



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE *HEAT SHOCK
PROTEINS (HSPs)* EN EL OVARIO BOVINO
NORMAL Y EN CONDICIONES PATOLÓGICAS.**

**AUTORA: LIC. MELISA M. L. VELÁZQUEZ
DIRECTOR: DR. HUGO HÉCTOR ORTEGA
CO-DIRECTORA: DRA. NATALIA SALVETTI**

*“Busca la instrucción desde tu juventud,
y hasta tu vejez hallarás sabiduría”
Ecli 6,18.*

*Dedico este trabajo a mis padres y a mis hermanos Ma. Soledad y Rodrigo,
por hacer más linda mi vida a lo largo de este trayecto.*

A Pablo, por su amor en los detalles de cada día que transitamos juntos.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su apoyo incondicional y sus consejos; pero especialmente por el tiempo que les robé para llegar al final de este trayecto.

A mi director, Dr. Hugo Ortega, por la transmisión de sus conocimientos, por ser guía en el desarrollo de este trabajo y por haber confiado en mi capacidad para llevarlo a cabo.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biología Celular y Molecular: Celina Baravalle, Natalia Alfaro, Valeria Ruffino, Elizabet Pereyra, Ma. Rocío Marini, Ayelen Amweg, Fernanda Rodriguez, Carolina Panzani, Carolina Andreotti, Valentina Matiller, Pablo Díaz, Adrián Perri, Leandro Neme, Matías Stangaferro, Mónica Cadoche, Germán Benitez, Magalí Colombero y Silvina Pujato, por los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por las ayudas recibidas y por mostrarme sus virtudes, que conservo y son muchas, e hicieron más gratas las horas trabajadas. A Eugenia Baravalle, Sol Renna, Belkis Marelli y Marcelo Zayas, por el último tiempo compartido en el que me cedieron favores desinteresadamente que sumaron a la culminación de este trabajo.

A las Doctoras Bibiana Dallard, Natalia Salvetti, y Florencia Rey, por sus aportes de conocimientos en todo momento y la salvedad de tantas dudas que me surgieron.

A los integrantes de la Cátedra de Salud Pública, especialmente a: Lorena Soto, Ma. Virginia Zbrun, Marcelo Signorini y Laureano Frizzo, por los almuerzos compartidos y los consejos brindados de manera desinteresada en todo aspecto.

A los integrantes de la Cátedra de Histología y Embriología, especialmente a Raquel Pastor, por el espacio prestado y las charlas amenas que hicieron a mi formación humana.

Al Med. Vet. Armando Delgado, por el espacio físico cedido desinteresadamente para la escritura de esta 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 cabida para el desarrollo de este trabajo.

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

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS UTILIZADAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	xi
SUMMARY	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Histofisiología del ovario.....	2
1.1.1. <i>Foliculogénesis</i>	2
1.1.2. <i>Atresia folicular</i>	5
1.1.3. <i>Endocrinología del crecimiento folicular y la ovulación</i>	6
1.1.4. <i>Ciclo estral en bovinos</i>	10
1.1.5. <i>Ondas foliculares en bovinos</i>	12
1.2. Disfunción ovárica.....	15
1.2.1 <i>Anestro</i>	15
1.3 Enfermedad quística ovárica.....	16
1.3.1 <i>Factores predisponentes en la formación de quistes</i>	17
1.3.1.1 <i>Factores generales</i>	17
1.3.1.2 <i>Factores específicos</i>	19
1.3.2. <i>Etiología y patogenia</i>	20
1.3.2.1 <i>Disfunción hipotálamo-hipofisaria</i>	21
1.3.2.2 <i>Disfunción ovárica/folicular</i>	23
1.4. <i>Las Heat Shock Proteins: su naturaleza y función</i>	25
1.4.1 <i>Participación de las HSPs en diversas condiciones de estrés</i>	29
1.4.2 <i>Rol de las Heat Shock Proteins en reproducción</i>	30
2. OBJETIVOS	33
2. 1. <i>Objetivos generales</i>	34
2. 2. <i>Objetivos específicos</i>	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1. <i>Procedimientos llevados a cabo con animales</i>	37
3.1.1 <i>Modelo Experimental</i>	37
3.1.2 <i>Animales</i>	37
3.1.2.1 <i>Grupos experimentales</i>	38
3.1.2.2 <i>Ultrasonografía</i>	39

3.1.3 Obtención de las muestras.....	40
3.2. Detección y cuantificación de las proteínas de golpe térmico.....	42
3.2.1 Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas.....	42
3.2.2 Inmunohistoquímica.....	43
3.2.3 Procesamiento de las muestras para la técnica de Western Blot (WB)...	45
3.2.4 Western Blot.....	45
3.3. Obtención y cuantificación de ARNm correspondientes a HSPs.....	48
3.3.1 Extracción de ARN total.....	48
3.3.2 Transcripción Reversa para la síntesis del ADN copia (ADNc).....	49
3.3.3 Diseño de cebadores específicos para cada HSP y otros genes.....	49
3.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	51
3.3.5 Secuenciación nucleotídica.....	52
3.4. Análisis digital de imágenes.....	52
3.5. Evaluación estadística.....	53
4. RESULTADOS.....	54
4.1 Inducción de la enfermedad quística ovárica en bovinos.....	55
4.2 Análisis de la expresión proteica de HSPs mediante inmunohistoquímica.....	55
4.2.1 Expresión de HSPs en estructuras foliculares de ovarios obtenidos en playa de faena.....	55
4.2.1.1 Hsp27.....	55
4.2.1.2 Hsp60.....	57
4.2.1.3 Hsp70.....	59
4.2.1.4 Hsp90.....	60
4.2.2 Expresión proteica de HSPs en las distintas categorías foliculares y quistes de ovarios de animales con COD inducida.....	62
4.2.2.1 Hsp27.....	62
4.2.2.2 Hsp60.....	64
4.2.2.3 Hsp70.....	65
4.2.2.4 Hsp90.....	67
4.2.3 Comparación de los niveles proteicos de HSPs entre muestras del modelo experimental y muestras obtenidas en frigorífico.....	68
4.2.3.1 Hsp27.....	68
4.2.3.2 Hsp60.....	71
4.2.3.3 Hsp70.....	73
4.2.3.4 Hsp90.....	75
4.3 Evaluación de HSPs en pared folicular completa mediante Western Blot.....	77
4.3.1 Hsp27.....	77
4.3.2 Hsp60.....	78
4.3.3 Hsp70.....	79

4.3.4 Hsp90.....	80
4.4 Evaluación de los niveles de ARNm de HSPs mediante RT-PCR.....	81
4.4.1 <i>Expresión de ARNm de HSPs en folículos provenientes de ovarios obtenidos en frigorífico</i>	81
4.4.1.1 Hsp10.....	81
4.4.1.2 Hsp27.....	82
4.4.1.3 Hsp40.....	83
4.4.1.4 Hsp60.....	84
4.4.1.5 Hsp70.....	85
4.4.1.6 Hsp90 α	86
4.4.1.7 Hsp90 β	87
4.5 Enfermedad quística espontánea diagnosticada en animales en producción de establecimientos pecuarios.....	88
4.5.1 <i>Expresión de ARNm de HSPs en quistes espontáneos diagnosticados en animales en producción</i>	89
4.5.1.1 Hsp10.....	90
4.5.1.2 Hsp27.....	91
4.5.1.3 Hsp40.....	92
4.5.1.4 Hsp60.....	93
4.5.1.5 Hsp70.....	93
4.5.1.6 Hsp90 α	94
4.5.1.7 Hsp90 β	95
5. DISCUSIÓN	96
5.1 Expresión de HSPs en la foliculogénesis normal y en animales con COD espontánea e inducida.....	97
5.2 Expresión de transcritos de HSPs en quistes espontáneos diagnosticados en animales en producción.....	107
6. CONCLUSIONES	111
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
8. PUBLICACIONES	149

ABREVIATURAS UTILIZADAS

µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
3β-HSD	3-β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa
ACTH	Adrenocorticotrofina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia (simple cadena)
AMH	Hormona inhibidora de los conductos de Müller
ANOVA	Análisis de la varianza
APAF-1	Factor activador de proteasas apoptóticas-1
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BEN	Balance energético negativo
BMPs	Proteínas morfogénicas óseas
CC	Condición corporal
CL	Cuerpo lúteo
COD	Enfermedad quística ovárica
CRH	Hormona liberadora de corticotrofina
CyP19a1	Enzima citocromo P450 aromatasa
CyP17a1	Enzima citocromo P450 17α-hidroxilasa/17,20-liasa
DAB	Diaminobencidina
DE	Desvío estándar
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DOI	Densidad óptica integrada
dNTP	Desoxi-nucleósido trifosfato
dpi	Puntos por pulgada
DTT	Ditiothreitol
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FSH	Hormona foliculoestimulante
FSHr	Receptor de la hormona foliculoestimulante

GAPDH	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenada
GDF-9	Factor de crecimiento y diferenciación 9
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
Grp	Proteína regulada por glucosa
h	Hora/horas
HSP	Familia de Proteínas de golpe de térmico
Hsp	Proteína de golpe térmico
Hsp10	Proteína de golpe térmico de 10kDa.
Hsp27	Proteína de golpe térmico de 27kDa.
Hsp32	Proteína de golpe térmico de 32kDa.
Hsp40	Proteína de golpe térmico de 40kDa.
Hsp60	Proteína de golpe térmico de 60kDa.
Hsp70	Proteína de golpe térmico de 70kDa.
Hsp90α	Proteína de golpe térmico de 90kDa isoforma α.
Hsp90β	Proteína de golpe térmico de 90kDa isoforma β.
IGF-1	Factor de crecimiento análogo a insulina-1
IGF-1R	Receptor del factor de crecimiento análogo a insulina-1
IGFBP	Proteína de unión al factor de crecimiento análogo a insulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IHCSA	Área marcada con inmunohistoquímica
kDa	Kilodalton
LF	Líquido folicular
LH	Hormona luteinizante
LHr	Receptor de la hormona luteinizante
M	Molar
mA	Miliampéres
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramos
MgCl	Cloruro de magnesio
MHz	Megahertzios
ml	Mililitros
mm	Milímetros
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase
NH₃	Amoníaco
ng	Nanogramos

PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
PCOS	Síndrome Poliquístico Ovárico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PGF2α	Prostaglandina F 2α
RE	Receptor de Estrógenos
REα	Receptor de estrógenos α
REβ	Receptor de estrógenos β
pb	Pares de bases
PM	Peso Molecular
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa
sHSP	Familia de Proteínas pequeñas de golpe térmico
SDS	Sodio Dodecil Sulfato
TBS-T	Buffer Tris Salino-Tween
TGF	Factor de crecimiento transformante
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
USA	Estados Unidos de América
U	Unidades de actividad enzimática
UV	Ultravioleta
V	Voltios
WB	Western Blot
ZP	Zona pelúcida

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación morfológica de folículos ováricos más empleada para bovinos.	5
Tabla 2.	Clasificación de la atresia en folículos ováricos bovinos.	6
Tabla 3.	Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.	43
Tabla 4.	Marcadores de PM para SDS-PAGE, amplio espectro.	46
Tabla 5.	Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de Western Blot.	47
Tabla 6.	Cebadores sentido y antisentido específicos para cada ADNc bovino y condiciones de la PCR.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento con sus componentes (Adaptado de Ross y col., 2004).	4
Figura 2.	Esquema de un corte longitudinal de ovario humano adulto donde se observan las distintas categorías foliculares en crecimiento, ovulación y formación de cuerpo lúteo (Adaptado de Enciclopedia bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM).	4
Figura 3.	Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipofisario y el ovario. (Gartner y Hiatt, 1997).	7
Figura 4.	Diagrama del ciclo estral bovino mostrando los niveles hormonales en cada una de las etapas de las fases folicular y luteal (Adaptado de Enciclopedia bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM).	11
Figura 5.	Dinámica del desarrollo folicular y secreción de gonadotropinas durante un ciclo estral bovino con 3 ondas preovulatorias (Adams y col., 2008).	13
Figura 6.	Representación esquemática de los tipos de anestro basada en las características morfológicas y fisiológicas de los folículos ováricos bovinos (adaptado de Peter, 2004).	16
Figura 7.	Participación de las Heat Shock Proteins en la síntesis proteica, transporte y estabilización de estructuras proteicas funcionales e impedimento de su degradación (http://www10.uniovi.es/anatopatodon/modulo2/tema01_alteracion/00indice.htm).	26
Figura 8.	Esquema representativo de la participación de las HSPs como mediadoras de la señalización intercelular y su intervención en la respuesta inmune celular a través de la presentación cruzada de antígenos antígenos (adaptado de Calderwood y col., 2007).	28
Figura 9.	Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes ováricos foliculares mediante administración de ACTH.	39
Figura 10.	Ovarios provenientes de playa de faena con estructura quística de diámetro superior a 30 mm en uno de ellos.	41
Figura 11.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp27 en la granulosa de varios tipos foliculares (FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico.	56
Figura 12.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp27 en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico.	56
Figura 13.	Inmunomarcación de la pared de un folículo secundario con anti-Hsp27.	56
Figura 14.	Inmunomarcación de la pared de un folículo terciario con anti-Hsp27.	56
Figura 15.	Inmunomarcación de la pared de un quiste folicular espontáneo con anti-Hsp27.	57
Figura 16.	Inmunomarcación de la pared de un folículo atrésico con anti-Hsp27.	57
Figura 17.	Area inmunomarcada para la proteína Hsp60 en la granulosa de varios tipos foliculares (FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico.	57
Figura 18.	Area inmunomarcada para la proteína Hsp60 en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico.	58
Figura 19.	Inmunomarcación de la pared de un folículo secundario con anti-Hsp60.	58
Figura 20.	Inmunomarcación de la pared de un folículo terciario con anti-Hsp60.	58

Figura 21.	Inmunomarcación de la pared de un quiste folicular espontáneo con anti-Hsp60.	58
Figura 22.	Inmunomarcación de la pared de un folículo atrésico con anti-Hsp60.	58
Figura 23.	Area inmunomarcada para la proteína Hsp70 en la granulosa de varios tipos foliculares (FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico.	59
Figura 24.	Area inmunomarcada para la proteína Hsp70 en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico.	59
Figura 25.	Inmunomarcación de la pared de un folículo secundario con anti-Hsp70.	60
Figura 26.	Inmunomarcación de la pared de un folículo terciario con anti-Hsp70.	60
Figura 27.	Inmunomarcación de la pared de un quiste folicular espontáneo con anti-Hsp70.	60
Figura 28.	Inmunomarcación de la pared de un folículo atrésico con anti-Hsp70.	60
Figura 29.	Area inmunomarcada para la proteína Hsp90 en la granulosa de varios tipos foliculares (FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico.	61
Figura 30.	Area inmunomarcada para la proteína Hsp90 en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico.	61
Figura 31	Inmunomarcación de la pared de un folículo secundario con anti-Hsp90.	62
Figura 32.	Inmunomarcación de la pared de un folículo terciario con anti-Hsp90.	62
Figura 33.	Inmunomarcación de la pared de un folículo quístico espontáneo, con anti-Hsp90.	62
Figura 34.	Inmunomarcación de la pared de un folículo atrésico, con anti-Hsp90.	62
Figura 35.	Área inmunohistoquímicamente marcada para la proteína Hsp27 en granulosa (A) y teca (B) de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios y Q: Quistes, provenientes de ovarios con enfermedad quística inducida con ACTH.	63
Figura 36.	Inmunomarcación con anti-Hsp27 de la pared de un folículo primario, proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida.	63
Figura 37.	Inmunomarcación con anti-Hsp27 de la pared de un folículo secundario, proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida.	63
Figura 38.	Inmunomarcación con anti-Hsp27 de la pared de un folículo terciario, proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida.	64
Figura 39.	Inmunomarcación con anti-Hsp27 de la pared de un quiste inducido con ACTH	64
Figura 40.	Área inmunohistoquímicamente marcada para la proteína Hsp60 en granulosa (A) y teca (B) de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios y Q: Quistes, provenientes de ovarios con enfermedad quística inducida con ACTH.	64
Figura 41.	Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un folículo primario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida.	65
Figura 42.	Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un folículo secundario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida.	65
Figura 43.	Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un folículo terciario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida.	65

Figura 44.	Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un quiste inducido con ACTH.	65
Figura 45.	Área inmunohistoquímicamente marcada para la proteína Hsp70 en granulosa (A) y teca (B) de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios y Q: Quistes, provenientes de ovarios con enfermedad quística inducida con ACTH.	66
Figura 46.	Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un folículo primario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida.	66
Figura 47.	Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un folículo secundario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida.	66
Figura 48.	Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un folículo terciario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida.	66
Figura 49.	Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un quiste inducido con ACTH.	66
Figura 50.	Área inmunohistoquímicamente marcada para la proteína Hsp90 en granulosa (A) y teca (B) de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios y Q: Quistes, provenientes de ovarios con enfermedad quística inducida con ACTH.	67
Figura 51.	Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un folículo primario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida.	67
Figura 52.	Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un folículo secundario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida.	67
Figura 53.	Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un folículo terciario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida.	68
Figura 54.	Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un quiste inducido con ACTH.	68
Figura 55.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp27 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental.	69
Figura 56.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp27 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f).	69
Figura 57.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp27 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental.	70
Figura 58.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp27 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f).	70
Figura 59.	Inmunomarcación de la pared de un folículo primario control, del modelo experimental, con anti-Hsp27.	70
Figura 60.	Inmunomarcación de la pared de un folículo secundario del grupo control, del modelo experimental, con anti-Hsp27.	70
Figura 61.	Inmunomarcación de la pared de un folículo terciario del grupo control del modelo experimental, con anti-Hsp27.	70
Figura 62.	Inmunomarcación con anti-Hsp27 de la pared de un quiste inducido con ACTH.	70
Figura 63.	Inmunomarcación con anti-Hsp27 de la pared de un folículo terciario de ovario sano obtenido en frigorífico.	71
Figura 64.	Inmunomarcación con anti-Hsp27 de la pared de un quiste espontáneo de ovario obtenido en frigorífico.	71

Figura 65.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp60 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental.	71
Figura 66.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp60 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f).	71
Figura 67.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp60 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental.	72
Figura 68.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp60 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f).	72
Figura 69.	Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un folículo terciario del grupo control, del modelo experimental.	72
Figura 70.	Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un quiste inducido con ACTH.	72
Figura 71.	Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un folículo terciario de ovario obtenido en frigorífico.	73
Figura 72.	Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un quiste espontáneo de ovario obtenido en frigorífico.	73
Figura 73.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp70 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental.	73
Figura 74.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp70 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f).	73
Figura 75.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp70 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental.	74
Figura 76.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp70 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f).	74
Figura 77.	Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un folículo terciario del grupo control, del modelo experimental.	74
Figura 78.	Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un quiste inducido con ACTH.	74
Figura 79.	Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un folículo terciario de ovario de frigorífico.	75
Figura 80.	Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un quiste espontáneo, obtenido en frigorífico.	75
Figura 81.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp90 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental.	75
Figura 82.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp90 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f).	75
Figura 83.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp90 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental.	76

Figura 84.	Área inmunomarcada para la proteína Hsp90 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f).	76
Figura 85.	Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un folículo terciario control, del modelo experimental.	76
Figura 86.	Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un quiste inducido con ACTH.	76
Figura 87.	Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un folículo secundario de ovario de frigorífico.	77
Figura 88.	Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un quiste espontáneo.	77
Figura 89.	Densidad Óptica Integrada relativa a β -actina para Hsp27, en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Folículos antrales pequeños, FG: grandes, Q: quísticos) provenientes de material de frigorífico.	78
Figura 90.	Placa radiográfica representativa de un Western Blot que muestra la expresión de Hsp27 en la pared folicular de folículos antrales pequeños (FP), grandes (FG), y quistes (Q) provenientes de material obtenido en frigorífico.	78
Figura 91.	Densidad Óptica Integrada relativa a β -actina para Hsp60, en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Folículos antrales pequeños, FG: grandes, Q: quísticos) provenientes de material de frigorífico.	79
Figura 92.	Placa radiográfica representativa de un Western Blot que muestra la expresión de Hsp60 en la pared folicular de folículos antrales pequeños (FP), grandes (FG), y quistes (Q) provenientes de material de frigorífico.	79
Figura 93.	Densidad Óptica Integrada relativa a β -actina para Hsp70, en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Folículos antrales pequeños, FG: grandes, Q: quísticos) provenientes de material de frigorífico.	79
Figura 94.	Placa radiográfica representativa de un Western Blot que muestra la expresión de Hsp70 en la pared folicular de folículos antrales pequeños (FP), grandes (FG), y quistes (Q) provenientes de material de frigorífico.	80
Figura 95.	Densidad Óptica Integrada relativa a β -actina para Hsp90, en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Folículos antrales pequeños, FG: grandes, Q: quísticos) provenientes de material de frigorífico.	80
Figura 96.	Placa radiográfica representativa de un Western Blot que muestra la expresión de Hsp90 en la pared folicular de folículos antrales pequeños (FP), grandes (FG), y quistes (Q) provenientes de material de frigorífico.	80
Figura 97.	Niveles de ARNm de Hsp10/GAPDH, en células de la granulosa (A) y de la teca (B) en Folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (Q); todos provenientes de ovarios de frigorífico. Las bandas debajo de cada barra corresponden a la visualización en gel de agarosa al 2% de los amplificados para cada caso.	82
Figura 98.	Niveles de ARNm de Hsp27/GAPDH, en células de la granulosa (A) y de la teca (B) en Folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (Q); todos provenientes de ovarios de frigorífico. Las bandas debajo de cada barra corresponden a la visualización en gel de agarosa al 2% de los amplificados para cada caso.	83
Figura 99.	Niveles de ARNm de Hsp40/GAPDH, en células de la granulosa (A) y de la teca (B) en Folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (Q); todos provenientes de ovarios de frigorífico. Las bandas debajo de cada barra corresponden a la visualización en gel de agarosa al 2% de los amplificados para cada caso.	84
Figura 100.	Niveles de ARNm de Hsp60/GAPDH, en células de la granulosa (A) y de la teca (B) en Folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (Q); todos provenientes de ovarios de frigorífico. Las bandas debajo de cada barra corresponden a la visualización en gel de agarosa al 2% de los amplificados para cada caso.	85

Figura 101.	Niveles de ARNm de Hsp70/GAPDH, en células de la granulosa (A) y de la teca (B) en Folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (Q); todos provenientes de ovarios de frigorífico. Las bandas debajo de cada barra corresponden a la visualización en gel de agarosa al 2% de los amplificadores para cada caso.	86
Figura 102.	Niveles de ARNm de Hsp90 α /GAPDH, en células de la granulosa (A) y de la teca (B) en Folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (Q); todos provenientes de ovarios de frigorífico. Las bandas debajo de cada barra corresponden a la visualización en gel de agarosa al 2% de los amplificadores para cada caso.	87
Figura 103.	Niveles de ARNm de Hsp90 β /GAPDH, en células de la granulosa (A) y de la teca (B) en Folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (Q); todos provenientes de ovarios de frigorífico. Las bandas debajo de cada barra corresponden a la visualización en gel de agarosa al 2% de los amplificadores para cada caso.	88
Figura 104.	Ultrasonografía de un ovario quístico de un animal en producción, con COD de desarrollo espontáneo. La estructura quística tiene un tamaño superior a 20 x 30mm.	89
Figura 105.	Niveles de ARNm de CyP17a1/GAPDH en poblaciones celulares obtenidas por aspiración folicular de quistes ováricos de desarrollo espontáneo. De animales en producción. Cada barra representa un quiste en estudio.	90
Figura 106.	Niveles de ARNm de CyP19a1/GAPDH en poblaciones celulares obtenidas por aspiración folicular de quistes ováricos de desarrollo espontáneo de animales en producción. Cada barra representa un quiste en estudio.	90
Figura 107.	Niveles de ARNm de Hsp10/GAPDH en células de la granulosa, en teca y en pared completa (teca + granulosa) de folículos quísticos provenientes de animales con COD espontánea diagnosticada en campo. Cada barra representa un quiste en estudio.	91
Figura 108.	Niveles de ARNm de Hsp27/GAPDH en células de la granulosa, en teca y en pared completa (teca + granulosa) de folículos quísticos provenientes de animales con COD espontánea diagnosticada en campo. Cada barra representa un quiste en estudio.	91
Figura 109.	Niveles de ARNm de Hsp40/GAPDH en células de la granulosa, en teca y en pared completa (teca + granulosa) de folículos quísticos provenientes de animales con COD espontánea diagnosticada en campo. Cada barra representa un quiste en estudio.	92
Figura 110.	Niveles de ARNm de Hsp60/GAPDH en células de la granulosa, en teca y en pared completa (teca + granulosa) de folículos quísticos provenientes de animales con COD espontánea diagnosticada en campo. Cada barra representa un quiste en estudio.	93
Figura 111.	Niveles de ARNm de Hsp70/GAPDH en células de la granulosa, en teca y en pared completa (teca + granulosa) de folículos quísticos provenientes de animales con COD espontánea diagnosticada en campo. Cada barra representa un quiste en estudio.	94
Figura 112.	Niveles de ARNm de Hsp90 α /GAPDH en células de la granulosa, en teca y en pared completa (teca + granulosa) de folículos quísticos provenientes de animales con COD espontánea diagnosticada en campo. Cada barra representa un quiste en estudio.	94
Figura 113.	Niveles de ARNm de Hsp90 β /GAPDH en células de la granulosa, en teca y en pared completa (teca + granulosa) de folículos quísticos provenientes de animales con COD espontánea diagnosticada en campo. Cada barra representa un quiste en estudio.	95

RESUMEN

Los procesos reproductivos, para tener éxito, deben estar en armonía y sincronizados con el medio ambiente. Las condiciones desfavorables (por ejemplo, temperaturas extremas, disminución de los nutrientes, exposición a sustancias nocivas, etc.) inducen estrés en los organismos y reprimen la reproducción a través de vías hormonales y nerviosas. De la misma manera, condiciones adecuadas, promueven y garantizan la eficiencia reproductiva.

