesta a las gonadotropinas en distintos estados fisiológicos y patológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDENNEBI, L.; A. S. LESPORT; J. J. REMY; D. GREBERT; C. PISSELET; D. MONNIAUX & R. SALESSE.** 2002. Differences in splicing of mRNA encoding LH receptor in theca cells according to breeding season in ewes. *Reproduction* 123: 819-826.
- ADAMS, G. P; R. JAISWAL; J. SINGH & P. MALHI.** 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theor. Genet. Evol.* 69: 72-80.
- ALBERTS, B.; A. JOHNSON; J. LEWIS; M. RAFF; K. ROBERTS & P. WALTER.** 2010. Como leer las células el genoma: del DNA a la proteína (pp. 329-410). En: *Biología molecular de la célula*. Quinta Edición. Ed. Omega, S.A. Barcelona.
- ALFARO, N. S.; N. R. SALVETTI; M. M. L. VELÁZQUEZ; M. L. STANGAFERRO; F. REY & H. H. ORTEGA.** 2012. Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Res. Vet. Sci.* 92: 478-485.
- ALFARO, N. S.** 2012. Expresión de Receptores de Hormonas Esteroides: Subtipos e Isoformas en la Enfermedad Quística Ovárica Bovina. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral. Argentina.
- BAO, B. & H. A. GARVERICK.** 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.* 76: 1903-1921.
- BARTOLOMÉ, J.A.; W.W. THATCHER; P. MELENDEZ; C.A. RISCO & L.F. ARCHBALD.** 2005. Strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cysts in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227: 1409-1415.

- BEAM, S.W.** 1995. Follicular development in postpartum cattle: effects of energy balance and dietary lipid. PhD dissertation, Cornell University, pp. 124-136.
- BO, G. & M. CACCIA.** 2003. Dinámica Follicular Ovárica en el Ganado Bovino. (pp. 57-69). En: Reproducción de los animales domésticos. Tomo I. Ed. Ungerfeld, R. Medibea, Montevideo, Uruguay.
- BODENSTEINER, K. J.; M. C. WILTBANK; D. R. BERGFELT & O. J. GINTHER.** 1996. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology* 45: 499-512.
- BOSU, W. T. & A. T. PETER.** 1987. Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 28: 725.
- BROWN, E.M.; R. G. ELMORE; H. A. GARVERICK & D. J. KESLER.** 1982. Gonadotropin releasing hormone treatment of dairy cows with ovarian cysts. II. Histology of ovarian cyst walls. *Theriogenology* 17: 689-696.
- BUSATO, A.; S. ROMAGNOLI; U. KÜPFER; G. L. ROSSI & G. E. BESTETTI.** 1995. LH, FSH, PRL and ACTH cells in pituitary glands of cows with ovarian cysts. *Theriogenology* 44: 233- 246.
- CAIROLI, F.; D. VIGO; M. BATTOCCHIO; M. FAUSTINI; M. C. VERONESI & G. MAFFEO.** 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.; B. E. SALFEN; B. BAO; R. S. YOUNGQUIST & H. A. GARVERICK.** 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.; M. MANIKKAM; B. E. SALFEN; R. S YOUNGQUIST; D. B. LUBAHN; W. R LAMBERSON & H. A. GARVERICK.** 2001. Dominant bovine ovarian follicular cysts express increased levels of messenger RNAs for luteinizing hormone receptor and 3 betahydroxysteroid dehydrogenase delta (4),delta(5) isomerase compared to normal dominant follicles. *Biol. Reprod.* 65: 471-476.
- CANTLEY, T. C.; H. A. GARVERICK; C. J. BIRSCHWAL; C. E. MARTIN & R. S. YOUNGQUIST.** 1975. Hormonal responses of dairy cows with ovarian cysts to GnRH. *J. Anim. Sci.* 41: 1666-1673.
- CHABOT, B.** 1996. Directing alternative splicing cast and scenarios. *Trends Genet.* 12: 472-478.