Se ha demostrado que las altas temperaturas pueden afectar los distintos eventos reproductivos a través de alteraciones en la proliferación y la apoptosis de células ováricas, así como también inducir la hipersecreción de hormonas esteroideas desde esta glándula. Asimismo, se ha identificado al estrés como posible factor etiológico de la enfermedad quística ovárica (COD, del inglés *Cystic Ovarian Disease*) y de hecho se ha encontrado una relación estrecha entre los mecanismos neuroendócrinos de respuesta al estrés, la actividad del sistema simpático y la activación celular de la expresión de HSPs.

La COD se presenta frecuentemente en vacas lecheras de alta producción, aunque ocasionalmente también se presenta en animales destinados a la producción de carne. 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. Puede afectar hasta un 15% de las vacas en el período posparto, momento crítico en el que hay una transición desde la preñez a la reanudación de la ciclicidad ovárica. El diagnóstico de COD suele realizarse durante los primeros 60 días posparto y, esta irregularidad lleva a prolongar el intervalo parto-concepción, provocando grandes pérdidas a la producción pecuaria general.

En el presente estudio, se han descrito y evaluado los niveles proteicos y de ARNm de algunas proteínas de golpe térmico (HSPs; del inglés *Heat Shock Proteins*) con el objeto de relacionarlos con la foliculogénesis normal en la especie bovina y estudiar su significancia en la COD. Para tal fin, se trabajó con muestras de ovarios de distintas procedencias: animales sometidos a un modelo experimental de inducción de COD; animales en producción con desarrollo espontáneo de la enfermedad, y muestras obtenidas en frigorífico.

Las muestras fueron procesadas de acuerdo a los requerimientos y a los fines de ser utilizadas para la evaluación de la expresión de Hsp27, Hsp60, Hsp70 y Hsp90 mediante inmunohistoquímica y western blot. El estudio de los ARNm de Hsp10, 27, 40, 60 70, 90 α y 90 β se llevó a cabo por RT-PCR a punto final.

Los niveles proteicos de Hsp27, Hsp60, Hsp70 y Hsp90 fueron claramente detectables en todos los estadios del ciclo ovárico bovino. Más aún, la expresión presentó variaciones a lo largo del desarrollo folicular normal y estos patrones de expresión se diferenciaron de los encontrados en ovarios de animales con enfermedad quística tanto inducida como espontánea. Los ARNm cuantificados correspondientes a Hsp10, Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 α y Hsp90 β también evidenciaron discrepancias en cuanto a su expresión entre estructuras foliculares normales y quísticas.

Los resultados de esta tesis y su relación con los reportes de otros autores permitieron arribar a las siguientes conclusiones: 1- Hsp27 y Hsp70, proteínas implicadas en la inhibición de los mecanismos de apoptosis, estuvieron sobreexpresadas en estructuras quísticas espontáneas. Para el caso de Hsp60 los ensayos a partir de ovarios obtenidos en frigorífico permitieron confirmar que la proteína se expresa mayormente en quistes, mientras que sus ARNm parecen estar elevados en granulosa de folículos antrales medianos confirmando lo hallado previamente por otros autores. Por su parte, la inmunodetección de Hsp90 mostró similitudes a lo encontrado para Hsp70, y esta correlación en los niveles de expresión podría explicarse teniendo en cuenta las funciones compartidas que cumplen dichas chaperonas; 2- en cuanto a las variaciones de Hsp10 durante la foliculogénesis normal, se observó que los mayores niveles fueron evidentes en folículos antrales respecto a lo observado en estructuras quísticas; lo que se condice con los hallazgos de otros autores en folículos de humanos y de ratón. El ARNm correspondiente a Hsp27, Hsp40 y Hsp70 se expresó de manera similar en la granulosa de los quistes, ya que en todos los casos sus niveles fueron inferiores a los encontrados en folículos antrales pequeños y medianos. La expresión de ARNm de Hsp60 en células de la teca coincidió con los niveles aumentados de la proteína encontrados en quistes espontáneos. Sin embargo, en la granulosa, la mayor expresión se encontró en folículos antrales medianos. Los resultados referidos a la expresión de ARNm correspondiente a las dos isoformas de Hsp90 (α y β) mostraron una baja expresión de Hsp90 β en quistes foliculares provenientes de frigorífico y un aumento

notable de la cantidad de ARNm de Hsp90 α ; 3- se han podido establecer relaciones entre algunas de las proteínas estudiadas en la presente tesis (HSPs) y variables descritas previamente por otros autores como partícipes de la enfermedad quística ovárica en bovinos. En este sentido, proteínas tales como Hsp27, Hsp70, Hsp40 podrían estar involucradas en el desbalance de los eventos de proliferación/apoptosis existente en las estructuras quísticas, inhibiendo a diferentes niveles la muerte celular programada y favoreciendo de esta manera la persistencia de las mismas. Asimismo, las isoformas Hsp90 α /Hsp90 β mostraron estar relacionadas con los niveles de expresión de los RE α y RE β , mediante lo cual se corroboró la implicancia de las HSPs mencionadas en la foliculogénesis normal y en alteraciones de la misma. 4- El modelo experimental utilizado permite el estudio y conocimiento de aspectos difíciles de abordar trabajando con muestras provenientes animales que presentaron la enfermedad de manera espontánea. Sin embargo, hubo diferencias entre el modelo utilizado y los casos espontáneos de quistes obtenidos en frigorífico, lo que podría explicarse por la alta variabilidad de las muestras obtenidas en frigorífico y la falta de información de los animales de los cuales provinieron estas muestras. El trabajo con animales que desarrollaron la enfermedad espontáneamente y de los cuales se conoce la historia podría ayudar a establecer y fijar más variables tales como estado corporal, balance energético, tratamientos previos, etc., que se relacionen con la patogenia de la enfermedad quística ovárica en el bovino.

SUMMARY

Reproductive processes, to be successful, should be synchronized with environment. The adverse conditions (for example, inadequate temperatures, reduced delivery of nutrients and exposure to harmful substances) induce stress in organisms and suppress reproduction through hormonal and nerve pathways. Similarly, adequate conditions for reproduction promote it via hormonal stimulators.

It has been shown that high temperatures can affect various reproductive events through imbalance of cellular proliferation/apoptosis and induce hypersecretion of steroid ovarian hormones. Also, stress has been identified as a possible etiologic factor of cystic ovarian disease (*COD*) and found a close relationship between the neuroendocrine mechanisms of stress response and the cellular activation of Heat Shock Proteins (HSPs) expression.

COD is a very important ovarian dysfunction in dairy cattle. It is characterized by the presence of follicular structures bigger than ovulatory size which remaining the time causing disturbances in ovarian function. *COD* can affect up to 15% of cows in the post partum period, when there is a transition from pregnancy to resumption of ovarian cyclicity. The diagnosis of *COD* is most often made during the first 60 days post partum, and this irregularity increases calving to conception and calving intervals causing significant economic losses to the dairy industry.

In the present study, we have described and evaluated the protein and mRNA levels of some HSPs in order to relate them to bovine normal folliculogenesis and to study their significance in the *COD*. We used ovarian samples from different sources: animals subjected to an experimental model of induction of *COD*; animal production with spontaneous *COD*; and samples from slaughterhouses.

The samples were processed according to the requirements and purposes of being used for the evaluation of Hsp27, Hsp60, Hsp70 and Hsp90 expression by immunohistochemistry and western blot. The study of mRNA expression of Hsp10, 27, 40, 60, 70, 90 α and 90 β was carried out by conventional RT-PCR. The protein levels of Hsp27, Hsp60, Hsp70 and Hsp90 were clearly detectable in all stages of the bovine ovarian cycle. Moreover, the expression showed variations during

the normal follicular development and these expression patterns differed from those found in the ovaries of both animals with cystic disease induced and spontaneous.

Levels of Hsp10, Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 α and Hsp90 β mRNAs showed differences related to expression between normal and cystic follicular structures.

The results of this thesis and its relation to reports of other authors allowed to arriving at the following conclusions: 1 - Hsp27 and Hsp70, proteins involved in the inhibition of apoptosis mechanisms, were overexpressed in spontaneous cystic structures. In the case of Hsp60 assays from ovaries obtained in a slaughterhouse will confirm the protein is expressed mainly in cysts, while their mRNAs appear to be increased in granulosa of medium antral follicles confirming what previously found by other authors. The immunodetection of Hsp90 was similar to Hsp70, and this relation could be explained taking into account the shared functions that meet these chaperones, 2 - Hsp10 mRNA showed higher levels in antral follicles during normal folliculogenesis than cystic structures, which is consistent with the findings of other authors in human follicles and mouse. The mRNA for Hsp27, Hsp40 and Hsp70 were similarly expressed in the granulosa of the cysts, and their levels were lower than those in small and medium antral follicles. The Hsp60 mRNA expression was increased in theca cells of spontaneous cysts as occurred with protein levels. However, in the granulosa, the highest expression was found in medium-sized antral follicles. Levels transcripts of Hsp90 isoforms (α and β) showed a less expression of Hsp90 β in follicular cysts from slaughterhouse and a significant increase in the amount of mRNA of Hsp90 α , 3 - relationships have been determined between some HSPs described in this thesis and variables described previously by other authors as determinant factors in the cystic ovarian disease in cattle. In this sense, proteins such as Hsp27, Hsp70, Hsp40 may be involved in the imbalance proliferation / apoptosis events of cystic structures, preventing programmed cell death and increasing the persistence of the cysts. Also, Hsp90 α /Hsp90 β isoforms were related to levels of expression of RE β and RE α , which confirm the implication of the HSPs in normal folliculogenesis and their abnormalities. 4 - The experimental model used allows the study and understanding of difficult issues to get when the work is carried out with samples from animals that developed spontaneous disease. However, there were differences between the model and the

spontaneous cases of cysts obtained in a slaughterhouse, which could be explained by the high variability of the samples and the lack of information of the animals from which came these samples. Working with animals that developed the disease spontaneously and the knowledge of the clinical story could help to establish and fix more variables such as body condition, energy balance, previous treatments, relating to the pathogenesis of cystic ovarian disease in cattle.

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Histofisiología del ovario.

El ovario es una combinación de glándula exocrina y endocrina, dado que libera óvulos (gametogénesis o “secreción” exocrina), y produce hormonas ováricas (esteroidogénesis o “secreción” endocrina). La producción cíclica de óvulos fecundables y de una proporción balanceada de hormonas esteroides, permiten la formación del embrión y desarrollo exitosos en el útero (Priedkalns, 1993; Hafez y Hafez, 2000).

En el bovino, esta glándula está constituida por una médula interna y una corteza externa. La médula ovárica, porción central, consiste de tejido conjuntivo fibroelástico irregularmente dispuesto y extensos sistemas vasculares y nerviosos que llegan al ovario a través del hilio (zona vascular). La corteza o estroma cortical se compone de tejido conectivo denso donde se localizan los folículos en distintos estadios de desarrollo, cuerpos hemorrágicos, cuerpos lúteos y cuerpos blancos (Frandsen y Spurgeon, 1995).

El folículo es el compartimiento ovárico que permite al ovario cumplir su doble función de gametogénesis y esteroidogénesis. Es una unidad fisiológica equilibrada cuyo funcionamiento y estructura dependen de factores extracelulares como las gonadotropinas, las que llevan a una sucesión de transformaciones subcelulares y moleculares de diversos componentes del folículo: el ovocito, las células de la granulosa y de la teca (Hafez y Hafez, 2000).

1.1.1 Foliculogénesis.

En la mayoría de los mamíferos, la proliferación de ovogonias está restringida al desarrollo prenatal, por lo que, antes del nacimiento detienen sus procesos mitóticos y entran en la profase de su primera división meiótica, transformándose en ovocitos primarios. Éstos, se rodean de una sola capa de células foliculares planas, constituyendo los llamados *folículos primordiales*. Los mismos, constituyen el reservorio de folículos “en reposo”, los cuales se agotan progresivamente a lo largo de la vida fértil de la hembra. 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.

Cuando algunos de estos folículos primordiales inician su maduración, sus células foliculares se transforman de un epitelio plano simple a uno cúbico, dando lugar

a los denominados *folículos primarios*. La evolución de éstos a *folículos secundarios* (preantrales, en crecimiento) se produce a partir de la estratificación multilaminar de las células, que se denominan ahora células de la granulosa. Los folículos preantrales se caracterizan por el desarrollo de la *zona pelúcida* (ZP), una capa glicoproteica de 3 a 5 mm de espesor, que se sitúa alrededor de la membrana plasmática del ovocito. Hacia el final de la fase de folículo preantral, comienza a formarse alrededor de la capa de células de la granulosa, una capa multilaminar vascularizada de células alargadas (en forma de huso), denominadas *células de la teca*. Conforme crecen y proliferan las células granulosas y tecales, el folículo va aumentando notablemente su tamaño y empiezan a aparecer cúmulos de líquido entre las células de la granulosa, que van confluyendo a la vez que aumentan de tamaño, y dan lugar a una cavidad central llena de líquido (folicular) denominada *antro*. Estas transformaciones dan lugar a los *folículos terciarios* (multilaminares, antrales y en crecimiento) o también llamados *folículos de De Graaf*, en los que el ovocito ocupa una posición excéntrica rodeado de dos o tres capas de células granulosas, que componen el denominado *cúmulo ovígero*. El estrato granuloso en los folículos antrales está rodeado por la teca, que se diferencia en dos capas, la *teca interna*, que es vascular y la *teca externa*, que es de soporte. La teca externa consiste en una fina capa de tejido conjuntivo laxo con fibroblastos dispuestos concéntricamente alrededor de la teca interna (Figura 1; Tabla 1). Tanto las células de la teca y de la granulosa de los folículos preantrales terminales como de los folículos antrales iniciales, responden a las hormonas gonadotróficas foliculoestimulante y luteinizante (FSH y LH, respectivamente). Al final de esta fase, los folículos son llamados *folículos preovulatorios* o *maduros*. 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. El folículo ovulatorio maduro alcanza un tamaño aproximado de 17 mm en la vaca y cuando se encuentra desarrollado al máximo, sobresale de la superficie del ovario. Una serie de eventos debe ocurrir para que se produzca la ovulación. La pared folicular se adelgaza, se producen pequeñas hemorragias en la misma y se hace transparente en el lugar de la ruptura folicular, el *estigma*. Los cambios en la pared folicular que preceden a su ruptura están causados por la liberación de colagenasas que causan la digestión de la pared folicular y su distensión en el estigma. Este proceso de digestión también

ocasiona la liberación de proteínas que provocan una respuesta inflamatoria con infiltración leucocitaria y liberación de histamina. Todos estos procesos degradan el tejido conjuntivo de la pared folicular y la sustancia base del cúmulo ovífero de tal manera que el folículo, finalmente se rompe en el estigma y el ovocito es liberado (Figura 2) (Priedkalns, 1993).

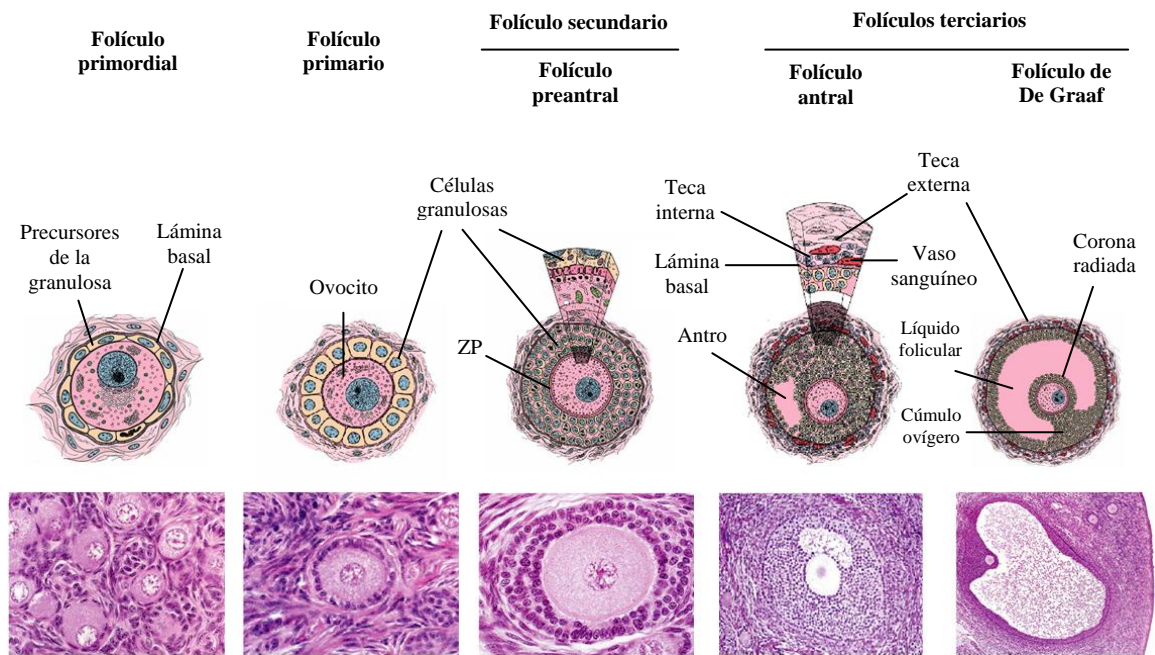


Figura 1. Principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento con sus componentes (Adaptado de Ross y col., 2004).

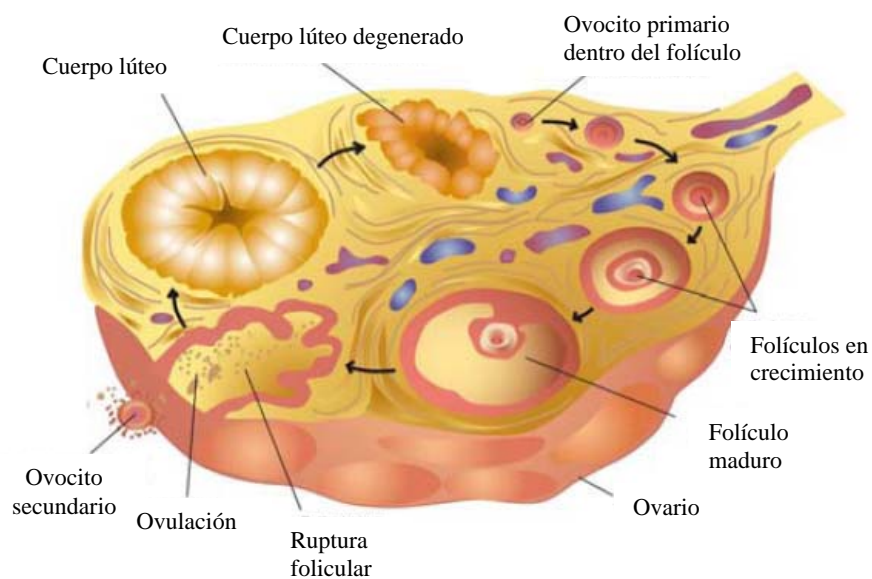


Figura 2. Esquema de un corte longitudinal de ovario donde se observan las distintas categorías foliculares en crecimiento, ovulación y formación de cuerpo lúteo (adaptado de Enciclopedia Bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM)

Tabla 1. Clasificación morfológica de folículos ováricos más empleada para bovinos (Braw-Tal y Yossefi, 1997).

Clasificación	Capas de la granulosa	Diámetro Folicular (µm)	Zona Pelúcida	Teca Interna	Antro folicular
Primordial	1 (aplanadas)	40	-	-	-
Primario	1-1,5 (cúbicas)	40-80	-	-	-
Preantral pequeño (Secundario)	2-3	81-130	-	-	-
Preantral grande (Secundario)	>4	131-250	+	+	-
Antral (Terciario)	>6	>250	++	++	+

1.1.2 Atresia folicular

Al momento del nacimiento, los ovarios bovinos contienen varios cientos de miles de folículos primordiales, sin embargo, menos del 0,5% de esa población alcanzan la madurez y ovulación (Irving-Rodgers y col., 2001). Sólo uno de los folículos que inician el desarrollo en una onda folicular llega hasta la etapa final de la ovulación, por lo que la mayor parte de ellos degenera, experimentando su regresión en algún momento de su desarrollo. Esta regresión recibe el nombre de *atresia folicular*, y puede ocurrir en cualquiera de las etapas del crecimiento folicular. Se caracteriza por cambios degenerativos no inflamatorios que llevan a la pérdida del ovocito y células de la granulosa. Si bien la atresia es un evento que culmina en la muerte de las células involucradas, también se trata de un proceso celular activo en donde ocurren la reabsorción de los folículos como producto de la infiltración de macrófagos y la fagocitosis; la migración de fibroblastos tecales y la producción de colágeno (Martin 1997; Schultz and Wysocki 2009; Rodgers e Irving-Rodgers, 2010).

En la atresia de los folículos primarios y preantrales de la vaca, el ovocito degenera antes que la pared folicular, mientras que en los folículos antrales sucede lo contrario (Priedkalns, 1993; Hafez y Hafez, 2000).

Durante las últimas décadas muchos estudios han sugerido que la apoptosis celular es un mecanismo que subyace en la atresia folicular (Manabe y col., 2004). Genes específicos relacionados con la apoptosis tales como caspasa 3 y el factor activador de proteasas apoptóticas 1 (APAF-1) se expresan en la granulosa de los folículos atrésicos (Herwitz, A. y Adashi, E., 1993; Tilly, J. L., 1998). En este sentido, Nakayama y col. (2000) demostraron que en el bovino, las células más externas de la capa de la granulosa, sufren apoptosis en estadios tempranos de la atresia folicular. Por otro lado, el desprendimiento y degeneración de dichos estratos y la fragmentación de la membrana basal ocurren en un estadio tardío de dicho proceso. Posteriormente, Irving-Rodgers y col. (2001) reportaron que folículos antrales bovinos pueden sufrir dos tipos de atresia, y éstas se diferencian en el sitio donde tiene origen la muerte celular. Por otro lado, la visualización de núcleos picnóticos en los estratos de la granulosa hace posible identificar cada una de ellas. En función de dichas características, se han abordado y definido los distintos tipos de atresia en estructuras foliculares de bovinos (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de la atresia en folículos ováricos bovinos.

Ortega y col. (2007a)	Irving-Rodgers y col. (2001)	Marion y col. (1968)	Rajakoski (1960)
Atresia obliterativa	Atresia antral	Atresia definida (u obliterativa)	Atresia obliterativa (de primer, segundo y tercer grado)
Atresia quística	Atresia basal Atresia antral avanzada	Atresia tardía Atresia definida (quística)	Atresia quística

1.1.3 Endocrinología del crecimiento folicular y la ovulación.

La reproducción en las hembras constituye un proceso cíclico estrictamente regulado por la interacción del hipotálamo, la hipófisis y los ovarios. El sistema nervioso desempeña una función esencial en la regulación de la actividad de las gónadas por medio de mecanismos de retroalimentación endocrina, vías neurales y control inmunoendocrino (Hafez y col., 2000). La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) de origen hipotalámico, proporciona un enlace entre los sistemas neural y endocrino. Los cambios en las tasas de síntesis y liberación de GnRH, así como la velocidad de degradación de la misma, son factores que modifican la biosíntesis y

liberación de hormonas gonadotróficas desde la hipófisis anterior. La GnRH es sintetizada en núcleos de la zona preóptica del hipotálamo y luego transportada a través de sus axones terminales a la eminencia media hipotalámica, para ingresar a la circulación portal y ser liberada en la adenohipófisis. La GnRH se une a los receptores presentes en las células gonadotrofas hipofisarias regulando de esta manera la secreción de LH y FSH. En respuesta a señales neurales, se libera GnRH de manera pulsátil hacia el sistema portal hipofisario para la liberación “en pulsos” de LH y FSH desde la hipófisis anterior. Las hormonas ováricas ejercen un efecto estimulador (retroalimentación positiva) e inhibitor (retroalimentación negativa) sobre el eje hipotálamo-hipofisario, determinando dos tipos de secreciones de gonadotrofinas: *tónica*, manteniendo niveles basales; y *cíclica*, produciendo un aumento rotundo de los niveles, en un momento determinado del ciclo reproductivo. Además, algunos péptidos gonadales estimulan (especialmente activinas) o inhiben (inhibinas, folistatina) la secreción de FSH a nivel hipofisario (Hillier, 2001; Knight y Glister 2001). Este sistema de regulación es denominado eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y se muestra de manera esquemática en la Figura 3.

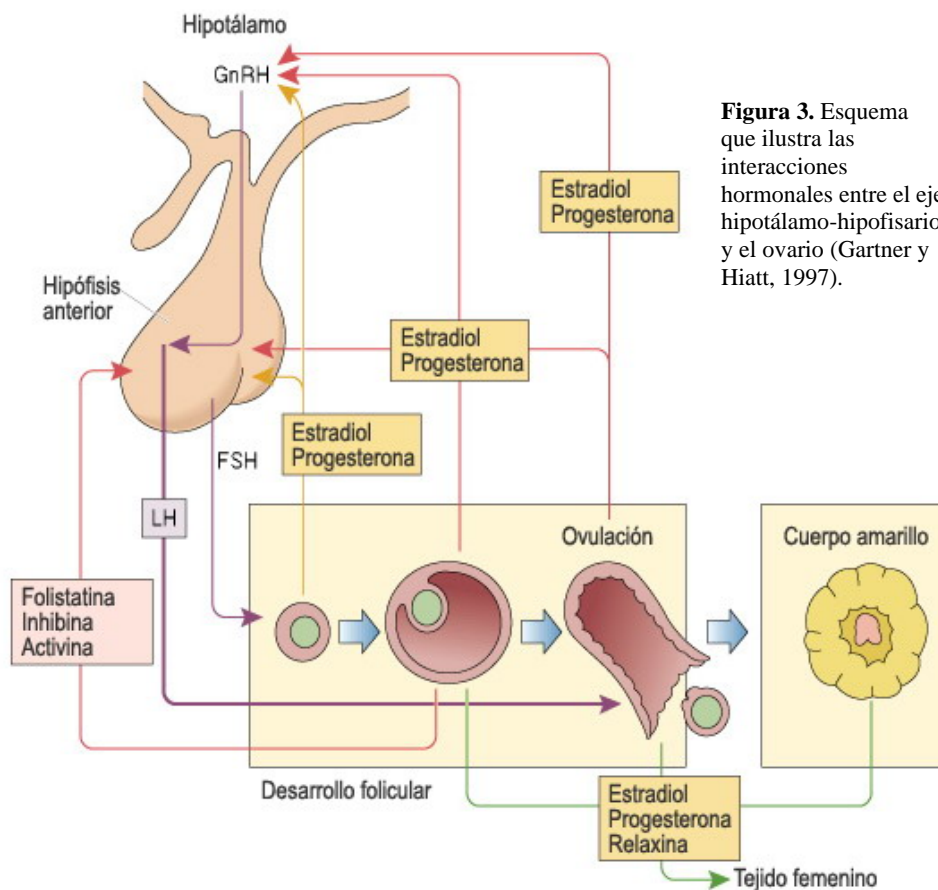


Figura 3. Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipofisario y el ovario (Gartner y Hiatt, 1997).

El crecimiento y la maduración folicular, la ovulación y luteinización, son procesos integrados que abarcan señales extraováricas, tales como concentraciones suficientes y proporcionadas de hormonas metabólicas y gonadotróficas, así como factores intraováricos. Existen evidencias de que la foliculogénesis es independiente de la FSH hasta la etapa en que se forma el antro folicular, ya que la fase inicial de la misma es regulada por otros factores locales, como el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9), proteínas morfogénicas óseas (BMPs), activinas, inhibinas, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento epidermal (EGF), receptor del factor análogo a insulina 1 y las proteínas de unión a dichos factores (IGF-1R e IGFBP-2 y -3) (Díaz, 1999; Hafez y Hafez, 2000; Armstrong y col., 2002; Diskin y col., 2003; Webb y Campbell, 2007). En este sentido, si bien la presencia de FSH no es un requerimiento esencial, los folículos antrales están bajo el control de esta gonadotropina dado que, sin el aumento transitorio de la misma, no hay emergencia de la onda folicular (Adams, 1999; Eppig, 2001; Webb y Campbell, 2007).

Las concentraciones tónicas de FSH y de LH son controladas por retroalimentación endocrina negativa desde las gónadas. La frecuencia y amplitud de los pulsos de LH están influenciadas por las concentraciones circulantes de progesterona y estradiol. El principal efecto del estradiol es inhibir la liberación de FSH hipofisaria, conjuntamente con otros factores como IGFs, inhibina y folistatina, que producen los folículos antrales y sinergizan el efecto del estradiol (Wiltbank y col., 2002; Ortega y col., 2008; Adams y col., 2008; Rey y col., 2010; Rodríguez y col., 2011). La FSH, como se mencionó anteriormente, tiene una función importante en el inicio de la formación de la cavidad antral. Los folículos preantrales en su etapa tardía así como los folículos antrales tempranos, expresan receptores (FSHr) para dicha hormona. Esta gonadotropina, estimula la mitosis de las células de la granulosa, la formación del líquido folicular y la actividad esteroideogénica del folículo maduro. Estos eventos responden a cambios en los patrones de expresión de los receptores de gonadotropinas (LHr y FSHr) como de enzimas esteroideogénicas (citocromo P450 aromataza, 3- β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa) que ocurren en este estadio del desarrollo folicular y en cada uno de los estratos celulares que integran los folículos (Bao y col., 1998; Webb y col., 1999; Zurvarra y col., 2009; Pretheeban y col., 2010; Alfaro y col., 2011). Por otro lado, las concentraciones séricas basales de LH, interaccionan con los receptores

gonadotróficos presentes en las células de la teca interna de los folículos antrales y estimulan la producción de andrógenos y pequeñas cantidades de estrógenos (principalmente 17β -estradiol). Estos andrógenos son secretados a los capilares o bien atraviesan la lámina basal para alcanzar la capa de células de la granulosa donde se produce su aromatización por acción de las enzimas esteroideogénicas. 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 secreción de estrógenos, dada la presencia de receptores de LH en las células de la granulosa de folículos maduros (Bodensteiner y col., 1996; Robert y col., 2003). Este aumento en el número total de receptores de LH en el folículo maduro, lo hacen sensible a las altas concentraciones de LH de la onda preovulatoria, al mismo tiempo que lo preparan para el proceso de luteinización posterior a la ovulación (Jolly y col., 1994; Wiltbank y col., 2002; Mihm y Austin, 2002). El aumento en la concentración de estrógenos circulantes debido a la marcada actividad esteroideogénica del folículo dominante, tiene un efecto de retroalimentación positiva en el centro cíclico del hipotálamo. Esto induce una onda repentina de liberación de GnRH, la cual se acompaña por la onda preovulatoria de LH y FSH. Luego de la ovulación, el folículo se retrae, dado que la presión del líquido folicular se reduce y mediante un plegamiento de la pared folicular que es muy notable, se forma lo que se conoce como *cuerpo hemorrágico*. Las células de la granulosa aumentan de tamaño, se multiplican bajo el influjo de la LH, y contribuyen a formar la población de células luteínicas grandes del cuerpo lúteo. Las células de la teca interna, también contribuyen a la formación del mismo. La LH hace que las células de la granulosa y de la teca se conviertan en células lúteas (por hipertrofia e hiperplasia de las mismas) y produzcan *progesterona*, hormona necesaria para mantener la gestación. En la vaca, el cuerpo lúteo está totalmente desarrollado y vascularizado a los nueve días de la ovulación, pero continúa creciendo hasta el duodécimo día, en el que alcanza, aproximadamente, un diámetro de 25 mm. La progesterona producida en altas concentraciones por dicha glándula, es esencial para el mantenimiento de la preñez temprana, inhibe la producción de gonadotrofinas a nivel hipotálamo-hipofisario, controlando mediante el sistema de retroalimentación, los niveles de LH (Day y Anderson, 1998)

1.1.4 Ciclo estral en bovinos

El ciclo estral dura de 17 a 25 días en vacas adultas y se define como el intervalo entre el comienzo de un celo y el siguiente. La primera ovulación en la vida del animal, ocurre en la pubertad y marca el comienzo de un patrón rítmico de ciclicidad reproductiva (Senger, 2003).

El ciclo es regulado por mecanismos endocrinos y neuroendocrinos; esto es, por hormonas hipotalámicas e hipofisarias (gonadotrofinas) y por la acción de hormonas esteroides secretadas por los ovarios. Consiste de la *fase folicular* en la que se incluyen proestro y estro, y la *fase luteal* con metaestro y diestro (Figura 4).

La *fase folicular* abarca un período de tiempo relativamente corto del ciclo estral. Comienza con la regresión del cuerpo lúteo (CL) y el evento final de la misma es la ovulación. Desde el punto de vista endocrino, se da un cambio de la dominancia por progesterona a la dominancia por estrógenos, como resultado de la regresión funcional y estructural del CL y también por el desarrollo de un folículo preovulatorio.

Proestro

El proestro es el tiempo inicial de la fase folicular que comienza con la regresión estructural y funcional del CL y termina con el inicio del estro. Conforme el CL regresa y las concentraciones de progesterona disminuyen, van aumentando las concentraciones de estradiol, que juega un papel importante en el aumento del tono uterino (Bonafos y col., 1995; Jainudeen y Hafez; 2000).

Estro

Es la última fracción de tiempo de la fase folicular. Puede durar 18+/- 6 hs. Durante el estro, las concentraciones circulantes de estradiol alcanzan el máximo y en forma asociada se da el inicio del comportamiento sexual receptivo o celo. A nivel endocrino, el centro cíclico hipotalámico recibe el estímulo de los estrógenos y se produce el pico de GnRH y en consecuencia el pico de LH. Dicha onda de LH, precede en aproximadamente 24 - 30 horas a la ovulación (Roelofs y col.; 2005).

La *fase luteal* es el período más largo del ciclo, abarca desde la ovulación hasta la regresión del CL, e involucra metaestro y diestro. Se pasa de la dominancia de estrógenos a la dominancia por progesterona.

Metaestro

Es el período inmediato a la finalización del celo. En este período ocurre la ovulación en el bovino, a diferencia de otras especies que lo hacen durante el estro, y comienza la organización celular y desarrollo del cuerpo lúteo. Se extiende durante 6 días aproximadamente. Implica la luteinización de células foliculares del anterior folículo dominante, un proceso complejo que involucra la remodelación del estroma y vasos sanguíneos y transformación bioquímica de las células productoras de andrógenos (teca) y estrógenos (granulosa), en células productoras de progesterona (Niswender y col., 2000).

Diestro

Comienza luego del metaestro y finaliza con la regresión del CL. A través del diestro, el CL maduro mantiene concentraciones máximas de progesterona durante la emergencia de la segunda onda folicular, evitando que el folículo seleccionado ovule. En ausencia de preñez, la regresión estructural y funcional del CL ocurre espontáneamente en respuesta a la prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF_{2\alpha}$) durante el final del diestro, para formar un cuerpo blanco al comienzo del proestro.

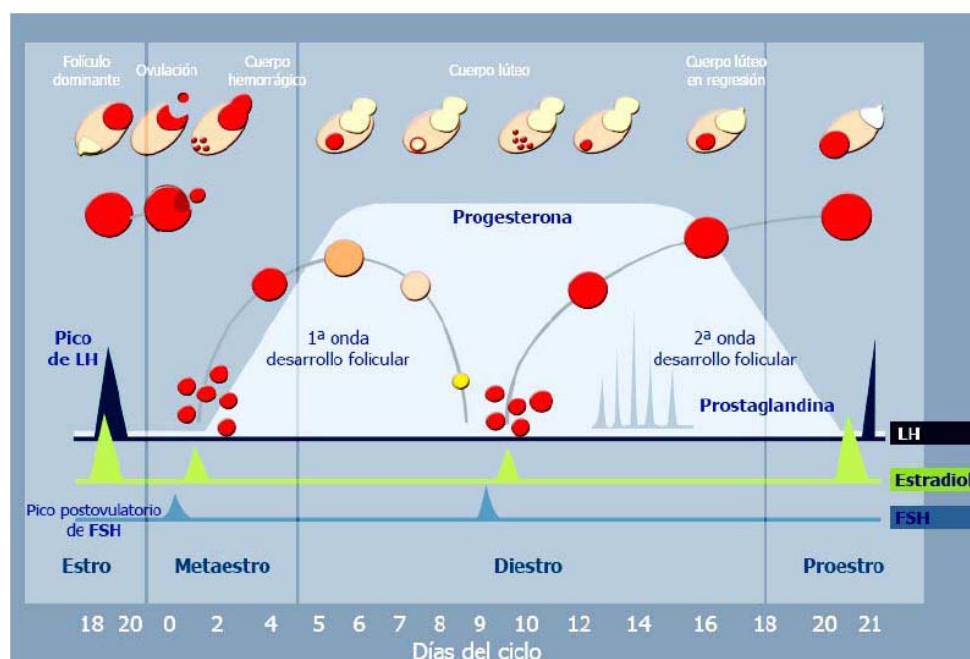


Figura 4. Diagrama del ciclo estral bovino mostrando los niveles hormonales en cada una de las etapas de las fases folicular y luteal (Adaptado de Enciclopedia Bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM)

1.1.5 Ondas foliculares en bovinos.

En el bovino existen varios miles de folículos ováricos, pero sólo un ovocito es liberado en cada ciclo estral. El proceso de crecimiento continuo y regresión de folículos antrales que conduce al desarrollo del folículo preovulatorio se conoce como dinámica folicular y se refiere al crecimiento de dichas estructuras en oleadas o grupos. Durante un ciclo estral pueden ocurrir una o más oleadas u ondas (Lucy y col., 1992). Observaciones mediante ultrasonografía han revelado que el desarrollo de folículos ováricos durante el ciclo estral de la vaca ocurre en un patrón con forma de ondas (Figura 5), con una onda como mínimo y cuatro como máximo (Ginther y col. 1989; Jainudeen y Hafez, 2000).

No se conoce con certeza qué factores influyen antes de la pubertad para que un folículo primordial deje la reserva y reinicie su crecimiento en un proceso que se ha denominado reclutamiento inicial, aunque se han señalado algunos factores de crecimiento, ciertas neurotropinas y a la hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH) como inductores de dicho proceso. La etapa del reclutamiento conocida como reclutamiento cíclico, donde los folículos antrales pequeños entran en el pool de folículos de cada onda folicular, comienza casi inmediatamente después del nacimiento como resultado de los incrementos en la secreción de FSH de manera transitoria. Estos aumentos de FSH se registran antes de cada onda folicular ya en el periodo prepuber. (Mihm y Austin, 2002; Espinoza-Villavicencio y col., 2007). Precisamente, el cambio hormonal más notable durante el ciclo estral es el pico de FSH que estimula la emergencia de cada onda folicular. El aumento inicial de FSH se ha asociado con la existencia de folículos de 1 a 3 mm de diámetro y el pico de mayor concentración de FSH es notable cuando el folículo mayor del grupo emergente alcanza los 4 mm de diámetro. Luego, los niveles de dicha gonadotropina disminuyen hasta concentraciones basales, pero el folículo dominante continúa creciendo, ya que es sensible a la LH; mientras que los subordinados, que son FSH dependientes, sufren atresia (Peter y col., 2009).

Una onda de desarrollo folicular se puede definir como el desarrollo armónico y simultáneo de entre 8 y 41 folículos antrales pequeños de aproximadamente 3-4 mm de diámetro funcionando a través de estadios integrados de reclutamiento, selección y

dominancia folicular (Adams y col., 2008). La emergencia, desviación y dominancia son los sucesos más relevantes de la onda folicular:

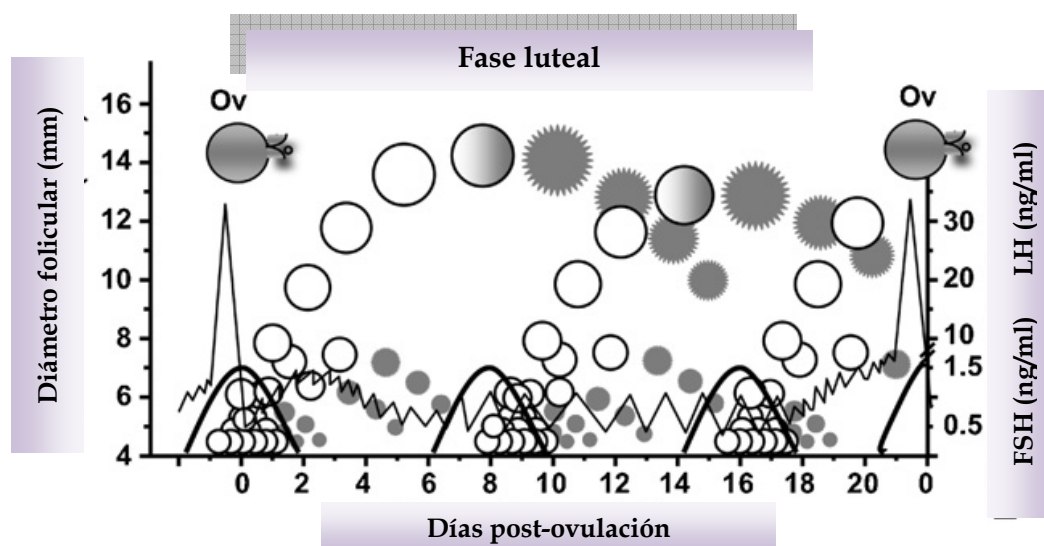


Figura 5. Dinámica del desarrollo folicular y secreción de gonadotropinas durante un ciclo estral bovino con 3 ondas preovulatorias (adaptado de Adams y col., 2008)

Reclutamiento y Emergencia: un grupo de folículos antrales son seleccionados para que inicien el proceso de crecimiento, por un notable aumento de las concentraciones de FSH (Webb y col, 2003). Los niveles de esta hormona comienzan a disminuir cuando el folículo más grande de la cohorte alcanza un diámetro mayor o igual a 4 mm. Este reclutamiento ocurre durante los primeros 5 días del ciclo estral y posteriormente a los 10 y 16 días en vacas con 3 oleadas (Ginther y col., 1996). Tanto la primera como la segunda onda van precedidas por el mencionado aumento de FSH en los niveles séricos. Al aproximarse el estro se registran dos picos de dicha hormona temporalmente adyacentes. El primero corresponde al pico de GnRH/LH que induce la ovulación, y el segundo ocurre poco después de la ovulación y se asocia con la emergencia de la siguiente onda folicular (Ginther, 2000).

Desviación y Selección folicular: un folículo es seleccionado a partir del grupo de folículos que emergieron y pasa a tener un crecimiento continuo hasta un tamaño preovulatorio, mientras los demás folículos de la onda (subordinados) regresan. La desviación en bovinos comienza con una reducción en la tasa de crecimiento de los

folículos subordinados que contrasta con la tasa de crecimiento constante en el folículo dominante (Beg y col., 2002). El inicio de la desviación se da cuando el diámetro de los folículos mayores alcanzan los 8 mm (Peter y col., 2009). No obstante, el mecanismo de selección está determinado por mecanismos intraováricos. Como consecuencia, el folículo dominante expresa mayor número de receptores para LH que los subordinados en las células de la teca y además adquiere receptores de LH en las células de la granulosa (que los subordinados no tienen). Por ello, es ampliamente aceptado que la LH está involucrada en el proceso de selección, ya que los sucesos de desviación de tamaño y aumento de LH ocurren simultáneamente (Adams y col., 2008). Por otro lado, la regresión de los folículos de menor tamaño es atribuida a una inadecuada concentración de FSH y carencia de receptores para esta gonadotropina en las células de la granulosa. En efecto, el folículo seleccionado incrementa la secreción de estradiol lo que provoca la supresión de las concentraciones de FSH, y la consecuente atresia de los folículos subordinados.

Dominancia folicular: el máximo diámetro de los folículos dominantes, tanto de ondas ovulatorias como anovulatorias es aproximadamente 16 mm en *Bos taurus*. La naturaleza de la dominancia representa tanto aspectos fisiológicos (expresión de receptores de LH en granulosa) como endocrinos del folículo dominante, que secreta grandes cantidades de estradiol, los que sumados a la inhibina, generan un ambiente inhibitorio para el desarrollo de los folículos subordinados (Gigli y col., 2006). Algunos efectos autocrinos y paracrinos del estradiol en células de la granulosa, incluyen un aumento en la actividad y expresión del ARNm de la enzima P450aromatasa (Gore-Langton y Armstrong, 1994), promoción de una mayor expresión de FSHr y LHR, por ende un incremento de la sensibilidad a las gonadotropinas (Richards y col., 1979) y una mayor síntesis de factores análogos a la insulina (IGFs del inglés *Insulina-like Growth Factor*) (Hsu y Hammond, 1987). La participación del sistema IGF en el desarrollo folicular y en la selección del folículo dominante es relevante (Donadeu y Ginther, 2002). En bovinos, incrementa la producción de progesterona y estradiol, aumenta la sensibilidad de las células de la granulosa al estímulo de la FSH, al mismo tiempo que estimula la proliferación y diferenciación de células de la granulosa y de la teca (Monget y Monniaux, 1995).

Finalmente, cuando el folículo dominante de la última onda ovulatoria alcanza su fase preovulatoria, los folículos subordinados ya están en el proceso de atresia.

1.2 Disfunción ovárica

1.2.1 Anestro

El anestro es un estado de completa inactividad sexual, sin manifestaciones de estro. No es una enfermedad en sí, pero puede ser un signo de diversos trastornos. Aunque el anestro se observa durante determinados estados fisiológicos (lactación, gestación) más a menudo es un signo de depresión temporal o permanente de la actividad ovárica (anestro real, patológico) causado por cambios en el ambiente físico, deficiencias nutricionales, estrés, entre otros (Jainudeen y Hafez, 2000).

Peter y col. (2009) agruparon los tipos de anestro patológicos en 4 clases, basándose en criterios de clasificación asociados a la dinámica folicular (Figura 6):

Tipo I: hay folículos en crecimiento pero no alcanzan la fase de desviación. Existen folículos de menos de 10 mm en ausencia de CL (Mwaanga y Janowski, 2000).

Tipo II: es alcanzada la desviación y la dominancia, pero el folículo preovulatorio de la última onda falla en ovular y regresa. Hay ausencia de CL (Fielden y col., 1980; Markusfeld, 1987; Mwaanga y Janowski, 2000)

Tipo III: dado por una hipofuncionalidad ovárica o degeneración quística. El folículo dominante de las ondas ovulatorias y anovulatorias fallan tanto en la ovulación como en la regresión. Persisten con un tamaño preovulatorio o incluso aumentan de tamaño formando un folículo dominante persistente, que posteriormente puede derivar en la formación de un quiste folicular (Gümen y Wiltbank, 2002; López-Gatius y col., 2001; Mwaanga y Janowski, 2000)

Tipo IV: ocurren en tiempo adecuado la ovulación y la formación del CL, pero éste último persiste por más tiempo del esperado, extendiéndose así excesivamente el intervalo interovulatorio (Wiltbank y col., 2002).

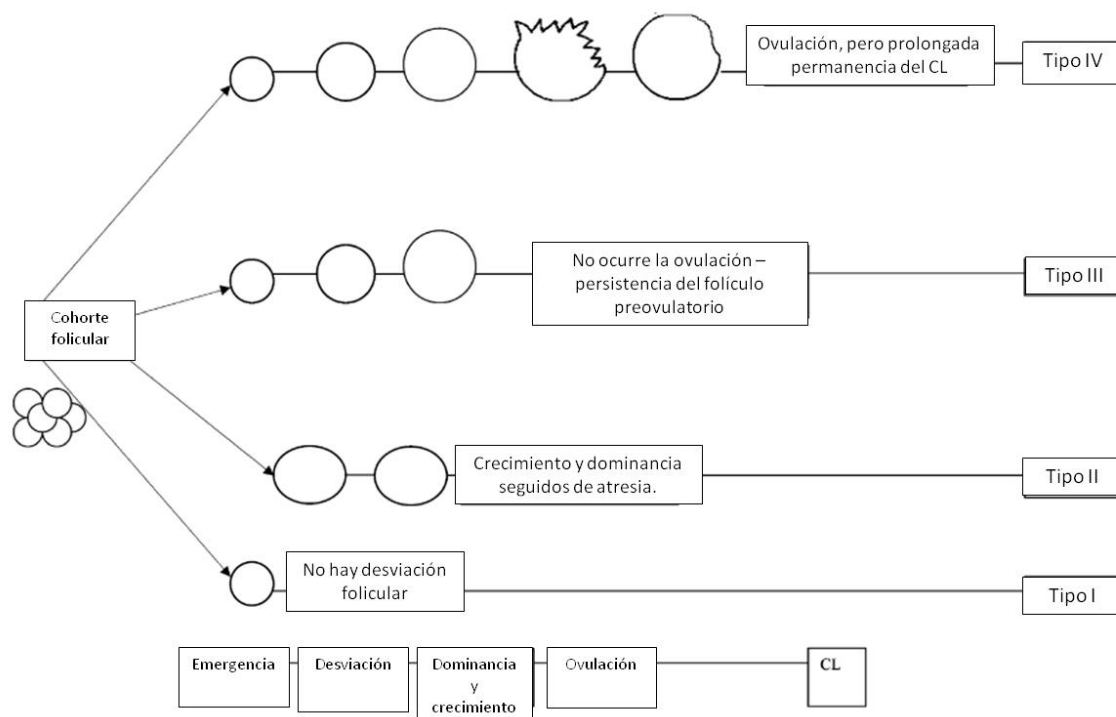


Figura 6. Representación esquemática de los tipos de anestro basada en las características morfológicas y fisiológicas de los folículos ováricos bovinos (adaptado de Peter, 2004).