- COOK, D. L.; C. A. SMITH; J. R. PARFET; R. S. YOUNGQUIST; E. M. BROWN & H. A. GARVERICK.** 1990. Fate and turnover rate of ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J. Reprod. Fertil.* 90: 37-46.
- COOK, D.L.; J. R. PARFET; C. A. SMITH; G. E. MOSS; R. S. YOUNGQUIST & H. A. GARVERICK.** 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.
- CRANE, M. B.; J. BARTOLOME; P. MELENDEZ; A. DE VRIES; C. RISCO & L. F. ARCHBALD.** 2005. Comparison of synchronization of ovulation with timed insemination and exogenous progesterone as therapeutic strategies for ovarian cysts in lactating dairy cows. *Theriogenology* 65:1563-74.

- DE SILVA, M. & J. J. REEVES.** 1988. Hypothalamic-Pituitary function in chronically cystic and regularly cycling dairy cows. *Biol. Reprod.* 38: 264.
- DINSMORE, R.P.; M. E. WHITE; C. L. GUARD; D. J. JASKO; J. R. PERDRIZET; P. M. POWERS & M. C. SMITH.** 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.; A. Y. RIBADU; K. M. NOBLE; J. E. TEBBLE & W. R. WARD.** 2000. Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 120: 405-410.
- DUCHENS, M.; M. FORSBERG; L. E. EDQVIST; H. GUSTAFSSON & H. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ.** 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.
- EYESTONE, W. H. & R. L. AX.** 1984. A review of ovarian follicular cysts in cows, with comparisons to the condition in women, rats and rabbits. *Theriogenology* 22: 109-125.
- GARVERICK, H. A.** 1997. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 80: 995-1004.
- GINTHER, O. J.; M.C. WILTBANK; P. M. FRICKE; J. R. GIBBONS & K. KOT.** 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55: 1187-1194.
- GÜMEN, A. M. C. WILTBANK.** 2005. Length of progesterone exposure needed to resolve large follicle anovular condition in dairy cows. *Theriogenology* 63: 202-218.
- HAFEZ, E. S. E.** 1987. *Reproduction in farm animals.* Ed. Lea & Febiger. Filadelfia. pp. 36-45.
- HAMILTON, S. A.; H. A. GARVERICK; D. H. KEISLER; Z. Z. XU; K. LOOS; R. S. YOUNGQUIST & B. E. SALFEN.** 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol. Reprod.* 53: 890-898.
- HATLER, T.B.; S. H. HAYES; D. A. LARANJA; L. F. FONSECA & W. J. SILVIA.** 2003. Relationship between endogenous progesterone and follicular dynamics in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts. *Biol. Reprod.* 69: 218-223.
- IRELAND, J. J. & J. S. RICHARDS.** 1978. Acute effects of estradiol and follicle stimulating hormone on specific binding of human [125I]iodo-follicle-stimulating hormone to rat ovarian granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology* 102: 876-883.
- ISOBE, N. & Y. YOSHIMURA.** 2000a. Immunocytochemical study of cell proliferation in the cystic ovarian follicles in cows. *Theriogenology* 54: 1159-1169.
- ISOBE, N. & Y. YOSHIMURA.** 2000b. Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: a DNA-end labeling histochemical study. *Theriogenology* 1(53): 897-904.
- JOLLY, P. D.; D. J. TISDALL; D. A. HEATH; S. LUN & K. P. MCNATTY.** 1994. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biol. Reprod.* 1: 934-944.
- KAWATE, N.; H. TAMADA; T. INABA & T. AWADA.** 2002. Expression of a cloned full-length cDNA encoding bovine luteinizing hormone receptor in COS-7 cells. *J. Reprod. Dev.* 48: 531-538.
- KAWATE, N.** 2004. *Studies on the Regulation of Expression of Luteinizing Hormone Re-*

- ceptor in the Ovary and the Mechanism of Follicular Cyst Formation in Ruminants. *J. Reprod. Dev.* 50: 1-8.