1.3 Enfermedad quística ovárica (COD del inglés *Cystic Ovarian Disease*)

Es una enfermedad frecuente en vacas lecheras, en especial las de alta producción, aunque ocasionalmente también se presenta en animales destinados a la producción de carne. 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. Esta enfermedad puede afectar hasta un 15% de las vacas en el período posparto, momento crítico en el que hay una transición desde una condición no-cíclica (durante la preñez) al establecimiento de la ciclicidad regular (Garverick, 1997; Peter, 2004). Precisamente, el diagnóstico de COD es frecuentemente realizado durante los primeros 60 días posparto y, esta irregularidad, lleva a prolongar el intervalo parto-concepción, provocando grandes pérdidas a la producción pecuaria general. Además, provoca una disminución en las tasas de preñez en la primera inseminación y por ende aumenta el número de servicios requeridos para lograr la concepción (Shrestha y col., 2004). La incidencia de COD varía entre el 6 y 30% dependiendo del país, el

establecimiento y el manejo de los animales (Kesler y Garverick, 1982; Bartlett y col., 1986; Fleisher y col., 2001). La autorrecuperación del animal que sufre la enfermedad en los primeros 60 días posparto es del 60-65% (Day, 1991) y este retorno temprano a la ciclicidad ovárica normal favorece notablemente su fertilidad (López-Gatius y col., 2002).

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

Los quistes son estructuras foliculares dinámicas, presentes en uno o ambos ovarios, con un diámetro de más de 18 mm y una persistencia de más de 10 días en ausencia de tejido luteal y con pérdida de la tonicidad uterina (Silvia y col., 2002; Bartolomé y col., 2005). Los mismos pueden regresar y ser reemplazados por nuevos; pueden atresarse o luteinizarse, e inclusive producirse la ovulación en presencia de ellos, lo que evidencia el dinamismo de la enfermedad (Hamilton y col., 1995; Silvia y col., 2002; Vanholder y col., 2006).

1.3.1 Factores predisponentes en la formación de quistes.

Han sido descriptos diversos factores asociados con el desarrollo de COD en bovinos (Liptrap y McNally 1976; Kesler y Garverick, 1982; Bosu y Peter, 1987; López-Díaz y Bosu, 1992; Garverick, 1997; Peter, 2000; Ribadu y col., 2000) los que pueden clasificarse en factores generales y específicos, y se detallan a continuación.

1.3.1.1 Factores generales

La **herencia** aparece como uno de los factores menos relevantes. Se ha visto que la enfermedad presenta mayor ocurrencia en algunas líneas de ganado vacuno, sin embargo este fenómeno es poco frecuente. Es posible que la selección de animales con alta capacidad productiva, favorezca que aquellos con predisposición genética a desarrollar COD como consecuencia de los trastornos metabólicos asociados a la alta producción, incrementen la incidencia de esta enfermedad (Hooijer y col., 2001). La tasa de heredabilidad es baja (0,07 a 0,12 %) y no existen evidencias claras de cuál/es es/son el/los gen/es involucrados.

La alta **producción láctea**, se correlaciona positivamente con la aparición de quistes, ya que la nutrición y la producción de leche están estrechamente relacionadas. Tanto las condiciones intensivas como extensivas de producción pueden confrontar a los animales a una disponibilidad inadecuada de alimentos. En el período posparto, los requerimientos energéticos para sostener la producción muchas veces son mayores que la incorporación energética que logra el animal, lo que genera un balance energético negativo (BEN) en el mismo. Sin embargo, algunos animales pueden compensar la alta producción con mayores ingestas de materia seca, reduciendo de esta manera el efecto de la producción sobre el balance energético (Lucy, 2001). Esto explicaría por qué no todos los autores coinciden en la relación que existe entre la formación de quistes y la producción de leche (Refsdal, 1982; Nanda y col., 1989; Beam y Butler, 1999; Zulu y col., 2002).

En cuanto a la **condición corporal (CC)**, se sabe que animales con CC superior a 4 (escala de 0 a 5) suelen presentar quistes con una frecuencia 2.5 veces superior, respecto a aquellas vacas cuya CC es menor o igual a 3. En este sentido, los altos índices de movilización lipídica aumentan el riesgo de hipocalcemia, acidosis, hígado graso, cetosis y desplazamiento abomasal llevando al animal a un estado de estrés (Maizon y col., 2004; Overton y Waldron, 2004). En efecto, las vacas afectadas por estos trastornos metabólicos son más propensas al anestro (López-Gatius y col., 2002; Maizon y col., 2004).

La **falta de ejercicio** podría ser otro de los factores contribuyente al desarrollo de quistes. En los últimos años se ha producido una intensificación de la producción agropecuaria, ya que la demanda mundial de alimentos y biocombustibles deja un margen cada vez menor para la ganadería extensiva tradicional. Esto ha llevado a la creación de un sistema semi-estabulado de los animales con las alteraciones que esto trae aparejado.

Por otro lado, la tasa de quistes ováricos aumenta con la **edad**, siendo muy raro su hallazgo en vaquillonas. La mayor frecuencia de la enfermedad en el puerperio denota el efecto de los disturbios endocrinos, característicos de esa etapa de la vida de la hembra bovina, en el desarrollo de esta enfermedad.

1.3.1.2 Factores específicos

Alimentación: Para suplir los requerimientos nutricionales durante la lactancia, las dietas de las vacas lecheras son complementadas con alimentos concentrados cuyo contenido proteico es alto. Las dietas altas en proteínas estimulan la producción de leche en la lactancia temprana (Butler, 1997) pero se ha demostrado que el consumo de proteína por encima de las necesidades para la producción, genera un efecto negativo sobre la eficiencia reproductiva (Canfield y Butler., 1990). Un mecanismo por el cual el exceso de proteína en la dieta afecta negativamente el comportamiento reproductivo es por el incremento del gasto energético para desintoxicar al hígado del exceso de NH_3 (Staples y col., 1998). Por ello la COD es comúnmente observada en vacas de alta producción durante la lactancia temprana. Precisamente, la privación aguda de energía está asociada a la supresión de la liberación pulsátil de LH así como a la anovulación por ausencia del pico preovulatorio de la misma. Más aún, la vaca en anestro, es más sensible al efecto de retroalimentación negativa de los estrógenos sobre el sistema hipotálamo-hipofisario-gonadal (Diskin y col., 2003).

Con respecto a otros desórdenes metabólicos, se ha sugerido que la resistencia insulínica o la hiperinsulinemia no tienen un rol importante en la etiología de la enfermedad en bovinos, sin embargo esto no ha sido estudiado en profundidad aún (Opsomer y col., 1999).

El rol de los fitoestrógenos en el desarrollo de la COD, en cambio, no ha sido completamente dilucidado, aunque algunos investigadores sugieren que forrajes conteniendo altas concentraciones de compuestos estrogénicos podrían predisponer al animal a dicha enfermedad (Roberts, 1986).

Las **infecciones uterinas:** predominan en el periodo posparto y estimulan la secreción de cortisol y $\text{PGF}_{2\alpha}$ lo que predispone a las vacas al desarrollo de COD (Bosu y Peter 1987). Las endotoxinas bacterianas liberadas son las que ejercen dicha estimulación y suprimen de esta manera la oleada preovulatoria de LH. El mecanismo a través del cual ocurre esta modulación es desconocido (Peter y col., 1991; Suzuki y col., 2001), sin embargo las endotoxinas, conjuntamente con las interleuquinas como mediadores, son las responsables de la mayoría de los efectos patógenos. Éstas últimas 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 un disturbio de las interacciones hormonales que controlan el funcionamiento normal del ovario (Battaglia y col., 2000; Williams y col., 2001).

Estrés: el rol del estrés en la patogénesis de la COD es mediado por los niveles de cortisol liberados de manera endógena que ejercen su acción inhibitoria sobre la liberación de LH. La capacidad de las corticotrofinas en la inducción de la enfermedad, ha sido demostrada experimentalmente por administración de ACTH en vacas (Peter y Liptrap, 1985; Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000; Ortega y col., 2007b) y en cerdas (Liptrap y McNally 1976). El pico preovulatorio de LH es especialmente sensible al efecto inhibitorio de la ACTH y glucocorticoides. La inhibición de la secreción de LH hipofisaria, consecuencia de la acción fisiológica de los glucocorticoides, podría ser causada por la modificación en la retroalimentación de los esteroides gonadales, dado que los corticoides reducen el efecto estimulante de los estrógenos sobre la secreción de la LH. Se cree que los péptidos opioides endógenos (producidos por la hipófisis y el cerebro) bloquean la onda preovulatoria de LH inducida por los estrógenos y la liberación hipotalámica de GnRH (Malven, 1986).

1.3.2 Etiología y patogenia

Ha sido ampliamente aceptado que los quistes foliculares se desarrollan debido a una disfunción del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Liptrap y McNally, 1976; Kesler y Garverick, 1982; Eyestone y Ax, 1984; Bosu y Peter, 1987; López-Díaz y Bosu, 1992; Woolums y Peter, 1994b; Hamilton y col., 1995; Garverick 1997; Peter, 1997; Zulu y Penny, 1998; Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000; Peter, 2004). Esta disfunción tiene una etiología multifactorial, en la que participan factores genéticos, clínicos y ambientales, tales como los descriptos anteriormente.

A la disfunción hipotálamo-hipofisaria se le suma un componente intraovárico que ocasiona la disfunción de esta glándula.

1.3.2.1 Disfunción hipotálamo-hipofisaria

La naturaleza pulsátil de la secreción de GnRH, que resulta en secreciones pulsátiles de LH, es la señal individual de mayor importancia en el control del sistema reproductivo (Thiéry y Martin, 1991). La GnRH es sintetizada por el centro tónico y cíclico del hipotálamo. La misma estimula la liberación de gonadotrofinas (LH y FSH) desde la porción anterior de la glándula hipofisaria. A su vez, tanto LH como FSH estimulan, a nivel ovárico, la síntesis por parte del folículo dominante de estradiol, el cual ejerce un efecto de retroalimentación positiva sobre el centro cíclico del hipotálamo, provocando la onda preovulatoria de LH. Sin embargo, se ha comprobado que no todos los pulsos de GnRH son seguidos por pulsos de LH, más aún, un aumento en la frecuencia de liberación de GnRH provoca una disminución en la amplitud de los pulsos de LH (Clarke y Cummins, 1985).

Se cree que un pulso inadecuado en tiempo y forma de la hormona liberadora de gonadotrofinas resultaría en una falla en la ovulación y en consecuencia, en la formación del quiste. Esto podría ocurrir por varias razones: porque no se produjo el pico preovulatorio de LH; porque esta gonadotrofina se liberó en cantidades insuficientes; o bien, la secreción de la misma se dio en un momento inadecuado de la maduración folicular (Hamilton y col., 1995; Yoshioka y col., 1996).

El rol preciso de la LH en la enfermedad aún no ha sido totalmente descripto, aunque algunos autores han sugerido que una reducción en los niveles liberados durante el pico preovulatorio de LH, podría estar asociada a este trastorno anovulatorio (Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000). Parece ser que dicho patrón aberrante de liberación de LH podría ser causado por una alteración en el mecanismo de retroalimentación positiva de los estrógenos secretados por el folículo preovulatorio, lo cual resultaría en una falla en la liberación de GnRH y por ende de su acción a nivel hipofisario. En este sentido, si la onda preovulatoria de GnRH/LH ocurre inoportunamente durante el crecimiento folicular, puede ocasionar la pérdida de sensibilidad del hipotálamo al efecto de retroalimentación positiva del estradiol, llevando de esta manera a la anovulación y consecuente formación de quistes (Gümen y col., 2002; Gümen y Wiltbank, 2002). La restitución de la sensibilidad del hipotálamo sólo es posible con una nueva exposición a progesterona, por lo que fallas ovulatorias y anestros son factores predisponentes a que exista dicha insensibilidad (Ozturk y col., 1998; Gümen y

Wiltbank, 2005). Esta falta de respuesta neuronal, parece estar presente en la mayoría de las vacas con COD, y ha sido demostrada mediante el suministro de estradiol exógeno a través del cual no fue posible inducir el pico preovulatorio de LH (Dobson y Nanda, 1992; Refsal y col, 1987; Refsal y col., 1988). La remoción del ovario quístico permitió restaurar el mecanismo de retroalimentación y la capacidad del estradiol de generar la nueva oleada gonadotrófica (De Silva y Reeves, 1988). De tal manera, dicha insensibilidad puede ser considerada una consecuencia más que una causa de COD. La misma podría deberse a cambios en la expresión de receptores hormonales (de estrógenos, progesterona y andrógenos) como proteicos (receptores de LH y de FSH) a nivel hipotálamo-hipofisario (Odore y col., 1999).

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

En resumen, una falta de sensibilidad a la retroalimentación positiva del estradiol a nivel del hipotálamo, desencadenaría la falta del pico preovulatorio de LH debido al menor contenido de GnRH en el área preóptica-supraquiasmática, y los elevados niveles de la misma en el tallo hipofisario-eminencia media desde donde se libera LH de manera tónica. Como consecuencia, los niveles basales de LH durante la fase de crecimiento folicular serían más elevados (mayor frecuencia como resultado de un mayor contenido de GnRH en la eminencia media) y al momento de la ovulación, no habría niveles suficientes de GnRH en el centro cíclico (área preóptica-supraquiasmática) para inducir el pico preovulatorio de LH desde la hipófisis, conduciendo de esta manera a la formación de quistes. Por otra parte, esos niveles basales persistentemente elevados de LH podrían actuar sobre los receptores de las células de la granulosa, estimulando el desarrollo folicular más allá del tamaño ovulatorio (Vanholder y col., 2006).

1.3.2.2 Disfunción ovárica/folicular

Muchos estudios se han llevado a cabo para caracterizar el crecimiento y la dinámica folicular, sin embargo es escaso el conocimiento que se tiene a cerca de los cambios celulares y moleculares que ocurren en el folículo ovárico antes de degenerar y llegar a ser una estructura quística anovulatoria (Wiltbank y col., 2002).

Se han descrito alteraciones en la producción de factores de crecimiento por parte de células de la granulosa (Ortega y col., 2008; Rey y col., 2010) así como también, síntesis aberrante de proteínas en la matriz extracelular (MEC) de los quistes (Salveti y col., 2004). Entre las proteínas de la MEC, la fibronectina y la vitronectina podrían estar implicadas en dichos procesos anovulatorios ya que sus niveles de síntesis están en relación con el tamaño del folículo (Perrone y col., 1995; Peter y col., 1995). Es válido considerar, sin embargo, la necesidad de llevar a cabo paralelamente este tipo de estudios e interpretación de cambios moleculares en quistes en formación, dado que aportarían información más directa sobre la dinámica del crecimiento de dichas estructuras. Los eventos post-quísticos (dinámica quiste/folículo) de COD inducida experimentalmente (Cook y col., 1990) son similares a los que ocurren en quistes espontáneos (Hamilton y col., 1995), por ello estos modelos permiten comprender la naturaleza dinámica de los mismos, las alteraciones endocrinas y el destino de ellos (Cook y col., 1990). No obstante, a pesar de haber podido abordar algunos aspectos sobre los mecanismos moleculares reguladores de su formación, aún queda gran parte de la etiología de esta enfermedad por dilucidar.

Estudios previos han demostrado que variaciones en la expresión de receptores tanto de hormonas hipotálamo-hipofisarias como de hormonas esteroides y el número de ellos, puede ser una de las causas que ocasionan la anovulación de un folículo. La importancia de ellos en el desarrollo y crecimiento folicular ha sido ampliamente demostrada así como su localización en células foliculares (Byers y col., 1997; Rosenfeld y col., 1999; Salvetti y col., 2010). Particularmente, los receptores de estrógenos y de progesterona podrían estar involucrados en los mecanismos que llevan a la anovulación. Cambios en las concentraciones de sus isoformas y su relación, en células que componen el folículo de los animales con COD, podrían causar variaciones en la acción o efectos de las hormonas sobre ellos. Un balance inapropiado de los receptores de estrógeno α y β por ejemplo, dadas las diferencias en afinidad por el 17β -

estradiol de cada uno de ellos o la capacidad de formar heterodímeros y actuar de manera diferente a nivel nuclear, puede causar modificaciones en el desarrollo folicular normal (Odore y col., 1999; Salvetti y col., 2007; Alfaro y col., 2011).

Otro de los factores que puede estar involucrado en la enfermedad quística ovárica es la alteración de la capacidad esteroidogénica de los folículos dominantes. 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). 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 intensa retroalimentación positiva, podría verse sobreestimulada 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 daría lugar a la formación del 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 de dichos estratos 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 de dicho proceso 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).

Los mecanismos de estrés mediante los cuales el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal puede afectar la función ovárica son otras de las posibles causas de la formación de quistes (Baravalle y col., 2007). Mediante cultivo de pared folicular *in vitro* se demostró recientemente que las células ováricas expresan receptores de melanocortinas, entre las que se encuentra la ACTH, hormona sintetizada en condiciones de estrés, lo que podría fundamentar un efecto directo del estrés sobre la funcionalidad ovárica (Amweg y col., 2011). Además, se sabe que los corticoides incrementan la síntesis de progesterona estimulada por la FSH, debido a la estimulación de la actividad de la enzima 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (Hsueh y Erickson, 1978; Moberg, 1991).

Se cree también, que el cortisol producido en condiciones de estrés podría ser almacenado en el líquido folicular e inducir cambios notables en la esteroidogénesis y expresión de receptores de LH a nivel de la pared folicular, que contribuyan al desarrollo de la enfermedad (Moberg, 1991).

1.4 Las *Heat Shock Proteins*: su naturaleza y función

Las proteínas de golpe térmico (HSPs, del inglés *Heat Shock Proteins*) son un tipo de chaperonas moleculares y cumplen importantes funciones tanto en condiciones normales como en situaciones de estrés celular y sistémico, confiriendo a la célula en diversas circunstancias termotolerancia y protección frente a un daño potencial. Asimismo, cumpliendo con su función de chaperonas, aseguran el correcto plegamiento de otras estructuras macromoleculares evitando la agregación y formación de proteínas no funcionales, ya sea entre subunidades como así también, entre las cadenas polipeptídicas recientemente sintetizadas (Ellis, 1987; Parsell y Lindquist, 1993).

Las HSPs han sido clasificadas en 6 familias principales, de acuerdo a su peso molecular: HSP110/105, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 y sHSP (del inglés: *small HSP*). Cada una de ellas cumple funciones en diferentes compartimientos celulares así como también pueden ser liberadas al medio extracelular en diferentes circunstancias, para interactuar con células vecinas y en algunos casos, ingresar al torrente sanguíneo (Calderwood y col., 2007).

Las funciones intracelulares en las que participan pueden agruparse en dos categorías: de plegamiento y de sostén de proteínas (Figura 7).

Sus funciones son llevadas a cabo:

- 1) durante la traducción del ARNm, asistiendo en el correcto plegamiento de la proteína y evitando la agregación de la cadena polipeptídica en formación;
- 2) favoreciendo la traslocación de proteínas a través de la membrana celular y hacia el interior de organelas;
- 3) estabilizando aquellas proteínas con estructuras terciarias inestables y
- 4) durante el estrés térmico, regulando la degradación de proteínas desnaturalizadas (Ellis, 1987; Palleros y col., 1991; Hartl y Hayer-Hartl, 2002; Bukau y col., 2006).

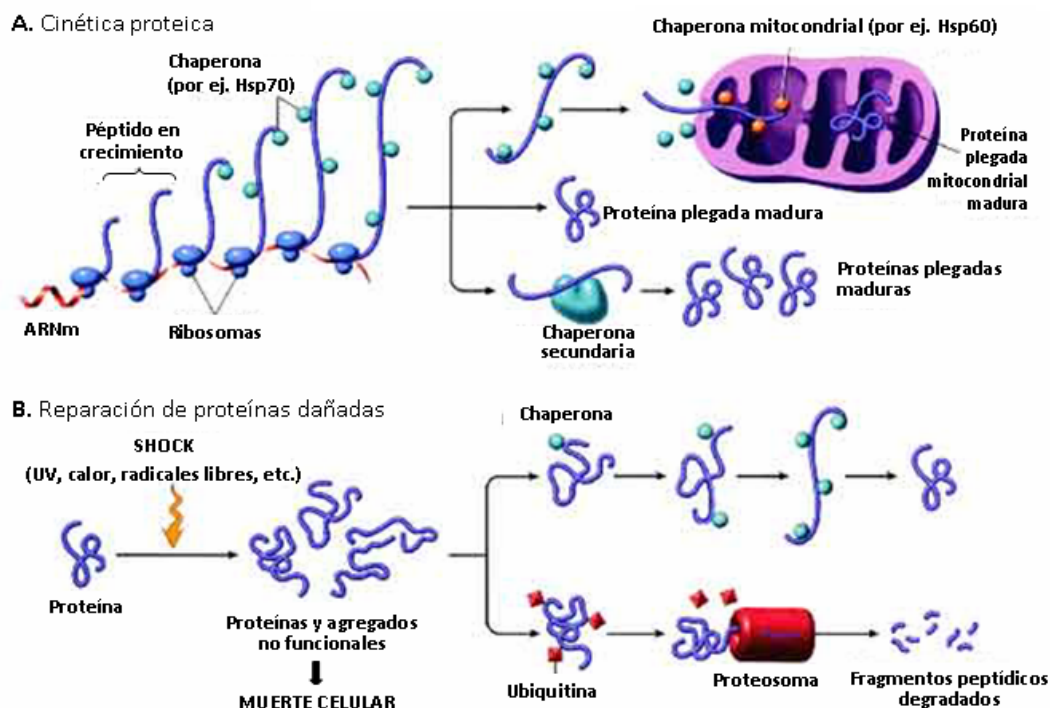


Figura 7. Participación de las Heat Shock Proteins en la síntesis proteica, transporte y estabilización de estructuras proteicas funcionales e impedimento de su degradación (http://www10.uniovi.es/anatopatodon/modulo2/tema01_alteracion/00indice.htm).

Las que actúan principalmente como sostén son las pertenecientes a las familias HSP90, HSP70 y HSP40. Las funciones de plegamiento ocurren posteriormente a las de sostén y es en donde participan las “chaperoninas” de la familia HSP60 entre las que se incluye la Hsp10 como co-chaperonina (Calderwood y col., 2006; Czarnecka y col., 2006).

Hsp105 es una de las principales proteínas de golpe térmico en mamíferos, e integra la familia de HSPs de mayor peso molecular (HSP110/105). Su actividad en mamíferos puede ser proapoptótica o antiapoptótica, dependiendo del tipo celular donde se exprese (Hatayama y col., 1997; 2001). Yuan y col. (2009) observaron que la expresión de Hsp105 temporalmente encontrada en el epitelio luminal del útero, en epitelio glandular y en células del estroma del mismo, podría ser esencial para la regulación de la implantación del embrión en ratas.

Las de la familia HSP90 desarrollan sus funciones tanto en el citosol como en el núcleo, mientras que la Grp 94 (proteína regulada por glucosa) ejerce una función análoga en el retículo endoplasmático. En humanos han sido descritas dos isoformas de Hsp90 cuya expresión está regulada de manera diferencial. La isoforma Hsp90 α es inducible, mientras que Hsp90 β se expresa de manera constitutiva (Sreedhar y col., 2004). Hsp90 es capaz de formar complejos multiméricos con otras chaperonas o factores tales como Hsp70 y receptores de esteroides (Grad y Picard., 2007; Galigniana y col., 2010). Sus funciones están relacionadas con su participación en la inmunidad innata, en enfermedades neurodegenerativas, en la reorganización de la cromatina y modificaciones epigenéticas relacionadas con el cáncer (Ruden y col., 2005).

La familia HSP70 comprende al menos 12 proteínas diferentes que comparten secuencias, pero son sintetizadas en respuesta a diferentes estímulos. Los miembros más conocidos y estudiados son 4. La proteína de 73 kDa (Hsp73 o Hsc70) es constitutivamente producida por la célula, mientras que la proteína de 72 kDa (Hsp72 o más conocida como Hsp70) es altamente inducible y su síntesis se ve aumentada en respuesta a condiciones de estrés. Se la encuentra en citosol y en núcleo. Además fue encontrada en el medio extracelular, y su función asociada a dicha localización está en relación con su capacidad de estimular una potente y duradera respuesta inmune, de la misma manera que lo hace una citoquina (Figura 8) (Li y col., 2002; Tsan y Gao., 2004; Asea, 2005). Hsp78 (o Grp78) se localiza en el retículo endoplásmico y Hsp75 (o mHsp70) es mitocondrial (Kregel, 2002).

El complejo formado por Hsp60/Hsp10 está implicado en la importación de las proteínas al interior de la mitocondria, así como en la reactivación de las proteínas desnaturalizadas, y en el impedimento de la formación de agregados termodinámicamente inestables (Bukau y Horwich, 1998; Brinker y col., 2001; Walter y Buchner, 2002). Se ha reconocido su participación tanto en vías antiapoptóticas como en proapoptóticas, dada su localización tanto citoplasmática como mitocondrial (Arya y col., 2007). Además, Hsp60 parece cumplir un rol importante en la comunicación intercelular de la respuesta inmune, al igual que otras chaperonas como Hsp70 y Hsp90 (Henderson y Pockley, 2010). La liberación de Hsp60 al medio extracelular tendría como finalidad establecer una conexión entre los tejidos y el sistema inmune del organismo (Basu y col., 2000) (Figura 8).