- KESLER, D. J.; H. A. GARVERICK; R. G. ELMORE; R. S. YOUNGQUIST & C. J. BIERSCHWAL.** 1979. Reproductive hormones associated with the ovarian cyst response to GnRH. *Theriogenology* 12: 109-114.
- KESLER, D. J. & H. A. GARVERICK.** 1982. Ovarian cysts in dairy cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 55: 1147-1159.
- KRONENBERG, H. M.; S. MELMED; K. S. POLONSKY & P. R. LARSEN.** 2009. *Williams Tratado de Endocrinología*, 11 Edición. Ed. Elsevier, Saunders. pp. 559-570.
- LABADÍA MAZUECOS, A.** 1995. Bases fisiológicas de la reproducción en la hembra. (pp. 841-860). En: *Fisiología Veterinaria*. Ed. García Sacristán, Interamericana, Madrid.
- LIPTRAP, R. W. & P. J. MCNALLY.** 1976. Steroid concentrations in cows with corticotrophin-induced cystic ovarian follicles and the effects of prostaglandin F₂ and indomethacin given by intrauterine injection. *Am. J. Vet. Res.* 37: 369-375.
- LOPEZ-DIAZ, M. C. & W. T. K. BOSU.** 1992. A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. *Theriogenology* 37: 1163-1183.
- LUO, W. & M. C. WILTBANK.** 2006. Distinct Regulation by Steroids of Messenger RNAs for FSHR and CYP19A1 in Bovine Granulosa Cells. *Biol. Reprod.* 75: 217-225.
- MIHM, M. & E. J. AUSTIN.** 2002. The final stages of dominant follicle selection in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23: 155-166.
- MONNIAUX, D.; N. DI CLEMENTE; J. L. TOUZE; C. BELVILLE & C. RICO.** 2008. Intrafollicular Steroids and Anti-Müllerian Hormone During Normal and Cystic Ovarian Follicular Development in the Cow. *Biol. Reprod.* 79: 387-396.
- NAKAO, T.; M. TSURUBAYASHI; S. HORIU-CHI; T. NOMURA; Y. ISHIBASHI; M. KUBO & K. KAWATA.** 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.; A. SUGIHASHI; K. KAWATA; H. NAKAMURA; J. SHIRAKAWA; M. IINUMA; M. TSURUBAYASHI & S. HORIUCHI.** 1985. Effects of an analog of PGF_{2a} (Ono-1052) on cows with luteinized ovarian cysts following treatment with GnRH-analog (Fertirelin acetate). *Theriogenology* 24: 425-433.
- NANDA, A. S.; W. R. WARD & H. DOBSON.** 1989. The relationship between milk yield and cystic ovarian disease in cattle. *Br. Vet. J.* 145: 39-45.
- NOBLE, K. M.; J. E. TEBBLE; D. HARVEY & H. DOBSON.** 2000. Ultrasonography and hormone profiles of persistent ovarian follicles (cysts) induced with low doses of progesterone in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 120: 361-366.
- NOGUEIRA, M. F. G.; J. BUTARINI; A. C. S. PRICE; M. G. L. CASTILHO & C. M. BARROS.** 2007. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 74: 680-686.
- NOGUEIRA, M. F. G.; P. FERNANDES; R. L. ERENO; R. A. L. SIMOES; J. BURATONI JUNIOR & C. M. BARROS.** 2010. Luteinizing Hormone Receptor (LHR): basic concepts in cattle and other mammals. A review. *Anim. Reprod.* 7: 51-64.

- ODORE, R.; G. RE; P. BADINO; A. DONN; D. VIGO; B. BIOLATTI & C. GIRARDI.** 1999. Modifications of receptor concentrations for adrenaline, steroid hormones, prostaglandin F₂alpha and gonadotropins in hypophysis and ovary of dairy cows with ovarian cysts. *Pharmacol. Res.* 39: 297-304.
- ORTEGA H. H.; N. R. SALVETTI; L. A. MÜLLER; P. AMABLE; J. A LORENTE; C. G. BARBEITO & E. J. GIMENO.** 2007a. Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with Cystic Ovarian Disease. *J. Comp. Pathol.* 136: 222-230.
- ORTEGA H. H.; P. AMABLE; N. R. SALVETTI; B. E. DALLARD; C. BARAVALLE; C. G. BARBEITO & E. J. GIMENO.** 2007b. Intraovarian localization of growth factors in induced cystic ovaries in rats. *Anat. Histol. Emryol.* 36: 94-102.
- ORTEGA, H.H.; M. M. PALOMAR; J. C. ACOSTA; N. R. SALVETTI; B. E. DALLARD; J. A. LORENTE; C. G. BARBEITO & E. J. GIMENO.** 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.
- PALOMAR M.M.; J. C. ACOSTA; N. R. SALVETTI; F. BARBERIS; P. M. BELDOMENICO; O. GARNERO & H. H. ORTEGA.** 2008. Treatment of cystic ovarian disease with Naloxone in high production Dairy cows. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 31: 184-186.
- PEDERSON, T.** 1970. Follicular kinetics in the ovary of the cyclic mouse. *Acta Endocrinol.* 64: 304- 323.
- PÉREZ, C. C.; I. RODRÍGUEZ; F. ESPAÑA; M. HIDALGO; J. DORADO & J. SANZ.** 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.
- PERRONE, M. S.; A. T. PETER & E. K. ASEM.** 1995. Fibronectins: role in reproduction and future applications. *Assist. Reprod. Technol. Androl.* 7: 103:125.
- PETER, A.T. & N. DHANASEKARAN.** 2003. Apoptosis of granulose 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.
- PRETHEEBAN, T.; A. BALENDRAN; M. B. GORDON & R. RAJAMAHENDRAN.** 2010. mRNA of luteal genes associated with progesterone synthesis, maintenance, and apoptosis in dairy heifers and lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 121: 218-224.
- RAJAPAKSHA, W.R.; L. ROBERTSON & P. J. O'SHAUGHNESSY.** 1996. Expression of follicle-stimulating hormone-receptor mRNA alternate transcripts in bovine granulose cells during luteinization in vivo and in vitro. *Mol. Cell Endocrinol.* 120: 25-30.
- REFSAL, K. R.; J. H. JARRIN-MALDONADO & R. F NACHREINER.** 1988. Basal and estradiol-induced release of gonadotropins in dairy cows with naturally occurring ovarian cysts. *Theriogenology* 30: 679.
- REY, F.; F. M. RODRÍGUEZ; N. R. SALVETTI; M. M. PALOMAR; C. G. BARBEITO; N. S. ALFARO & H. H. ORTEGA.** 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.; K. NAKADA; M. MORIYOSHI; W. C. ZHANG; Y. TANAKA & T. NAKAO.** 2000. The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim Reprod Sci* 64:21-31.

- RICHARDS, J. S.; D. L. RUSSELL; S. OCHSNER; M. HSIEH; K. H. H. DOYLE; A. E. FALENDER; Y. K. LO & S. C. SHARMA.** 2000. Novel Signaling Pathways That Control Ovarian Follicular Development, Ovulation, and Luteinization. *Endocrine* 1: 195-220.
- ROBERT, C.; D. GAGNE; J. G. LUSSIER; D. BOUSQUET; F. L. BARNES & M. A. SIRARD.** 2003. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterisation of the bovine splicing isoforms. *Reproduction* 125: 437-446.
- ROBINSON, R.S.; A. J. HAMMOND; M. G. HUNTER & G. E. MANN.** 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.; M. G. HUNTER & G. E. MANN.** 2006. Supra-basal progesterone concentrations during the follicular phase are associated with development of cystic follicles in dairy cows. *Vet. J.* 172: 340-346.
- SAIRAM, M.R., L. G. JIANG; T. A. YARNEY & H. KHAN.** 1996. Follicle-stimulating hormone 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.; A. M. CANAL; E. J. GIMENO & H. H. ORTEGA.** 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.; M. L. STANGAFERRO; M. M. PALOMAR; N. S. ALFARO; F. REY; E. J. GIMENO & H. H. ORTEGA.** 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.