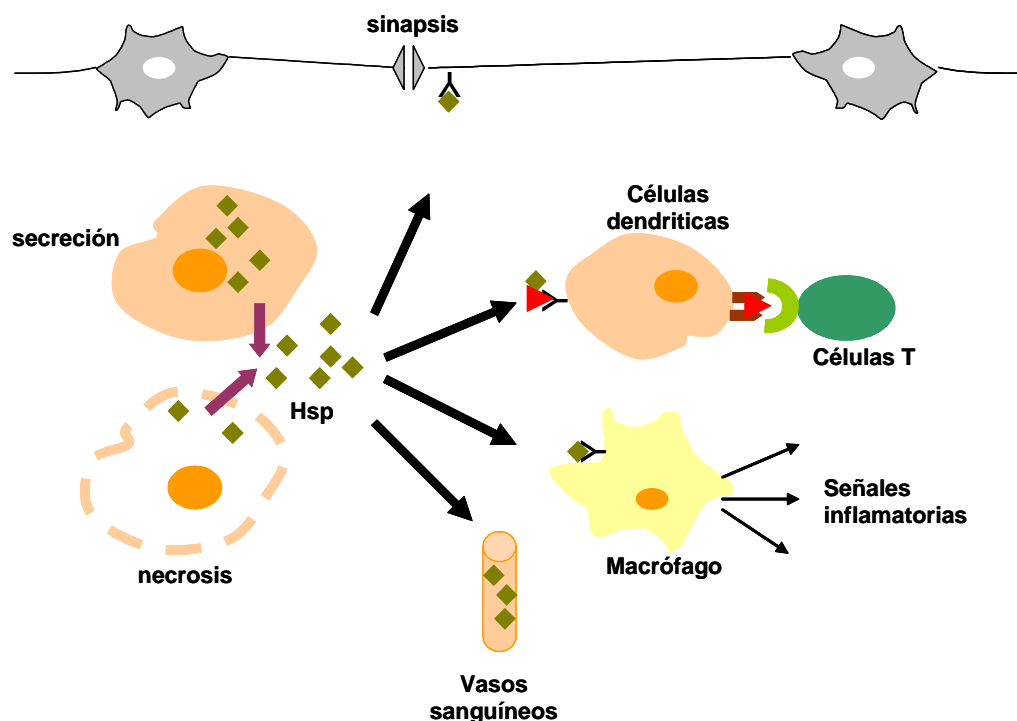


Figura 8. Esquema representativo de la participación de las HSPs como mediadoras de la señalización intercelular y su intervención en la respuesta inmune celular a través de la presentación cruzada de antígenos (adaptado de Calderwood y col., 2007).

La característica que define a las proteínas de la familia HSP40, es la presencia de un dominio J de unos 70 aminoácidos, que dirige las interacciones con la chaperona Hsp70. Hsp40 es la co-chaperona capaz de modificar la conformación de Hsp70 permitiéndole adquirir una mayor afinidad para la unión con sus proteínas “clientes”. Esa unión, como así también la liberación de sus sustratos, implican cambios conformacionales en Hsp70 que ocurren menester a la hidrólisis de ATP. La capacidad de hidrolizar ATP es conferida por Hsp40, dado que la actividad intrínseca de Hsp70 es muy débil. Las proteínas que poseen el dominio J, participan en procesos biológicos complejos, tales como el control del ciclo celular ejercido por la acción de virus; regulación de proteínas kinasas y en la exocitosis (Kelley, 1998, Gotoh y col., 2004).

Hsp27 pertenece a la familia de las sHSPs. Tiene la capacidad de regular la apoptosis a través de su interacción con componentes de la cascada involucrados en la activación de las caspasas. Es capaz de mantener el balance redox intracelular como así

también la estabilidad mitocondrial de la célula (Concannon y col, 2003). También ha sido reportada su participación y regulación en el accionar de los receptores de estrógenos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Rayner y col., 2010).

En resumen, numerosos estudios han demostrado que la mayoría de las HSPs poseen facultades citoprotectoras, están involucradas en mecanismos regulatorios y serían potenciales marcadores de la existencia de daños celulares, dando la posibilidad de emplearlas con fines diagnósticos y terapéuticos (Lindquist y Craig, 1988; Welch, 1993; Moseley, 2000; Kregel, 2002).

1.4.1 Participación de las HSPs en diversas condiciones de estrés.

Estudios recientes sugieren que las HSPs se sobreexpresan tanto a nivel del sistema nervioso central como del periférico luego del daño celular, y juegan un rol muy importante en la supervivencia neuronal. La neuroprotección ejercida por las HSPs es compleja y a muchos niveles, incluyendo efectos antiinflamatorios (Hsp32), antioxidantes y antiapoptóticos. La Hsp27, ha sido particularmente estudiada en el sistema nervioso periférico donde inhibe la apoptosis (Klass y col., 2008).

Por otro lado, frente al estrés por calor, un gran número de proteínas se desnaturalizan de manera sincronizada pudiendo formar un agregado proteico que desencadene la muerte celular. De esta manera, y dado que la desnaturalización y agregación de proteínas son fuertes disparadores de la muerte celular programada, se les adjudica a las HSPs una poderosa función antiapoptótica a este nivel, favoreciendo que aquellas proteínas defectuosas sean degradadas o estabilizadas eficientemente (Calderwood y col., 2006). Asimismo, a alguna de estas proteínas se les atribuye la capacidad de velar por la supervivencia celular a partir de la inhibición de los mecanismos de activación de caspasas, impidiendo de esta manera la apoptosis de la célula (Garrido y col., 1999; Beere y col., 2000; Mosser y col., 2000, Beere, 2004). En este sentido, Garrido y col. (2001) han demostrado que la sobreexpresión de Hsp90 en un tejido bajo condiciones de estrés, puede tener efectos distintos, dependiendo cuál fue el estímulo que llevó a dicha sobreexpresión. Por esta razón no es sorprendente encontrar que una misma proteína pueda actuar como proapoptótica o antiapoptótica, según el estímulo.

Las HSPs también están involucradas en el crecimiento y proliferación celular (Helmbrecht y col., 2000), así como en los mecanismos moleculares relacionados a la patogénesis de varias enfermedades (Yeyati y van Heyningen, 2008; Hirsh y Junger, 2008; Milioti y col., 2008; Saluja y Dudeja, 2008; Romanucci y col., 2008). Sus genes están transcripcionalmente regulados y la expresión de los mismos está asociada a estados patológicos dentro de los que se incluye, isquemia, fiebre, inflamación, infección y cáncer (Welch, 1993; Jolly y Morimoto, 2000; Garrido y col., 2001). La expresión alterada de las HSPs ha sido reportada en casi todas las clases de tumores, y a pesar de estas observaciones aún no se ha podido determinar si es causa o consecuencia de dicho estado patológico. Dado que las condiciones de estrés pueden desencadenar dos mecanismos celulares que, aunque relacionados, se contraponen; la supervivencia o la apoptosis, se propuso que el estrés y la muerte celular probablemente sean vías con múltiples pasos de regulación cruzada. El balance entre estas dos vías dependería de la naturaleza específica e intensidad del estrés, de manera tal que los niveles de expresión y el accionar de los componentes individuales de cada mecanismo determinarían el destino final de la célula (Jolly y Morimoto, 2000).

1.4.2 Rol de las *Heat Shock Proteins* (HSPs) en reproducción.

Los procesos reproductivos, para tener éxito, deben estar en armonía y sincronizados con el medio ambiente. Las condiciones desfavorables (por ejemplo, temperatura inadecuada, disminución de los nutrientes) inducen el estrés en los organismos y reprimen la reproducción a través de sustancias relacionadas con el estrés. De la misma manera, condiciones adecuadas, promueven y garantizan la eficiencia reproductiva por medio de estimuladores hormonales. Por lo tanto, es acertado asumir que los elementos relacionados al estrés podrían potencialmente oponerse e incluso prevenir los efectos hormonales y malograr el éxito reproductivo (Sirotkin y Bauer.; 2011).

Hemos mencionado al estrés como posible factor etiológico de la enfermedad quística ovárica y de hecho se ha encontrado una relación estrecha entre los mecanismos neuroendócrinos de respuesta al estrés, la actividad del sistema simpático y la activación celular de la expresión de HSPs (Blake y col., 1993). Esta expresión sería parte de la respuesta funcional a hormonas y neurotransmisores inducidos por el estrés. Existen

reportes que indican que estas proteínas pueden controlar las funciones hormonales y viceversa (Driancourt y col. 1999; Jayachandran y Miller, 2002; Bombardier y col., 2009). En este sentido, se ha encontrado que la expresión de las HSPs es alta en los órganos reproductivos de la hembra (Ciocca y col., 1996) y sus funciones principales están relacionadas con el mantenimiento de la configuración de los receptores esteroides no estimulados, ya que forman un complejo multimolecular con ellos (Bagatell y col., 2001) y modulan la unión de las hormonas al receptor (Picard y col., 1990; Pratt y col., 2004; Powell y col., 2010). En el caso particular de los receptores de estrógenos, la Hsp90 y Hsp70 forman complejos con el receptor, pero su función precisa al momento de unirse la hormona, no ha sido completamente dilucidada (Fliss y col., 2000; Bagatell y col., 2001; Pratt y Toft, 2003). Una asociación similar ha sido descrita con el receptor de andrógenos (Cardozo y col., 2003).

En el endometrio, sus funciones están relacionadas con la modulación de la respuesta a los esteroides, ya que la mayor expresión de Hsp27, Hsp60 y Hsp70 se observa inmediatamente después de la ovulación, al inicio de la fase secretoria (Bagchi y col., 1991; Ciocca y col., 1996; Shiozawa y col., 2003, 2004). Se ha encontrado una correlación importante entre la expresión de Hsp90 y la expresión de receptores de estrógenos y progesterona, mientras que sucede lo contrario con la Hsp70 (Koshiyama y col., 1995; Salvetti y col. 2009).

Existen reportes sugiriendo que los cambios endocrinos ocurridos en el parto en bovinos, debido al pasaje de la preñez a la lactancia del animal, llevan a múltiples desórdenes a nivel digestivo, metabólico, inmunológico, que se traducen en modificaciones en los niveles de Hsp70. Esto estaría indicando un vínculo entre el estrés, los parámetros inmunológicos y metabólicos y Hsp70 en esta especie, luego del parto (Mulligan y Doherty, 2008; Sordillo y col., 2009; Catalani y col., 2010).

Recientemente se ha reportado en humanos, que Hsp60 participa en el transporte intracelular del colesterol a través de las membranas mitocondriales de células sincitiotrofoblásticas, lo que deja en evidencia su implicancia en la esteroidogénesis placentaria (Olvera-Sánchez y col., 2011).

En cuanto a la participación de las HSPs en la morfogénesis de organismos en gestación, se cree que están íntimamente relacionadas con el desarrollo normal y anormal de embriones murinos (Evans y col., 2005; Brown y col., 2007). Se ha

descripto que los niveles de expresión de un grupo de HSPs presentan diferencias notables entre los diferentes estados gestacionales cuando se administra vía oral a las hembras madres, distintas dosis de ácido retinoico, un causante de alteraciones en las extremidades del individuo en gestación. Estos ensayos confirmaron la participación de miembros de las familias de HSP40, HSP60 y sHSP, en la protección contra el estrés en el desarrollo embrionario, inducido por dicho agente (Zhu y col., 2010).

En el ovario, la expresión de las HSPs es parte integral de la foliculogénesis. Los ovocitos en crecimiento y preovulatorios expresan altos niveles de Hsp60 y Hsp70 en forma constitutiva (Curci y col., 1987; Paranko y col., 1996; Maizels y col., 1998; Banerji y col., 2005). Por otra parte, la Hsp90, actúa como moduladora o inhibidora de la actividad de la enzima aromatasas en los folículos ováricos. Se ha demostrado que los folículos dominantes expresan niveles importantes de esta proteína tanto en células de la granulosa como en la teca (Driancourt y col., 1999, 2000) y ha sido detectada, aunque en bajos niveles, en el líquido folicular (Guzeloglu y col., 2001). También se ha descripto en bovinos que las HSPs protegen al ovocito de daños oxidativos (Humblot y col., 2005) y los niveles encontrados de Hsp27, Hsp60, Hsp70 y Hsp90 en células de la granulosa y teca de folículos en crecimiento normales, se diferenciaron claramente de la síntesis aberrante observada en estructuras foliculares quísticas (Velázquez y col., 2010).

OBJETIVOS

Objetivo general: Diseñar un sistema de gestión de recursos humanos que permita optimizar el uso de los recursos humanos de la empresa y mejorar el desempeño de los empleados.

Objetivos específicos:

- 1. Realizar un diagnóstico del sistema de gestión de recursos humanos actual.
- 2. Diseñar un sistema de gestión de recursos humanos que permita optimizar el uso de los recursos humanos de la empresa.
- 3. Implementar el sistema de gestión de recursos humanos diseñado.
- 4. Evaluar el impacto del sistema de gestión de recursos humanos en el desempeño de los empleados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Estudiar la expresión de Proteínas de Golpe Térmico (Heat Shock Proteins (HSPs)) en el ovario bovino en diferentes estadios foliculares, buscando dilucidar su participación en la foliculogénesis normal y en la patogenia de la enfermedad quística ovárica.

La hipótesis planteada es que, teniendo en cuenta que las HSPs participan en los mecanismos de respuesta al estrés y en los procesos reproductivos a diferentes niveles; el mantenimiento de la homeostasis celular, la respuesta hormonal y otros eventos importantes para el éxito reproductivo estarían supeditados en parte al accionar de dichas proteínas. En efecto, sería esperable encontrar una expresión diferencial y alterada en animales con enfermedad quística ovárica.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Establecer el patrón de expresión de proteínas y de ARNm de la familia de las Proteínas de Golpe Térmico (Heat Shock Proteins: HSPs) analizando su expresión en diferentes estadios foliculares en el bovino.
- 2- Identificar los tipos celulares de los que integran el folículo ovárico sufren modificaciones en la expresión de estas proteínas.
- 3- Relacionar la expresión de HSPs con otras variables (receptores hormonales, proliferación, apoptosis), a fin de analizar la interrelación de las mismas.
- 4- Determinar similitudes y diferencias entre los hallazgos efectuados en el modelo experimental y aquellos efectuados en ovarios con quistes espontáneos obtenidos en frigorífico.

5- Describir la expresión de ARNm de las HSPs en las células que integran la pared folicular de quistes espontáneos, a partir de muestras de aspiración folicular obtenidas de animales en producción de establecimientos pecuarios.

MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Procedimientos llevados a cabo con animales.

3.1.1 Modelo experimental.

Han sido descriptos una variedad de protocolos y tratamientos para lograr la inducción de quistes. Entre ellos se pueden mencionar, aquellos basados en la administración de estrógenos (Wiltbank, 1966; Nadaraja y Hansel, 1976; Carrie're y col., 1995); combinaciones de progesterona/estradiol (Cook y col., 1990; Hamilton y col., 1995); anticuerpos contra LH bovina, (Nadaraja y Hansel, 1976); testosterona (Fathala y col., 1978) y ACTH exógena (Liptrap y Mc Nally, 1976; Ribadu y col., 2000; Dobson y col., 2000; Ortega y col., 2007b). Dichos protocolos fueron aplicados durante el diestro tardío e incluso también en el proestro, resultando en alteraciones hormonales durante la fase folicular.

En efecto, está demostrado que la ACTH causa una supresión de los valores basales de LH (Stoebel y Moberg, 1982; Li y Wagner, 1983; Ribadu, 1993; 2000) así como también una menor frecuencia de los pulsos de la misma (Dobson y Smith, 1995). A su vez, Ribadu y col. (2000), demostraron que la administración de ACTH modificó notablemente la dinámica folicular en bovinos, llevando al desarrollo de quistes.

Dada la eficiencia del modelo, demostrada en reportes previos, el mismo fue seleccionado para emplear en el presente trabajo y lograr la inducción de los quistes (Sirois y Fortune, 1988; Kawate y col., 1996; Ortega y col., 2007b).

3.1.2 Animales.

Los ensayos con animales experimentales realizados en este trabajo, se ajustaron a las normas vigentes sobre el tema (Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. Federation of Animal Science Societies (FASS), 1ª Ed, 1999, USA). 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 emplearon 10 vaquillonas de la raza Holando Argentino puros por cruza, con un peso promedio de 400 kg., de entre 18 y 24 meses de edad. Los animales fueron examinados antes del comienzo de la experiencia, por tacto rectal y ultrasonografía para comprobar la normalidad en su tracto reproductor y la regularidad de sus ciclos estrales.

Todos fueron alojadas en corrales descubiertos; y su alimentación estuvo basada en alimento balanceado comercial y heno de alfalfa con disponibilidad de agua *ad libitum*.

Se realizó la sincronización del ciclo estral mediante el protocolo Ovsynch (Gümen y col., 2003). 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 y luego cada 12 horas (Figura 9). La primera detección de comportamiento de estro fue designada como día cero del ciclo y se confirmó por ultrasonografía (Sirois y Fortune, 1988). Durante este período de sincronización, los animales no recibieron ningún otro tratamiento. Las experiencias fueron realizadas en primavera para evitar los períodos críticos de estrés ambiental.

Se trabajó además con un grupo de aproximadamente 30 animales que se encontraban en establecimientos pecuarios de la zona con diagnóstico de COD de desarrollo espontáneo. Se realizó una anamnesis completa de los animales, recabando además datos sobre la alimentación que recibieron, condiciones de rodeo, medidas de manejo, enfermedades y/o tratamientos previos, para un posterior análisis epidemiológico de otro equipo de trabajo.

3.1.2.1 Grupos experimentales:

Los animales experimentales destinados a la inducción de la enfermedad así como los controles fueron distribuidos en 2 grupos que fueron alojados en corrales separados.

Grupo I: luego de la sincronización de celo, 6 vaquillonas se trataron con 100 UI de corticotrofina (ACTH) (1mg/ml de Tetracosactido [corticotropina], Synacthen depot, laboratorio Novartis), cada 12 horas por un periodo de 7 días seguidos, contabilizados a partir del día 15 del ciclo estral (Figura 9). El comienzo del tratamiento (día 15 del ciclo estral normal) 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 (Liptrap y McNally, 1976; Dobson y col, 2000; Ortega y col., 2007b).

Grupo II: un grupo de 4 hembras se mantuvieron en condiciones ambientales normales, y sin tratamiento; como grupo control.

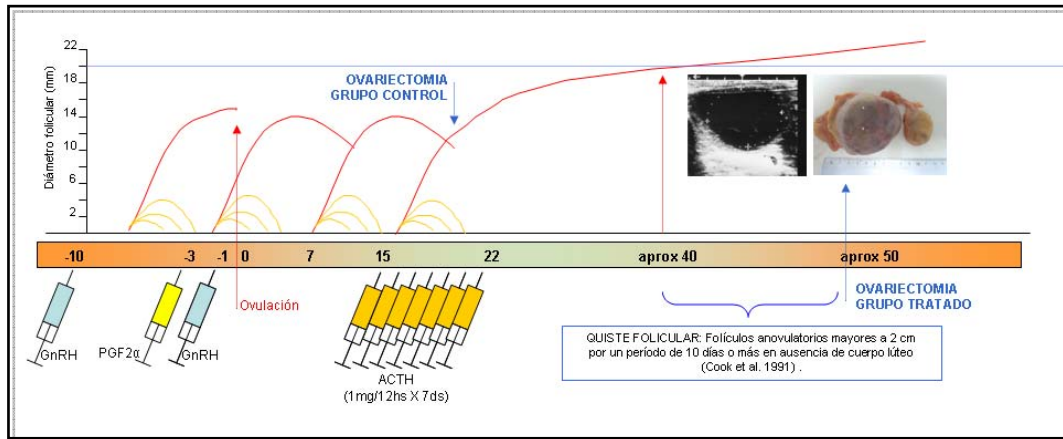


Figura 9. Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes ováricos foliculares mediante administración de ACTH.

3.1.2.2 Ultrasonografía

Se efectuaron monitoreos diarios mediante tacto rectal y ultrasonografía a los animales de los 2 grupos experimentales (I y II) con el fin de lograr el seguimiento de los cambios ocurridos durante el ciclo estral. Dichos exámenes se llevaron a cabo diariamente hasta la ovariectomía.

En cuanto a la enfermedad quística espontánea detectada en los animales de campo, la misma fue diagnosticada por profesionales, quienes realizaron la evaluación de los signos e historia clínica y procedieron a la toma de muestras de sangre y líquido folicular previa evaluación mediante ultrasonografía.

Se utilizó un equipo de ultrasonografía Chisson 8300vet Digital (China), equipado con sonda transductora transrectal en doble frecuencia de onda (5,0-7,5 Mhz.). El seguimiento se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Sirois y Fortune (1988) y las imágenes fueron almacenadas para efectuar las mediciones de las estructuras foliculares ováricas.

Se consideraron como parámetros normales: un diámetro medio de los folículos ovulatorios 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.

Aquellos folículos con un diámetro mayor a 20 mm y que persistieron en el tiempo por 10 días o más, sin que se produzca la ovulación o la formación de un cuerpo lúteo (Silvia y col., 2002; Bartolomé y col., 2005) fueron considerados quísticos. El primer día de formación de dicha estructura quística fue el día en que el folículo alcanzó 20 mm o más.

3.1.3 Obtención de las muestras

Para el caso de los animales bajo protocolo de inducción (Grupo I), una vez detectada la condición de COD, se procedió a la obtención de los ovarios mediante ovariectomía. Al grupo de animales control del modelo experimental (Grupo II) se le efectuó la ovariectomía en la etapa del proestro. El abordaje se realizó por el flanco izquierdo, el cual se preparó quirúrgicamente. Se realizó anestesia local infiltrativa y anestesia epidural, con clorhidrato de lidocaína al 2% (Anestésico 2%, Rudavet®) para proceder luego 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, fueron extraídos ligando los vasos sanguíneos que lo irrigan, y se procedió luego a la sutura de todos los planos de acuerdo a la técnica quirúrgica (Garnero y Perusia, 2002).

En los casos de enfermedad quística espontánea diagnosticada en animales de producción en establecimientos pecuarios de la zona, se procedió a la obtención del líquido folicular de los quistes, por aspiración guiada por ecografía, montando el transductor microconvexo en una sonda transvaginal para aspiración folicular (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. Para la aspiración se empleó una bomba de vacío a una presión de aspiración de 150 mmHg (Scherthaner y col., 1999; Seneda y col., 2003). Una vez montado el dispositivo, fue introducido vía vaginal hasta contactar con el fondo de la misma y el quiste folicular fue localizado por tacto rectal. El ovario fue acercado y fijado al transductor de la sonda, y una vez visualizado 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 toma de 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 temperatura de refrigeración (4-6°C) y se trasladó al laboratorio.

En playa de faena, se procedió a la recolección de ovarios bovinos con alteraciones macroscópicas visibles y compatibles con la descripción de quistes foliculares (Bartolomé y col., 2005) (Figura 10). Antes de la toma de muestras se corroboró la ausencia de preñez. Se recolectaron también ovarios normales (sin alteraciones macroscópicas visibles).



Figura 10. Ovarios provenientes de playa de faena con estructura quística de diámetro superior a 30 mm en uno de ellos.

En resumen, fueron 4 los tipos de muestra que se tomaron:

a) Muestras de pared folicular (teca y granulosa) de quistes y de folículos antrales de ovarios normales, obtenidos en frigorífico incluyendo: folículos pequeños menores a 5 mm; folículos medianos entre 6 y 10 mm de diámetro; y folículos grandes mayores a 10 mm (n=10 en todos los casos) (Parrott y Skinner, 1998). Todas estas muestras fueron conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento (extracción de proteínas para la técnica de Western Blot y extracción de ARN total a partir de la teca).

b) Muestras de pared folicular de ovarios normales provenientes de frigorífico (n=10) y de ovarios quísticos (n=10) se conservaron en formol al 10% para realizar el procesamiento histológico de rutina para la técnica de inmunohistoquímica.

c) Muestras de pared folicular de ovarios obtenidos por ovariectomía (del modelo experimental) se fijaron en formol bufferado al 10% y se procesaron siguiendo protocolos de rutina para su inclusión en parafina.

d) Muestras de líquido folicular a partir de las cuales se procedió a la obtención de células y extracción de ARN total, como se detalla más adelante. Éstas fueron obtenidas por aspiración folicular de quistes diagnosticados en animales de establecimientos pecuarios y de folículos de ovarios provenientes de frigorífico. El líquido folicular recuperado luego de la separación de las células fue conservado a -20°C y destinado a mediciones hormonales.

De los animales sometidos al protocolo experimental (grupos I y II) también se tomaron muestras de sangre 2 veces al día para las determinaciones hormonales. Esto permitió, en un trabajo de investigación anterior, corroborar el funcionamiento del modelo experimental y las modificaciones endocrinas existentes durante el desarrollo del mismo. De la misma manera, fueron evaluados en trabajos previos los perfiles hormonales en líquido folicular de las muestras obtenidas en frigorífico, identificando los quistes estrógeno-activos que permitieran su utilización para el estudio de la COD (Salveti, 2010, Velázquez y col., 2010).

Además se tomaron muestras de sangre de los animales con diagnóstico de COD espontánea en el momento de la aspiración del líquido folicular en los establecimientos pecuarios, para ser utilizados en estudios epidemiológicos posteriores.

3.2 Detección y cuantificación de las proteínas de golpe térmico.

3.2.1 Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas.

Las muestras de tejido obtenidas de animales experimentales así como las provenientes de material de frigorífico fueron fijadas con formol tamponado y posteriormente lavadas en buffer fosfato salino (PBS). A continuación, las mismas fueron procesadas siguiendo protocolos histológicos de rutina para su inclusión en parafina (Ortega y col., 2004).

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

3.2.2 Inmunohistoquímica

Mediante esta técnica se logró la identificación *in situ* de las proteínas Hsp27, Hsp60, Hsp70 y Hsp90 en tejido ovárico proveniente de material de frigorífico y de ovarios de animales del modelo experimental, utilizando anticuerpos específicos disponibles comercialmente y detallados en la Tabla 3.

Tabla 3. Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.

Anticuerpos	Clon	Proveedor comercial	Dilución
<i>Primarios</i>			
Hsp27	Policlonal	Abcam, Cambridge, UK (ab12351)	1: 600
Hsp60	Policlonal	Abcam, Cambridge, UK (ab31115)	1: 400
Hsp70	Clon BRM22	Biogenex, San Ramon, CA, USA	1: 200
Hsp90	Clon AC88	Abcam, Cambridge, UK (ab13492).	1: 400
<i>Secundarios</i>			
IgG anti-rabbit Biotinilado	Policlonal	Zymed, San Francisco, CA, USA (8165-40)	1:100
IgG anti-mouse Biotinilado	Policlonal	LETH	1:50

Las inmunodetecciones se realizaron sobre cortes de 4 μm de espesor, siguiendo el protocolo descrito previamente por Ortega y col. (2004), según se detalla a continuación:

- 1- Desparafinización en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 minutos cada uno.
- 2- Hidratación en una serie de alcoholes de graduación decreciente, a partir de alcohol etílico absoluto (dos pasajes de 3 minutos), alcohol etílico 96° (dos pasajes de 3 minutos) y finalmente alcohol etílico 70° (un pasaje de 3 minutos).
- 3- Hidratación en PBS pH 7,2 durante 5 minutos
- 4- Tratamiento de recuperación antigénica. Se realizó en un horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 1200 W). Como solución de recuperación se usó Buffer Citrato 0,01 M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en un Coplin sumergido en un recipiente con agua, y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación: 3 minutos a 100% de potencia, 12 minutos al 40% y 20 minutos dentro del microondas apagado.
- 5- Bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa, sumergiendo las muestras durante 10 minutos en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno 30 volúmenes en metanol absoluto, agregando nuevamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno a los 10 minutos.
- 6- Dos lavados en PBS durante 5 minutos.

- 7- Bloqueo de los sitios de unión no-específicos incubando 20 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda con una solución de suero normal de cabra al 5%.
- 8- Incubación con anticuerpo primario: se usó el anticuerpo de interés, según la proteína a detectar (tabla 3) en la dilución adecuada durante 16 horas a 4°C (toda la noche en heladera). Para los controles de especificidad se sustituyó el anticuerpo primario por suero normal de cabra.
- 9- Después de la incubación con el anticuerpo primario la cámara se retiró de la heladera y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos
- 10- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- 11- Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado preabsorbido (monoclonal o policlonal, según el caso) en la dilución apropiada, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 12- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- 13- Incubación con complejo streptavidina-peroxidasa lista para usar, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 14- Dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- 15- Revelado de la reacción con diaminobencidina (DAB), utilizando la solución comercial de Dako. Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y de ese modo estandarizarlo.
- 16- Lavados con agua destilada, 2 de 5 minutos cada uno. Luego se realizó la coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur), deshidratación y montaje con Bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur) y cubreobjetos apropiados.

En aquellos ensayos donde se empleó anti-Hsp27 se realizó una modificación a la técnica de rutina, omitiendo la recuperación antigénica.

La inmunomarcación fue visualizada en citoplasma para Hsp27 y Hsp60, y en los compartimentos nucleares y citoplasmáticos para el caso de Hsp70 y Hsp90. La marcación obtenida en cada caso, se cuantificó en las capas de células de la granulosa y de la teca interna. No se estudió la inmunomarcación en teca externa, porque las proteínas no se vieron expresadas en dichos estratos de células.

Se digitalizaron imágenes de cada una de las capas de la pared folicular de folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos para el caso de los ovarios obtenidos en playa de faena. En el caso de los grupos experimentales (grupo I y II), se estudiaron folículos primarios, secundarios, terciarios y quísticos para su posterior comparación.

3.2.3 Procesamiento de las muestras para la técnica de Western Blot (WB)


Se tomaron fracciones de pared folicular de aproximadamente 60 mg de cada categoría de folículos (antrales pequeños, grandes y quísticos, de ovarios obtenidos en playa de faena) y fueron colocadas en buffer RIPA en presencia de inhibidores de proteasas. Esta mezcla fue homogeneizada con un homogeneizador de mano UltraTurrax[®] T25 Basic (IKA WERKE GMBH & CO. KG, Staufen, Germany). El sobrenadante obtenido luego de la centrifugación a 14.000g durante 20 minutos a 4°C fue separado y se cuantificó su contenido proteico mediante método fluorimétrico (Qubit[™], Invitrogen, CA, USA) según las indicaciones del fabricante.

Dichas muestras fueron posteriormente utilizadas para las electroforesis en geles de poliacrilamida, inmunodetección y cuantificación de HSPs por WB.

3.2.4 Western Blot.

Se realizaron electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida, 29:1) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). El tamaño del poro para el gel de resolución se correspondió con una concentración de acrilamida del 12%. Se utilizaron homogeneizados de pared folicular de folículos antrales pequeños, grandes y quísticos. Se prepararon las muestras diluyendo 1:2 con buffer de muestra en condiciones reductoras para SDS-PAGE, y posteriormente se incubaron en baño termostático a 95°C por 5 minutos. Se utilizó una cuba vertical y el buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1 % de SDS, pH 8,3. Según los valores obtenidos de la cuantificación por fluorimetría, se calcularon los volúmenes a sembrar adecuados para 60 µg de proteínas y se realizó la electroforesis durante 45 minutos a 25 mA para el gel de apilamiento, y se continuó a 50 mA durante 90 minutos hasta la visualización del frente de corrida en el borde inferior del gel de resolución. Los marcadores de peso molecular (PM) que se utilizaron se detallan a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Marcadores de PM para SDS-PAGE, amplio espectro (Kaleidoscope Prestained Standards 161-0324. Bio-Rad).

	Proteína	Peso molecular (kDa)
	Miosina	195
	b-galactosidasa	131
	Albúmina sérica	85
	Anhidrasa carbónica	40
	Inhibidor de tripsina	31,53
	Lisozima	17,25
	Aprotinina	6,78

Para la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de las proteínas separadas en el gel, se empleó la solución de transferencia tamponada Towbin modificada, compuesta por Tris-Glicina y 20 % de metanol. Dicha transferencia se realizó en frío, a 100V durante 2 horas y 30 minutos, condiciones utilizadas para todos los casos. Al término de este periodo se coloreó la membrana con el colorante Rojo Ponceau para ver la efectividad de la transferencia. Una vez verificada, se procedió a la inmunodetección de las proteínas detalladas en la Tabla 5.

Para el caso de Hsp27 únicamente, se utilizó la dilución 1:1500 tanto para el anticuerpo primario como del secundario conjugado a peroxidasa, dada la necesidad de reducir la señal inespecífica del primero.

Todos los ensayos de inmunodetección de Hsp sobre las membranas obtenidas, estuvieron acompañados de la detección de la proteína de expresión constitutiva β -actina, con el fin de normalizar los valores y poder comparar entre sí las diferentes categorías foliculares (Liao y col., 2000). Para ello, fue necesario cortar la membrana y detectar por separado cada Hsp de interés y los correspondientes niveles de β -actina en cada caso.

Tabla 5. Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de Western Blot.

Anticuerpos	Clon	Proveedor comercial	Dilución
<i>Primarios</i>			
Hsp25	Policlonal	Abcam, Cambridge, UK (ab12351)	1:1500
Hsp60	Policlonal	Abcam, Cambridge, UK (ab31115)	1:500
Hsp70	Clon BRM22	Biogenex, San Ramon, CA, USA	1:500
Hsp90	Clon AC88	Abcam, Cambridge, UK (ab13492).	1:500
Actina	JLA20	Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de Iowa, Iowa City, IA 52242	1:100
<i>Secundarios</i>			
IgG anti-rabbit peroxidasa	Policlonal	LETH	1:500 ó 1:1500
IgG anti-mouse peroxidasa	Policlonal	LETH	1:100

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

1. Enjuagar la membrana de nitrocelulosa con agua destilada y luego con buffer tris salino-Tween (TBS-T) hasta la desaparición del colorante Rojo Ponceau.
2. Bloquear los sitios de unión inespecíficos con TBS-T leche 5 %, 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.
3. Lavados a temperatura ambiente con TBS-T
 - Dos lavados rápidos
 - Un lavado de 15 minutos
 - Dos lavados de 5 minutos
4. Incubar con el anticuerpo primario durante toda la noche en heladera. Para la dilución del anticuerpo primario se utilizó buffer de bloqueo y se realizó mediante la colocación del anticuerpo que cubra la membrana y un folio o nylon sobre la misma para que distribuya el anticuerpo por capilaridad.
5. Lavados a temperatura ambiente con TBS-T
 - Dos lavados rápidos
 - Un lavado de 15 minutos
 - Dos lavados de 5 minutos
6. Incubar con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Para la dilución se utiliza buffer de bloqueo y se procede como en el paso 4.
7. Lavados a temperatura ambiente con TBS-T.
 - Dos lavados rápidos
 - Un lavado de 15 minutos
 - Cuatro lavados de 5 minutos
8. Preparar el reactivo quimioluminiscente (Amersham), colocar la membrana en un recipiente con el reactivo e incubar 5 minutos.

9. Escurrir la membrana y colocarla entre dos hojas de papel celofán.
10. Revelar la membrana en cuarto oscuro con los reactivos de revelado y fijado Kodak; y placas radiográficas Amersham.
11. Lavado con agua destilada.
12. Secado de la placa a temperatura ambiente.

3.3 Obtención y cuantificación de ARNm correspondientes a HSPs

3.3.1 Extracción de ARN total.

Para la obtención del ARN total a partir de tejido folicular se empleó el reactivo Trizol LS (Invitrogen) y se procedió según las indicaciones del fabricante. Resumidamente: se adicionaron 750µl del reactivo a muestras de teca de folículos de aproximadamente 60 mg (habiendo eliminado células de la granulosa por raspado de la pared folicular y lavado en agua DEPC) y con un homogenizador de mano Ultra Turrax[®] T25 Basic se homogeneizó durante 1-2 minutos hasta lograr la dispersión de la muestra. Esta suspensión fue incubada durante 5 minutos a 4 °C y posteriormente se le adicionó 200µl de cloroformo, se agitó vigorosamente para favorecer el contacto de las fases con la muestra y se incubó a continuación durante 15 minutos más en heladera (4° C). Transcurrido el tiempo se centrifugó a 12000g durante 20 minutos para permitir la diferenciación de las fases. Se recuperó la fase acuosa superior y se adicionó igual volumen de isopropanol, incubando 1h a -20 °C para favorecer la precipitación del ácido nucleico, y se llevó una nueva centrifugación a 12000g durante 20 minutos. El precipitado, correspondiente al ARN total, fue lavado con etanol 75% y finalmente resuspendido en agua DEPC precalentada a 60°C libre de ARNasa.

Previamente a la transcripción reversa, se realizó el tratamiento con desoxirribonucleasa I (DNase I, Amplification Grade, Invitrogen) del ARN total extraído, con el fin de eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico del mismo. Seguidamente se procedió a la inactivación de la enzima mediante el agregado de EDTA 25mM incubando a 65 °C durante 10 minutos. Finalmente se determinó la integridad y pureza del ARN total a través de un método fluoroscópico (Qubit[™], Invitrogen).

La obtención de células a partir de líquido folicular (proveniente tanto de muestras de frigorífico como de quistes diagnosticados en animales en producción) fue llevada a cabo centrifugando el mismo a 1000g durante 5 minutos. El sobrenadante fue separado y almacenado como líquido folicular a -20 °C y el precipitado celular obtenido

correspondiente a las células, fue procesado de igual manera que las muestras de tejido, hasta la obtención del ARN total.

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

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

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

3.3.3 Diseño de cebadores específicos para cada HSP y otros genes.

A partir de las secuencias de ADNc obtenidas de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.htm>) fueron diseñados los cebadores específicos para las secuencias correspondientes a Hsp10, Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90α y Hsp90β. En los casos que fueron posibles, se consideró que el producto amplificado con cada par de cebadores, se corresponda al ensamble de dos o más intrones del gen de interés. Para el diseño y posterior verificación de su especificidad, se utilizó la aplicación PrimerSelect del programa LASERGENE (DNASar, WI, USA). Todos los oligonucleótidos utilizados fueron provistos por Invitrogen.

Por otro lado, se diseñaron cebadores para amplificar las secuencias codificantes de las enzimas citocromo P450 aromatasa (*CyP19a1*, específica de células de la granulosa) y citocromo P450 17α-hidroxilasa/17,20-liasa (*CyP17a1*, específica de células de la teca) siguiendo el mismo procedimiento anteriormente detallado. Las

reacciones de amplificación con estos cebadores permitieron seleccionar las muestras sin contaminación cruzada entre los estratos foliculares. A su vez, se emplearon cebadores específicos para amplificar el gen de expresión constitutiva correspondiente a la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (GAPDH) con el objeto de normalizar los niveles de expresión en relación al mismo.

En la Tabla 6 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos empleados, sus temperaturas de hibridación, los tamaños de los fragmentos amplificados, y el número de acceso a GenBank de la secuencia empleada como molde para su diseño.

Tabla 6. Cebadores sentido y antisentido específicos para cada ADNc bovino y condiciones de la PCR.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Nº Acceso en GenBank.	Tamaño de fragmento (pb)	Temperatura hibridación (C°)	Ciclos
<i>HSP10</i>					
Sentido	TGGCAGGACAGGCATTTA	NM 174346.2	434 pb	52	31
Antisentido	TCATTAGCTTGGATATCGTTAGTT				
<i>HSP27</i>					
Sentido	GGCTGCCCGAGGAGTGGT	NM 001025569	434 pb	62,5	29
Antisentido	CTGGAAGGTGACGGGAATGGTGA				
<i>HSP40</i>					
Sentido	CGAGGTACTGGAATGCAAATAAGA	BT021066.1	420 pb	54,6	32
Antisentido	TTGACCTGGATGAGAAGTGATGAC				
<i>HSP60</i>					
Sentido	GATGCTCTTAA TGCCACACGA	XM 001249790	406 pb	53,5	31
Antisentido	TTCCAGGATCCTTCTCTCTTTAG				
<i>HSP70</i>					
Sentido	ATCAAGCGCAACTCCACCATCC	XM583951	445 pb	62	31
Antisentido	TCTTGCCCTTCAGCCCCATCCT				
<i>HSP90a</i>					
Sentido	AAGAAAGTTGAAAAGGTGGTTGTG	AB072368	382 pb	56,3	29
Antisentido	TGTCATCAGCAGTGGGGTCAT				
<i>HSP90b</i>					
Sentido	GCGGGGCTTTGAGGTGGTGTA	NM 001079637	534 pb	60,4	30
Antisentido	ATGCGGTAGATGCGGTTGAGTG				
<i>CYP17a1</i>					
Sentido	GGAGGCGACCATCAGAGAAGTGC	NM174304	319 pb	60,8	35
Antisentido	CAGCCGGGACATGAAGAGGAAAGAG				
<i>CYP19a1</i>					
Sentido	TAAAACAAAGCGCCAATCTCTACG	BTCYP19	341 pb	55,4	35
Antisentido	GGAACCTGCAGTGGGAAATGA				
<i>GAPDH</i>					
Sentido	CACCCCTCAAGATTGTCAGCA	BC102589	103 pb	52	31
Antisentido	GGTCATAAGTCCCTCCACGA				

3.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

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

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l conteniendo 10 a 30 ng de ADNc (previamente cuantificado por el método fluorimétrico), cebador sentido (20 μ M), cebador antisentido (20 μ M), 2,5 μ l de buffer Taq 10X (50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8,4), 1,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP; y 2U Taq polymerase (5 U/ μ l) (todos los reactivos provistos por Invitrogen) usando un termociclador Techne (TC-3000G, Techne Inc., NJ, USA).

El programa utilizado incluyó un tiempo inicial a 94 °C (3 minutos) seguido de 30 a 35 ciclos (según la optimización lograda para cada gen de interés) de 45 segundos a 94 °C para la desnaturalización del ADN, 30 segundos a la temperatura de hibridación adecuada para cada par de iniciadores (Table 6) y 1 minuto 30 segundos a 72 °C para la extensión a partir de los cebadores. Un último paso a 72 °C durante 10 minutos fue necesario para la extensión final de todos los productos amplificados.

Se realizaron conjuntamente en cada ensayo, controles negativos, de reactivos y de muestra, omitiendo en el primer caso el ADNc como templado (reemplazándolo por agua bidestilada estéril) y en el segundo caso, utilizando el ARN purificado en su reemplazo.

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

Las bandas obtenidas se visualizaron en el gel bajo luz UV de un Transiluminador (Labnet, Edison, Estados Unidos) y se tomaron fotos de dichas imágenes usando una cámara digital (Kodak EasyShare, Rochester, New York, USA).

Las amplificaciones de *CyP19a1* a partir de ADNc obtenidos de células de la teca y de *CyP17a1* a partir de muestras de la granulosa provenientes de ovarios obtenidos en frigorífico, indicaron contaminación cruzada entre estos estratos foliculares por lo que dichas muestras debieron ser descartadas.

Para el caso de muestras obtenidas por aspiración folicular de quistes de animales en producción (COD espontánea) se consideraron para el análisis de las variables en estudio, tanto los ADNc generados que evidenciaron la presencia de ambas poblaciones celulares (teca y granulosa), como aquellos en los que se identificó sólo una de las enzimas (*CyP17a1* ó *CyP19a1*).

Las muestras cuyos niveles de ARNm correspondientes al gen normalizador (*GAPDH*) fueron similares, permitieron el consiguiente estudio y cuantificación relativa de la expresión de las HSPs.

3.3.5 Secuenciación Nucleotídica

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

3.4 Análisis digital de imágenes.

Las imágenes de los preparados histológicos fueron digitalizadas mediante una cámara color de video SONY CCD-IRIS conectada a una PC de escritorio montada sobre un microscopio óptico convencional (Olympus BH2, Olympus Co., Japan). La resolución de las imágenes fue establecida en 1200 x 1600 píxeles. La evaluación de las mismas fue realizada con el analizador digital de imágenes Image Pro-Plus 3.0. El área inmunohistoquímicamente marcada se calculó a través de la segmentación de colores seleccionando los objetos con reacción marrón moderado/intenso (dada por la reactividad del cromógeno utilizado) como rango positivo. Dicha coloración fue elegida con una sensibilidad de 4 (máximo 5). Posteriormente fue aplicada una máscara para la separación permanente de los colores y se realizó un histograma para determinar el

porcentaje del área marcada sobre el área total evaluada, tal como fue descrito en trabajos previos (Wang y col., 2000; Salvetti y col., 2004; Ortega y col., 2007a).

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

Las imágenes digitalizadas de los geles de agarosa fueron analizadas con el programa Image Pro Plus 3.0 (Media Cybernetics, Maryland, Estados Unidos). Los niveles de ARN mensajeros específicos de cada Hsp se expresaron como un promedio de las señales obtenidas en corridas electroforéticas realizadas por duplicado en todos los casos. Se calculó la relación entre DOI de las bandas de los diferentes ARNm para cada Hsp y el amplificado correspondiente de *GAPDH*.

3.5 Evaluación estadística

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 15.0.1 para Windows. Se realizó un análisis de la varianza de los datos aplicando pruebas paramétricas para varios grupos (ANOVA), y como análisis a posteriori se aplicó Duncan. El nivel de significancia utilizado para ANOVA fue $p < 0,05$. En algunos casos, como análisis posterior del ANOVA se aplicó Dunnett, tomando los quistes como grupo de referencia para la comparación.

Los valores se expresaron como el promedio \pm el desvío estándar (DE).

RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1 Inducción de la enfermedad quística ovárica en bovinos.

El modelo utilizado fue probado en un trabajo previo donde se comprobó el avance normal de la foliculogénesis en ovarios de animales controles y el desarrollo de estructuras quísticas con permanencia de más de 10 días en el grupo de animales con la enfermedad inducida (Salveti, 2010).

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

4.2 Análisis de la expresión proteica de HSPs mediante inmunohistoquímica.

4.2.1 Expresión de HSPs en estructuras foliculares de ovarios obtenidos en playa de faena.

La detección por inmunohistoquímica de las diferentes HSPs fue llevada a cabo conjuntamente con controles positivos y negativos sobre preparados de tejido ovárico provenientes de muestras obtenidas en frigorífico. Mediante estos ensayos se evaluó la expresión de dichas proteínas a lo largo de los distintos estadios del desarrollo folicular ovárico y en estructuras quísticas de desarrollo espontáneo.

4.2.1.1 Hsp27

La inmunomarcación citoplasmática de Hsp27 fue significativamente mayor en capas de la granulosa de quistes respecto a la observada en el resto de las categorías foliculares; mientras que folículos atrésicos mostraron los menores niveles de expresión de esta proteína ($p < 0,05$; Figuras 11, 15 y 16). Con respecto a la marcación en teca, no hubo diferencias significativas entre lo hallado en folículos secundarios, terciarios y quísticos, aunque, tal como ocurrió en células de la granulosa, fue significativamente menor el área inmunohistoquímicamente marcada de folículos atrésicos ($p < 0,05$; Figuras 12 – 14 y 16).

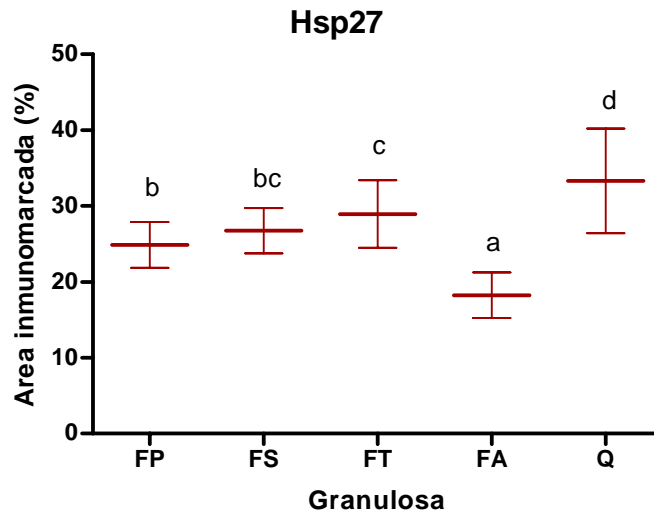


Figura 11. Área inmunomarcada para la proteína Hsp27 en la granulosa de varios tipos foliculares (FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; promedio \pm DE).

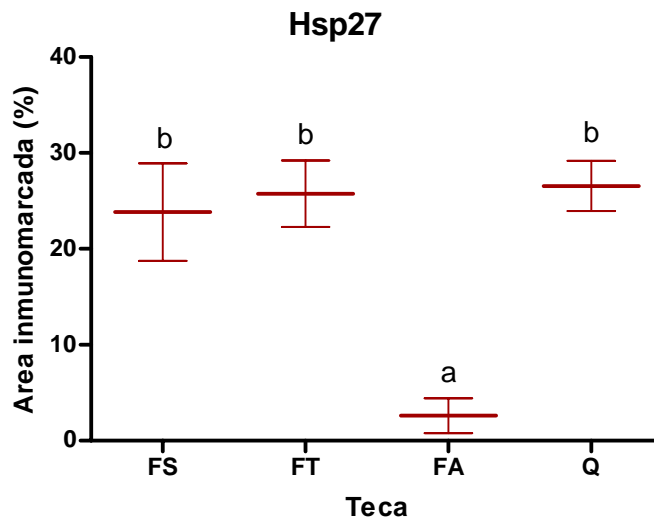


Figura 12. Área inmunomarcada para la proteína Hsp27 en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; promedio \pm DE).

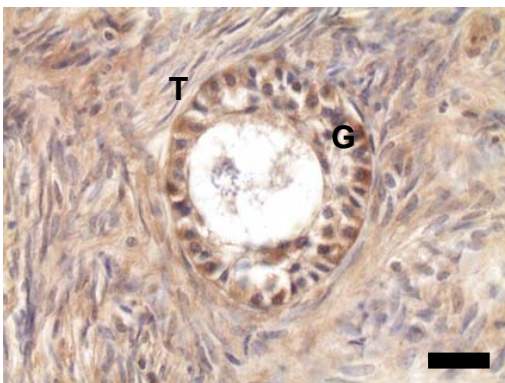


Figura 13. Inmunomarcación de la pared de un folículo secundario con anti-Hsp27. Barra = 25 μ m.

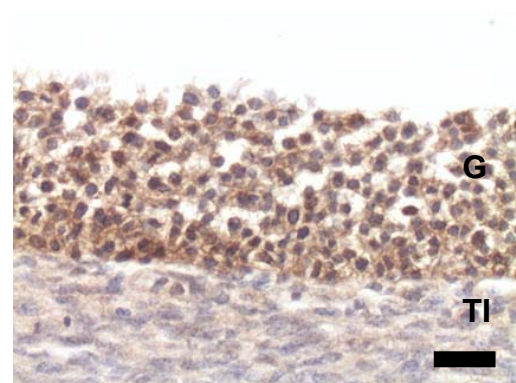


Figura 14. Inmunomarcación de la pared de un folículo terciario con anti-Hsp27. Barra = 25 μ m.