- SAVIO, J.D.; W. W. THATCHER; L. BADINGA; R. L. DE LASOTA & D. WOLFENSON.** 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J. Reprod. Fertil.* 97: 197-203.
- SEGALOFF, D. L.; R. SPRENGEL; K. NIKOLICS & M. ASCOLI.** 1990. Structure of the lutropin/choriogonadotropin receptor. *Rec. Prog. Horm. Res.* 46: 261-303.
- SILVIA, W. J.; T. B. HATLER; A. M. NUGENT; D. A. LARANJA & L. F. FONSECA.** 2002. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23:167-177.
- SILVIA, W. J.; A. S. MCGINNIS & T. B. HATLER.** 2005. A comparison of adrenal gland function in lactating dairy cows with or without ovarian follicular cysts. *Biol. Reprod.* 5: 19-29.
- SIMONI, M.; J. GROMOLL & E. NIESCHLAG.** 1997. The Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology. *Endocrine Reviews* 18: 739-773.
- TENA-SEMPERE, M.; P. R. MANNA & I. T. HUHTANIEMI.** 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.
- VANHOLDER, T.; G. OPSOMER & A. DE KRUIF.** 2006. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod. Nutr. Develop.* 46:105-119.
- VANNIER, B; H. LOOSFELT; G. MEDURI; C. PICHON & E. MILGROM.** 1996. Anti-human receptor monoclonal antibodies:

- immunochemical and immunocytochemical characterization of the receptor. *Biochemistry* 35: 1358-1366.
- VASSART, G.; L. PARDO & S. COSTAGLIOLA.** 2004. A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem. Sci.* 29: 119-126.
- VUHAI-LUUTHI, M. T.; M. MISRAHI; A. HOULLIER; A. JOLIVET & E. MILGROM.** 1992. Variant forms of the pig lutropin/choriogonadotropin receptor. *Biochemistry* 31: 8377-8383.
- WEBB, R.; B. K. CAMPBELL; H. A. GARVERICK; J. G. GONG; C. G. GUTIERREZ & D. G. ARMSTRONG.** 1999. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 54: 33-48.
- WILTBANK, M. C.; A. GUMEN & R. SARTORI.** 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57: 21-52.
- WITKOWSKA, A. P. & NAUMAN A.** 2011. Alternative splicing and its role in pathologies of the endocrine system. *Endokrynol. Pol.* 62: 160-170.
- WOOLUMS, A. R. & A. T. PETER.** 1994. Cystic Ovarian Condition in Cattle. Part I Folliculogenesis and Ovulation. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. (Food Animal)* 16: 935-942.
- XIE, Y. B.; H. WANG & D. L. SEGALO.** 1990. Extracellular domain of lutropin/choriogonadotropin receptor expressed in transfected cells binds choriogonadotropin with high affinity. *J. Biol. Chem.* 265: 21411-21414.
- XU, Z.; H. A. GARVERICK; G. W. SMITH; M. F. SMITH; S. A. HAMILTON & R. S. YOUNGQUIST.** 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.
- ZAHLER, A. M.; K. M. NEUGEBAUER; W. S. LANE & M. B. ROTH.** 1993. Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing. *Science* 260: 219-222.
- ZAIED, A. A.; H. A. GARVERICK; D. J. KESLER; C. J. BIRSCHWAL; R. J. ELMORE & R. S. YOUNGQUIST.** 1981. Luteinizing hormone response to estradiol benzoate in cows with ovarian cyst. *Theriogenology* 16: 349.
- ZULU, V. C. & C. PENNY.** 1998. Risk factors of cystic ovarian disease in dairy cattle. *J. Reprod. Physiol.* 44: 191-195.
- ZURVARRA, F. M.; N. R. SALVETTI; J. IAN MASON; M. M. L. VELAZQUEZ; N. S. ALFARO & H. H. ORTEGA.** 2009. Disruption in the expression and immunolocalisation of steroid receptors and steroidogenic enzymes in letrozole-induced polycystic ovaries in rat. *Reprod. Fert. Dev.* 21: 827-839.