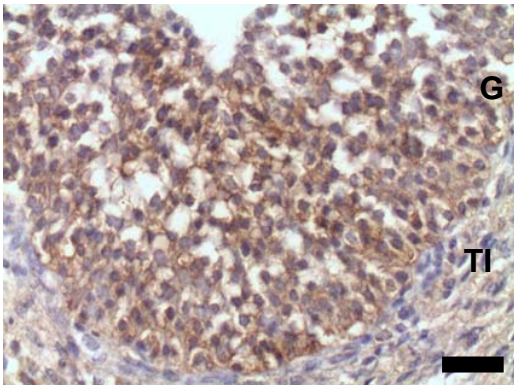


Figura 15. Inmunomarcación de la pared de un quiste folicular espontáneo con anti-Hsp27. Barra = 25 μ m

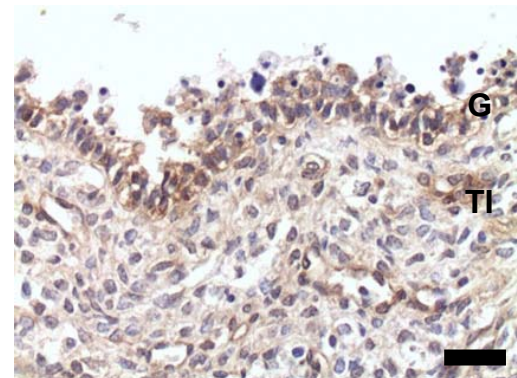


Figura 16. Inmunomarcación de la pared de un folículo atrésico con anti-Hsp27. Barra = 25 μ m.

4.2.1.2 Hsp60

El patrón de marcación citoplásmico-microsomal de Hsp60, permitió comprobar que las células de la granulosa de quistes foliculares expresaron en mayor proporción esta proteína respecto al resto de las categorías foliculares ($p < 0,05$; Figuras 17 y 21). No se encontraron diferencias significativas de expresión entre folículos primarios y secundarios, ni entre folículos terciarios y atrésicos (Figuras 17, 19, 20 y 22). A su vez, en células de la teca, se encontró una distribución similar de la proteína al comparar las diferentes categorías foliculares entre sí, ya que los quistes mostraron los mayores niveles de Hsp60, y por otro lado, folículos terciarios y atrésicos nuevamente se inmunomarcaron en mayor medida que los secundarios ($p < 0,05$; Figuras 18-22).

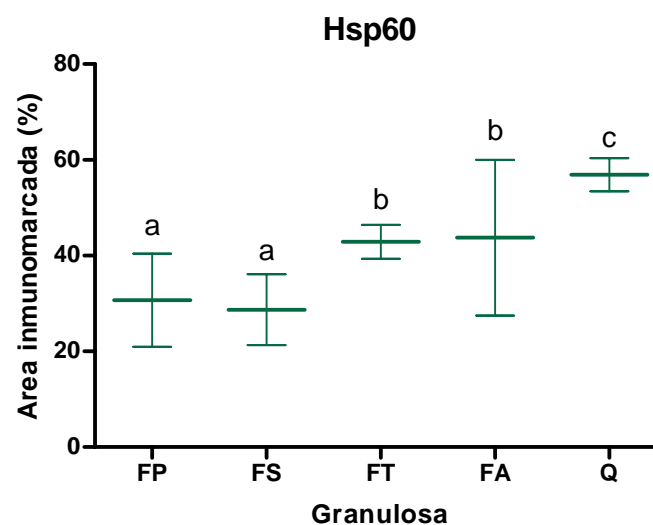


Figura 17. Area inmunomarcada para la proteína Hsp60 en la granulosa de varios tipos foliculares (FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; promedio \pm DE).

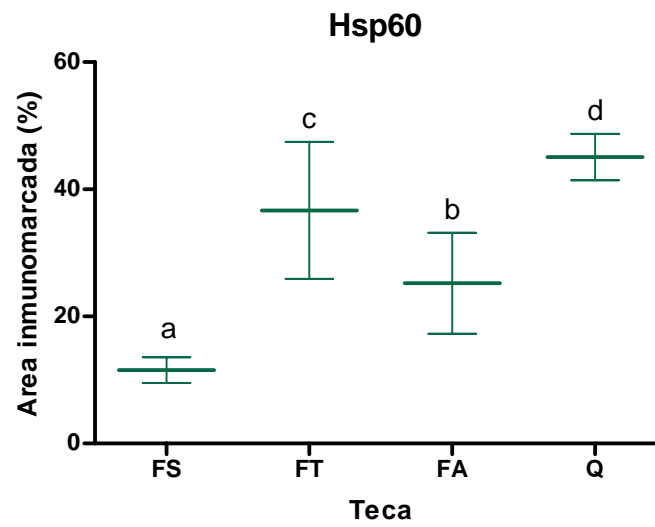


Figura 18. Area inmunomarcada para la proteína Hsp60 en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; promedio \pm DE).

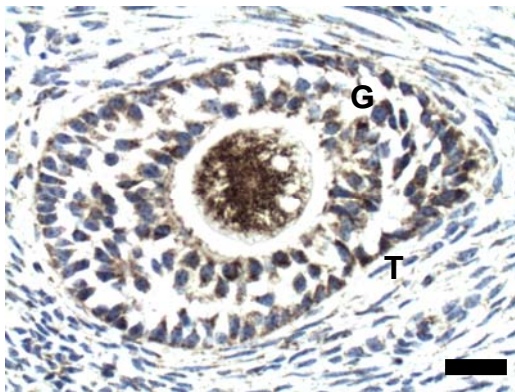


Figura 19. Inmunomarcación de la pared de un folículo secundario con anti-Hsp60. Barra = 25 μ m.

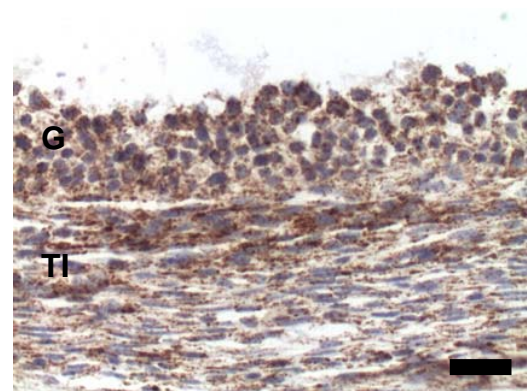


Figura 20. Inmunomarcación de la pared de un folículo terciario con anti-Hsp60. Barra = 25 μ m.

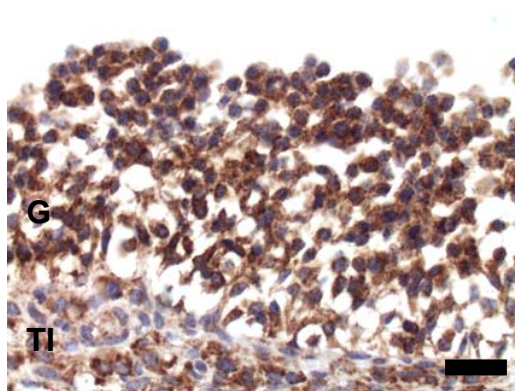


Figura 21. Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un quiste folicular espontáneo. Barra = 25 μ m

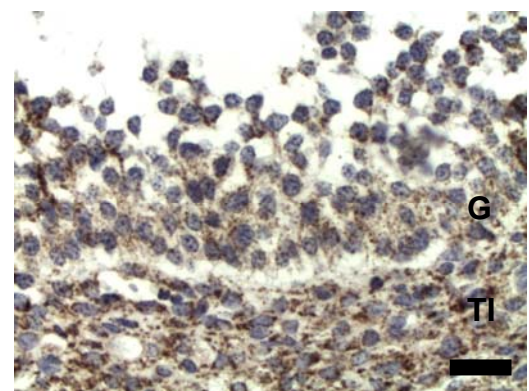


Figura 22. Inmunomarcación de la pared de un folículo atrésico con anti-Hsp60. Barra = 25 μ m.

4.2.1.3 Hsp70

La inmunodetección de Hsp70 permitió corroborar su expresión citoplasmática y nuclear, en las células ováricas estudiadas.

En ovarios sanos, las mayores cantidades de esta proteína fueron detectadas en células de la granulosa de folículos terciarios y de quistes ($p < 0,05$), mientras que folículos atrésicos mostraron niveles proteicos similares a los encontrados en folículos primarios y secundarios (Figura 23 y 25-28). En teca, por el contrario, la inmunomarcación para esta Hsp fue similar en folículos terciarios y atrésicos y estos niveles fueron significativamente superiores a los hallados en el resto de las estructuras foliculares. En los quistes la expresión de Hsp70 fue significativamente superior a la encontrada en folículos secundarios (figuras 24, 25 y 27).

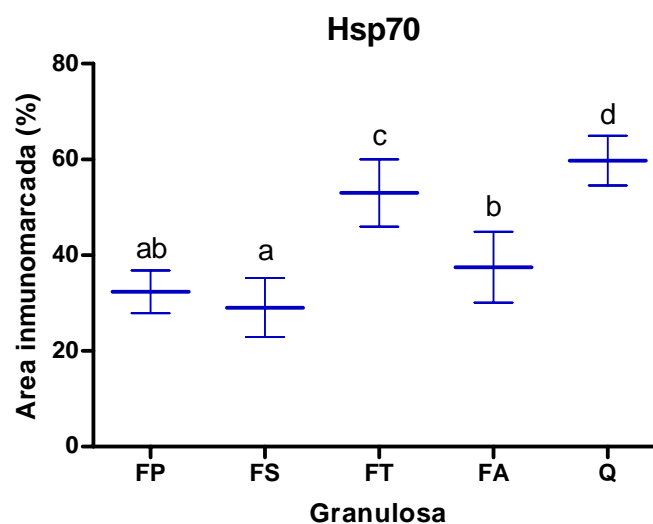


Figura 23. Área inmunomarcada para la proteína Hsp70 en la granulosa de varios tipos foliculares (FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; promedio \pm DE).

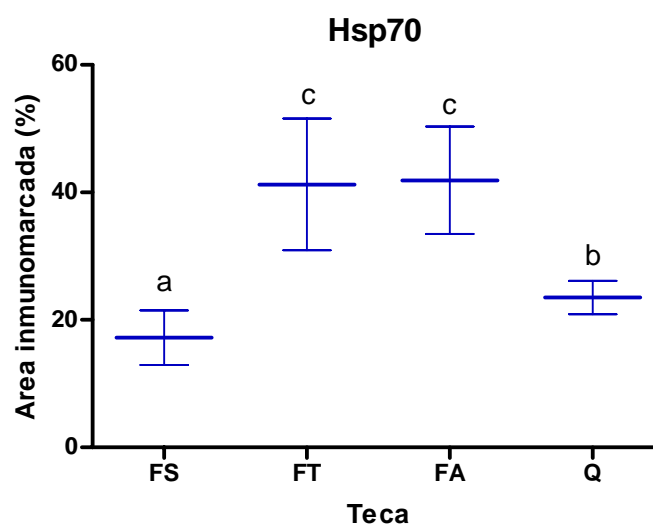


Figura 24 Área inmunomarcada para la proteína Hsp70 en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; promedio \pm DE).

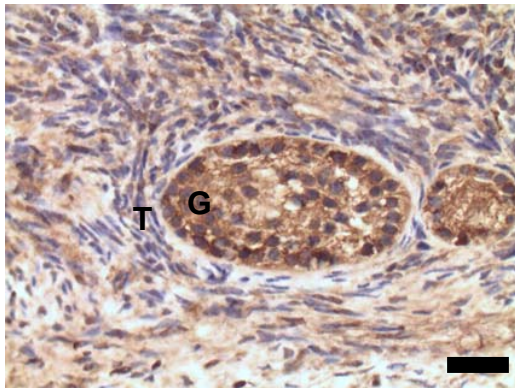


Figura 25. Inmunomarcación de la pared de un folículo secundario con anti-Hsp70. Barra = 25 μ m.

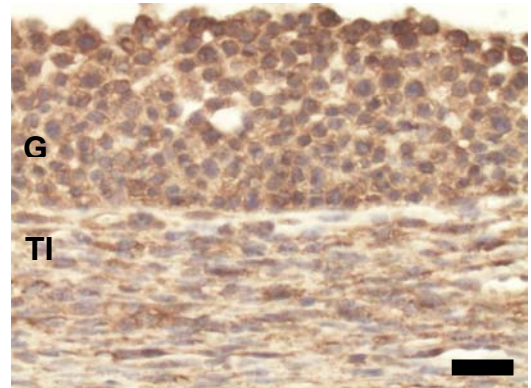


Figura 26. Inmunomarcación de la pared de un folículo terciario con anti-Hsp70. Barra = 25 μ m.

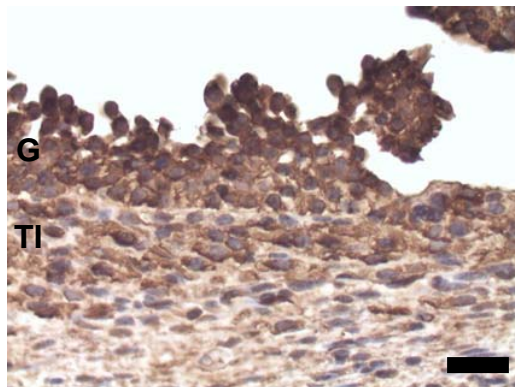


Figura 27. Inmunomarcación de la pared de un quiste folicular espontáneo con anti-Hsp70. Barra = 25 μ m.

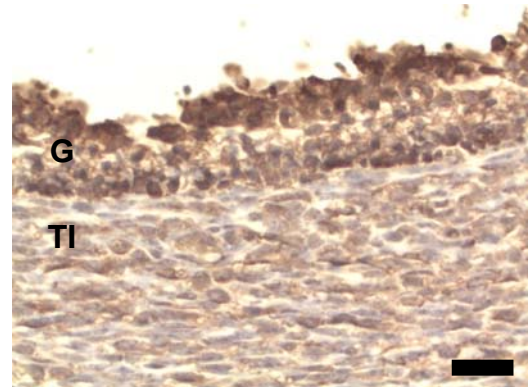


Figura 28. Inmunomarcación de la pared de un folículo atrésico con anti-Hsp70. Barra = 25 μ m.

4.2.1.4 Hsp90

Hsp90 fue inmunodetectada positivamente en todas las células ováricas estudiadas, tanto en el núcleo como en el citoplasma de las mismas.

Las células de la granulosa mostraron mayores cantidades de dicha proteína en comparación con las células de la teca. Se observó que el aumento de la expresión proteica en células de la granulosa, fue acorde al avance de la foliculogénesis. En estas capas celulares, los folículos atrésicos mostraron niveles de marcación similares a los encontrados en folículos secundarios y terciarios ($p < 0,05$; Figuras 29, 31, 32 y 34). Los quistes, por su lado, presentaron la mayor tinción respecto al resto de las categorías foliculares, tanto a nivel de la granulosa como de la teca ($p < 0,05$; Figuras 29, 30 y 33).

En el cuerpo lúteo y células vasculares, la inmunomarcación fue intensa, mientras que el tejido intersticial y los cuerpos blancos mostraron expresión moderada de esta proteína. Una débil expresión fue observada en células de la túnica albugínea.

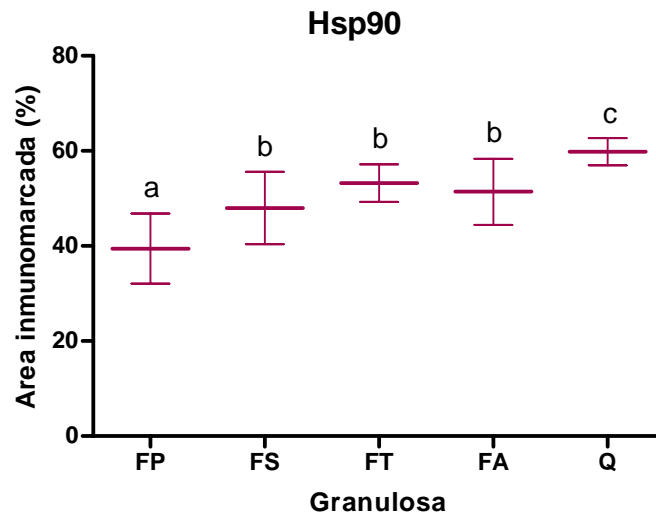


Figura 29. Área inmunomarcada para la proteína Hsp90 en la granulosa de varios tipos foliculares (FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; promedio \pm DE).

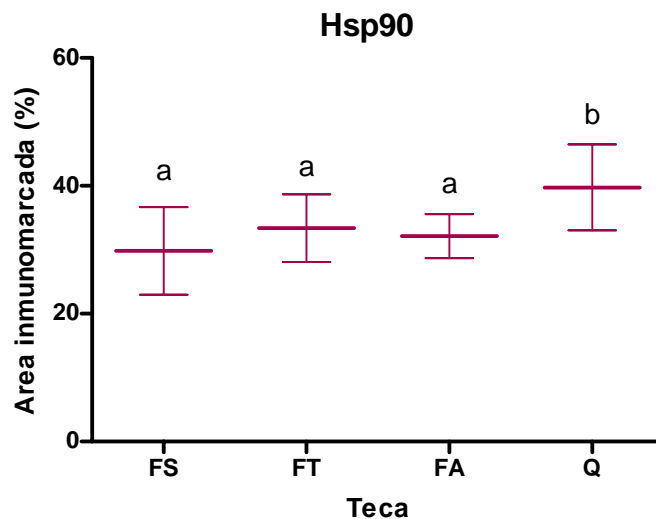


Figura 30. Área inmunomarcada para la proteína Hsp90 en la teca interna de varios tipos foliculares (FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios, FA: Atrésicos, Q: Quísticos) de ovarios recolectados en frigorífico. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; promedio \pm DE).

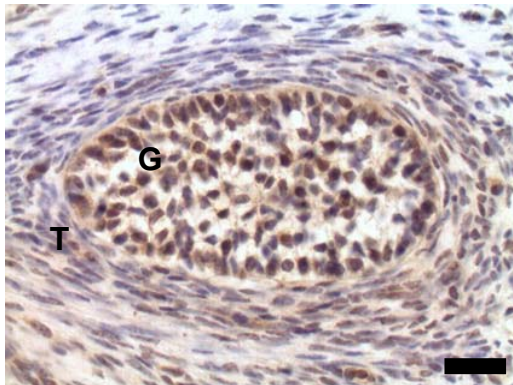


Figura 31. Inmunomarcación de la pared de un folículo secundario con anti-Hsp90. Barra = 25 μ m.

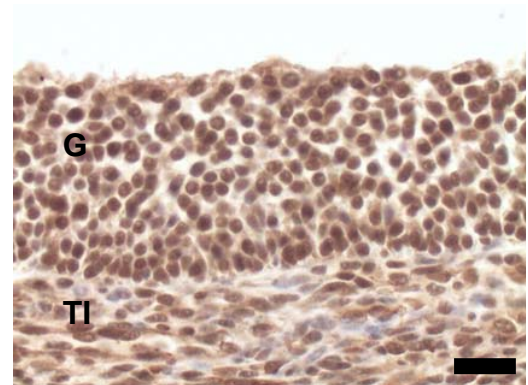


Figura 32. Inmunomarcación de la pared de un folículo terciario con anti-Hsp90. Barra = 25 μ m.

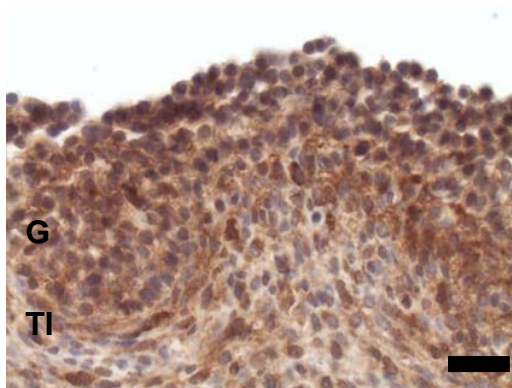


Figura 33. Inmunomarcación de la pared de un folículo quístico espontáneo, con anti-Hsp90. Barra = 25 μ m.

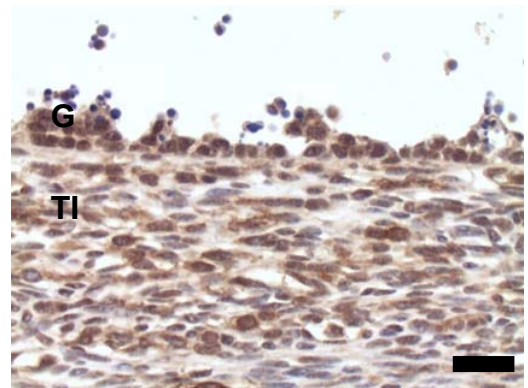


Figura 34. Inmunomarcación de la pared de un folículo atrésico, con anti-Hsp90. Barra = 25 μ m.

4.2.2 Expresión proteica de HSPs en las distintas categorías foliculares y quistes de ovarios de animales con COD inducida.

Se realizó la inmunodetección proteica sobre preparados histológicos provenientes de ovarios con quistes inducidos. Dichas muestras correspondieron al grupo de animales del modelo experimental sometido al protocolo de inducción por administración de ACTH (Grupo I, $n=6$; ver sección 3.1.2.1). Se evaluaron las similitudes y diferencias en la expresión de HSPs entre los folículos primarios, secundarios, terciarios y quísticos de ovarios de animales con enfermedad quística inducida experimentalmente.

4.2.2.1 Hsp27

En el caso de la proteína de golpe térmico de 27 kDa, la marcación en células de la granulosa de folículos en crecimiento obtenidos de ovarios con quistes inducidos, fue

similar a la hallada en las estructuras quísticas allí desarrolladas ($p < 0,05$; Figuras 35A, 36-39)

Por otro lado, la expresión de Hsp27 en células de la teca fue significativamente superior en folículos quísticos y terciarios respecto a los secundarios (preantrales). Éstos últimos se inmunomarcaron significativamente en menor medida que los anteriores ($p < 0,05$; Figuras 35B y 37-39).

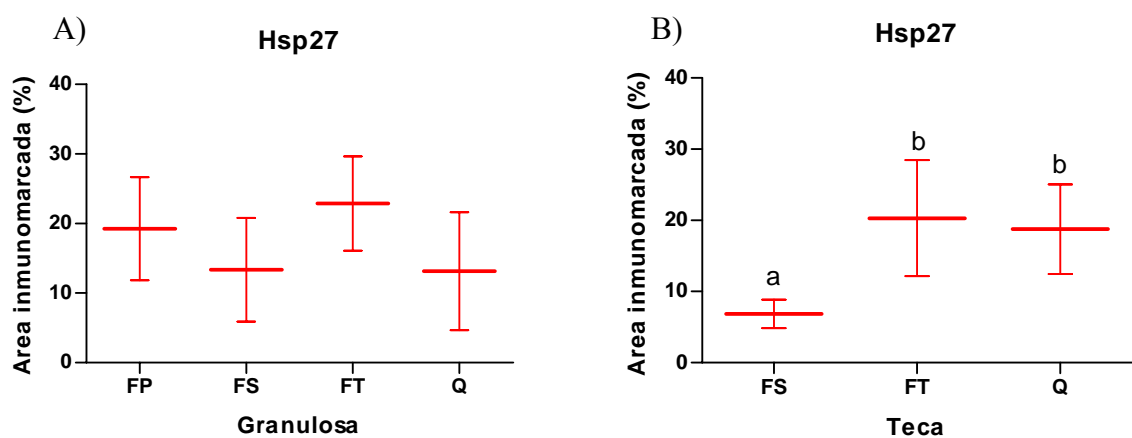


Figura 35: Área inmunohistoquímicamente marcada para la proteína Hsp27 en granulosa (A) y teca (B) de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios y Q: Quistes, provenientes de ovarios con enfermedad quística inducida con ACTH ($n=6$; promedio \pm DE). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

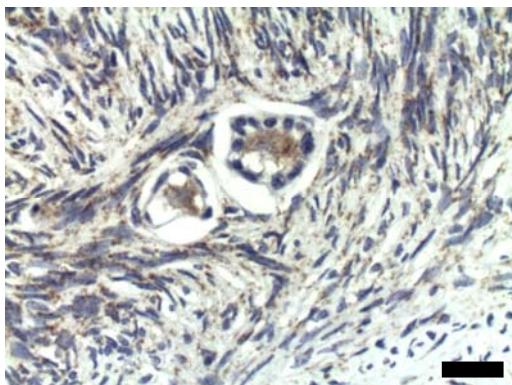


Figura 36. Inmunomarcación con anti-Hsp27 de la pared de un folículo primario, proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida. Barra = 25 μ m.

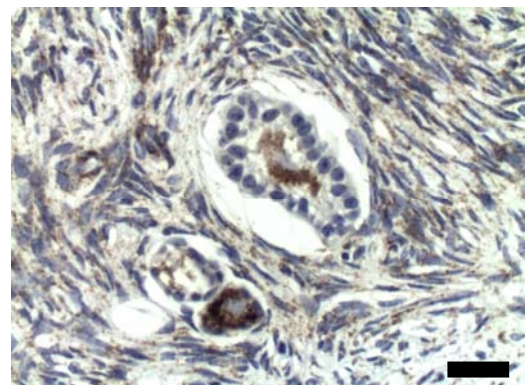


Figura 37. Inmunomarcación con anti-Hsp27 de la pared de un folículo secundario, proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida. Barra = 25 μ m.

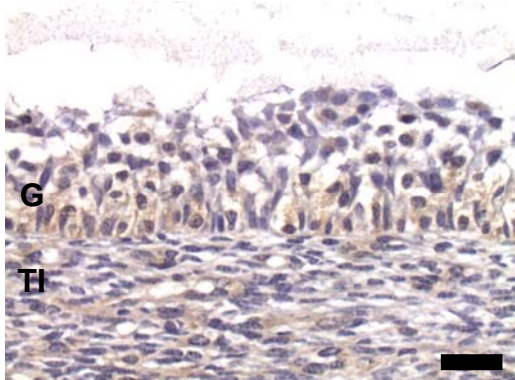


Figura 38. Inmunomarcación con anti-Hsp27 de la pared de un folículo terciario, proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida. Barra = 25 μ m.

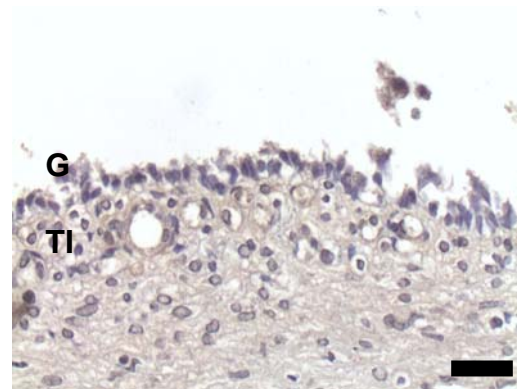


Figura 39. Inmunomarcación con anti-Hsp27 de la pared de un quiste inducido con ACTH. Barra = 25 μ m.

4.2.2.2 Hsp60

El área inmunohistoquímicamente marcada de la granulosa con anti-Hsp60 fue similar para todas las categorías foliculares evaluadas provenientes de ovarios con enfermedad quística inducida, incluyendo las estructuras quísticas ($p < 0,05$; Figuras 40A, 41-44).

A nivel de células de la teca, la mayor inmunomarcación fue observada en folículos terciarios (Figura 43); mientras que los quistes y las estructuras foliculares secundarias (preantrales) evidenciaron niveles de marcación similares entre sí ($p < 0,05$; Figuras 40B, 42 y 44).

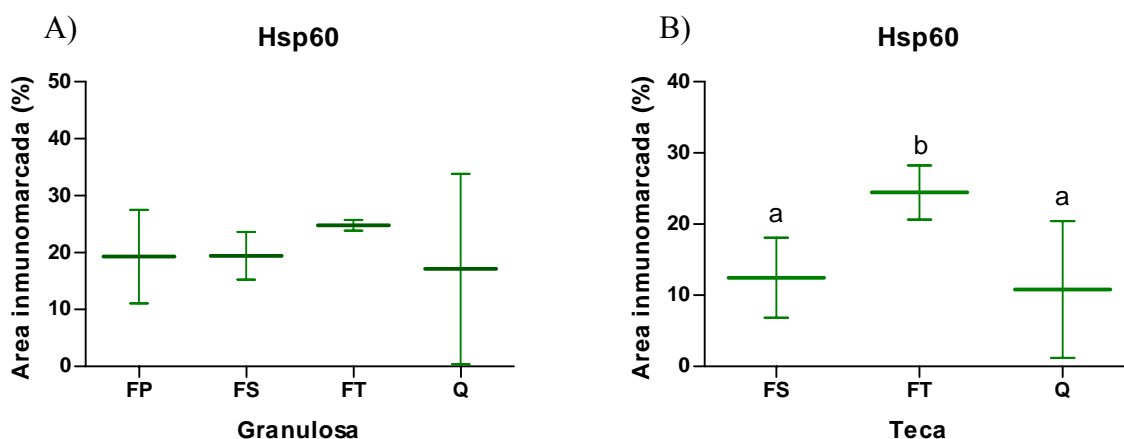


Figura 40: Área inmunohistoquímicamente marcada para la proteína Hsp60 en granulosa (A) y teca (B) de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios y Q: Quistes, provenientes de ovarios con enfermedad quística inducida con ACTH ($n=6$; promedio \pm DE). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

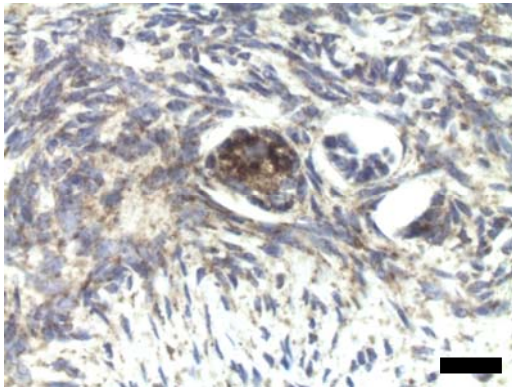


Figura 41. Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un folículo primario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida. Barra = 25 μ m.

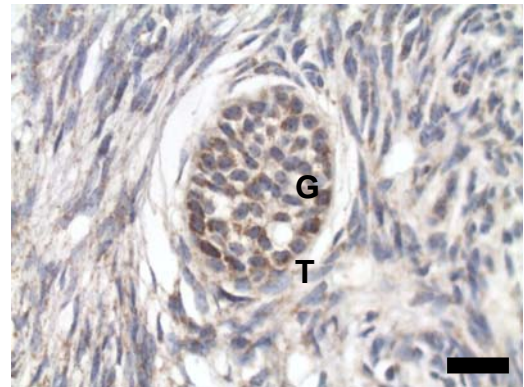


Figura 42. Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un folículo secundario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida. Barra = 25 μ m.

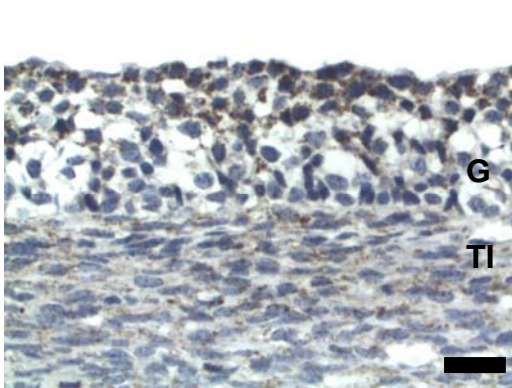


Figura 43. Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un folículo terciario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida. Barra = 25 μ m.

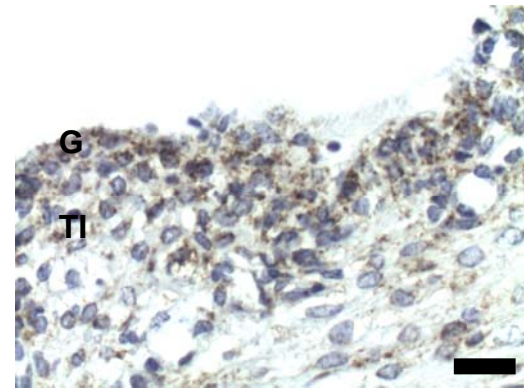


Figura 44. Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un quiste inducido con ACTH. Barra = 25 μ m.

4.2.2.3 Hsp70

El patrón de marcación citoplasmática y nuclear de Hsp70 fue claramente observado en todas las categorías foliculares analizadas, tanto en células de la granulosa como en células de la teca.

En capas de la granulosa, los mayores niveles proteicos de Hsp70 fueron observados en los quistes inducidos respecto al resto de las categorías foliculares evaluadas, excepto en relación a los folículos terciarios ($p < 0,05$; Figuras 45A, 46-49). No hubo diferencias significativas en cuanto a la expresión de esta proteína, entre las estructuras foliculares en desarrollo (primarios, secundarios y terciarios) provenientes de ovarios quísticos ($p < 0,05$).

En células tecales se observó ese mismo perfil de expresión; donde los niveles superiores de Hsp70 se detectaron en los quistes (Figura 45B). Nuevamente, estos

últimos no se diferenciaron de folículos terciarios en cuanto a su marcación pero fue significativa la diferencia frente a los folículos secundarios (Figuras 47 y 49).

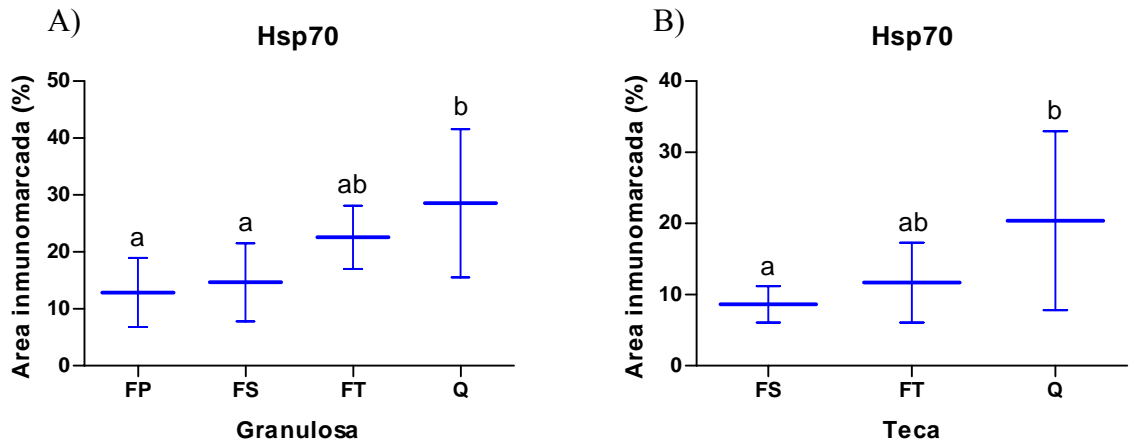


Figura 45: Área inmunohistoquímicamente marcada para la proteína Hsp70 en granulosa (A) y teca (B) de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios y Q: Quistes, provenientes de ovarios con enfermedad quística inducida con ACTH ($n=6$; promedio \pm DE). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

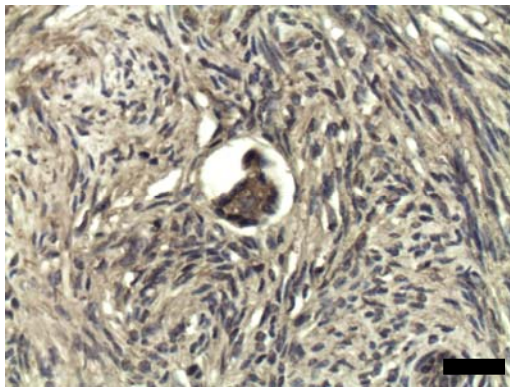


Figura 46. Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un folículo primario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida. Barra = 25 μ m.

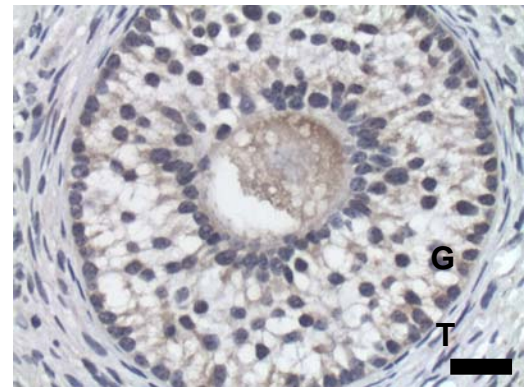


Figura 47. Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un folículo secundario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida. Barra = 25 μ m.

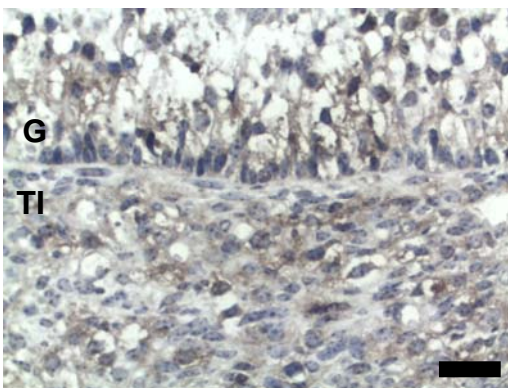


Figura 48. Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un folículo terciario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida. Barra = 25 μ m.

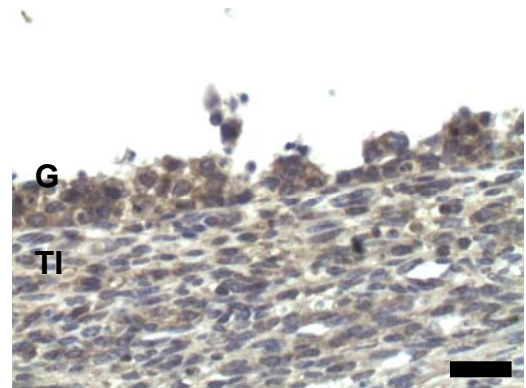


Figura 49. Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un quiste inducido con ACTH. Barra = 25 μ m.

4.2.2.4 Hsp90

La inmunodetección de Hsp90 en células de la granulosa, permitió cuantificar los mayores niveles de esta proteína en folículos primarios de ovarios con quistes inducidos, excepto en comparación con los folículos secundarios que mostraron la misma marcación ($p < 0,05$; Figuras 51-54). El menor porcentaje de área inmunomarcada fue observado en los quistes inducidos, aunque no fueron significativas las diferencias entre éstos y los folículos terciarios (Figuras 50A, 53 y 54).

Para el caso de células de la teca, los folículos terciarios de animales con la enfermedad, nuevamente mostraron niveles de Hsp90 similares a los hallados en estructuras quísticas inducidas (Figuras 50B, 53 y 54).

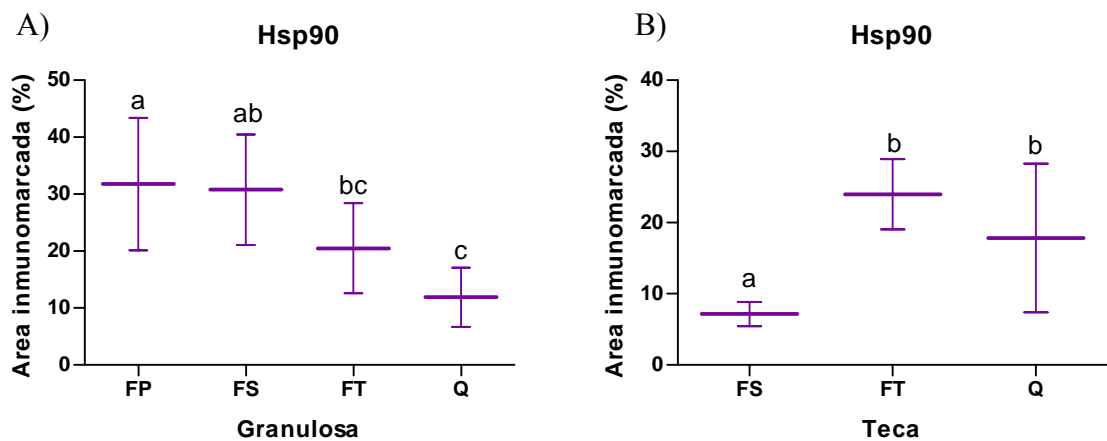


Figura 50: Área inmunohistoquímicamente marcada para la proteína Hsp90 en granulosa (A) y teca (B) de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios y Q: Quistes, provenientes de ovarios con enfermedad quística inducida con ACTH ($n=6$; promedio \pm DE). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

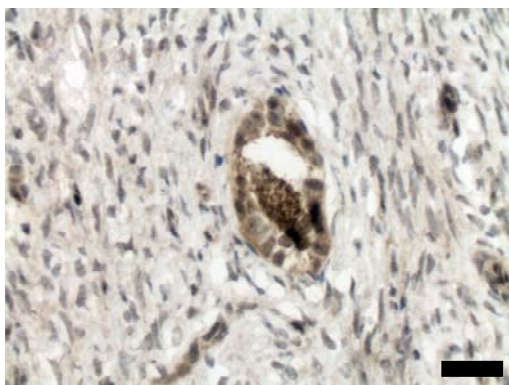


Figura 51. Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un folículo primario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida. Barra = 25 μ m.

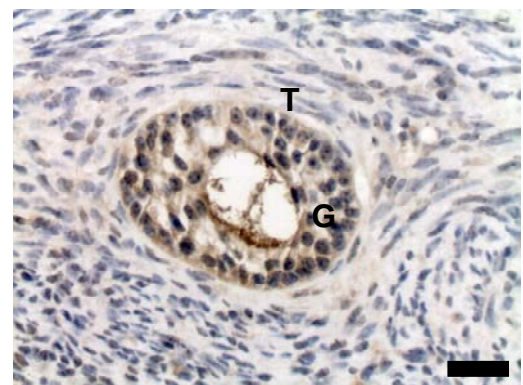


Figura 52. Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un folículo secundario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida. Barra = 25 μ m.

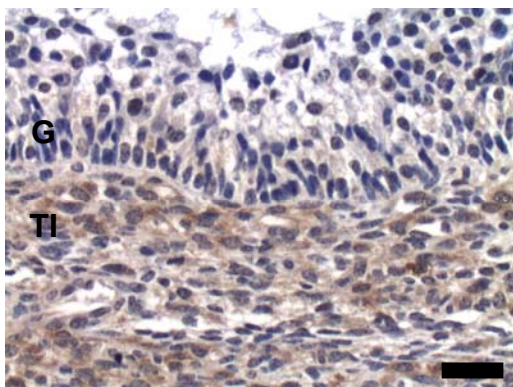


Figura 53. Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un folículo terciario proveniente de un ovario con enfermedad quística inducida. Barra = 25 μ m.

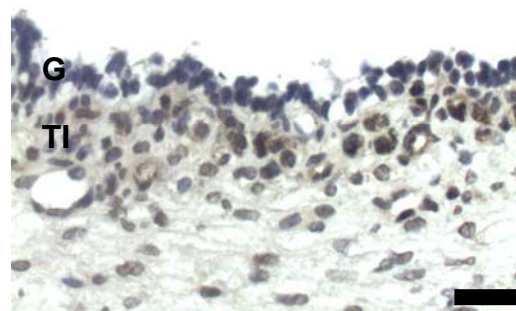


Figura 54. Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un quiste inducido con ACTH. Barra = 25 μ m.

4.2.3 Comparación de los niveles proteicos de HSPs entre muestras del modelo experimental y muestras obtenidas en frigorífico.

Con el propósito de determinar similitudes y diferencias en cuanto a la expresión de HSPs, entre la enfermedad inducida de manera experimental y la enfermedad de desarrollo espontáneo, se contrastaron los hallazgos efectuados en muestras provenientes del modelo experimental frente a los obtenidos a partir de material de frigorífico.

En primer lugar se compararon los quistes inducidos experimentalmente (provenientes del Grupo I del modelo) con cada una de las estructuras foliculares de ovarios controles (provenientes del Grupo II). En segundo lugar, los quistes espontáneos provenientes de material de frigorífico se contrastaron con cada categoría folicular obtenida de ovarios sanos de la misma procedencia.

Finalmente y a partir de los datos recabados, fue posible contraponer las variaciones observadas en el modelo experimental, con las halladas en muestras de playa de faena.

4.2.3.1 Hsp27

La comparación de las áreas inmunomarcadas de la granulosa entre estructuras foliculares de ovarios controles y quistes inducidos del modelo experimental, permitió reconocer que la proteína Hsp27 se expresó significativamente en mayor medida en folículos primarios respecto a los quistes ($p < 0,05$; Figuras 55, 59 y 62).

En el caso de muestras de frigorífico, las estructuras foliculares en los primeros estadios de desarrollo mostraron niveles proteicos de Hsp27 significativamente inferiores a los observados en los quistes ($p < 0,05$; Figura 56). Sin embargo, las estructuras quísticas se inmunomarcaron de manera similar a los folículos terciarios, tal como ocurrió con muestras del modelo experimental (Figuras 63 y 64).

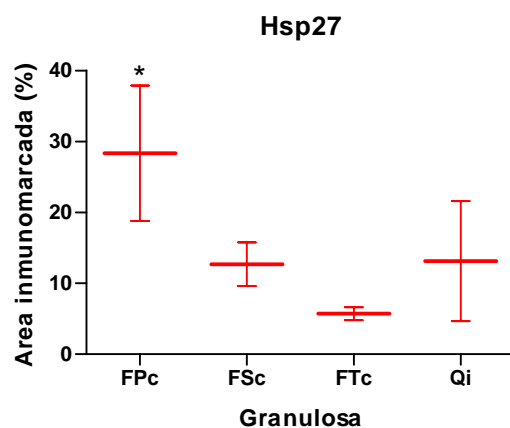


Figura 55: Área inmunomarcada para la proteína Hsp27 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

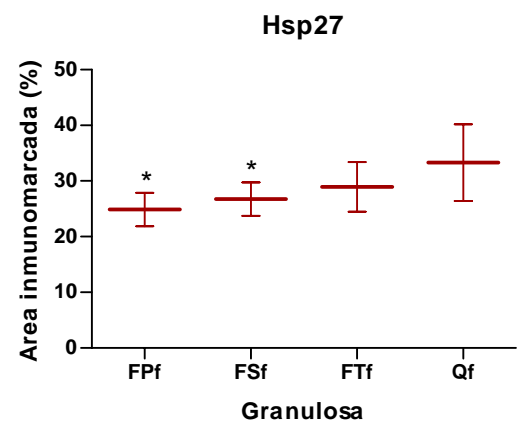


Figura 56: Área inmunomarcada para la proteína Hsp27 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f) (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

Para el caso de las células de la teca, los niveles proteicos de Hsp27 inmunodetectados en quistes inducidos fueron significativamente superiores a los hallados en folículos secundarios y terciarios controles, del modelo experimental ($p < 0,05$; Figuras 57, 60-62).

En cambio no hubo diferencias significativas en la expresión de esta proteína en células de la teca, al comparar los folículos en crecimiento con los quistes espontáneos obtenidos de muestras provenientes de frigorífico (Figuras 58, 63 y 64).

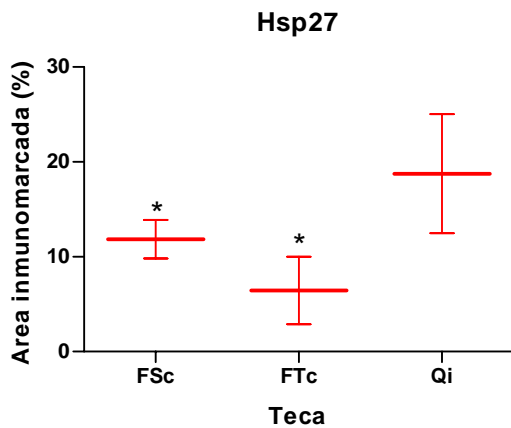


Figura 57: Área inmunomarcada para la proteína Hsp27 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

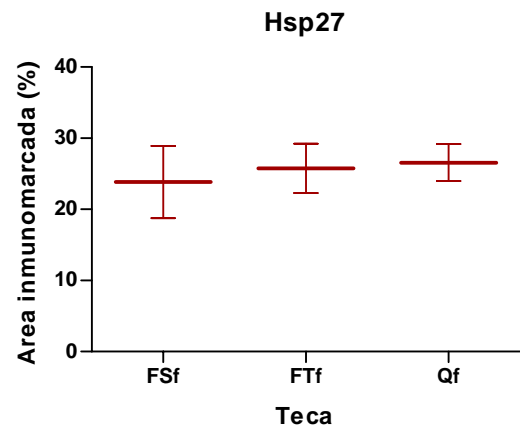


Figura 58: Área inmunomarcada para la proteína Hsp27 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f) (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

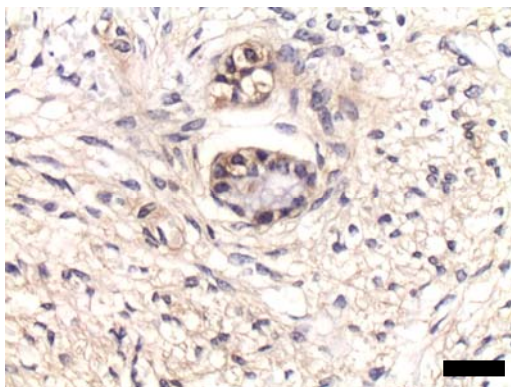


Figura 59: Inmunomarcación de la pared de un folículo primario control, del modelo experimental, con anti-Hsp27. Barra = 25 μ m.

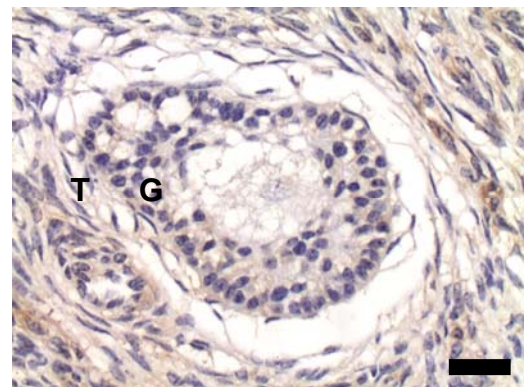


Figura 60: Inmunomarcación de la pared de un folículo secundario del grupo control, del modelo experimental, con anti-Hsp27. Barra = 25 μ m.

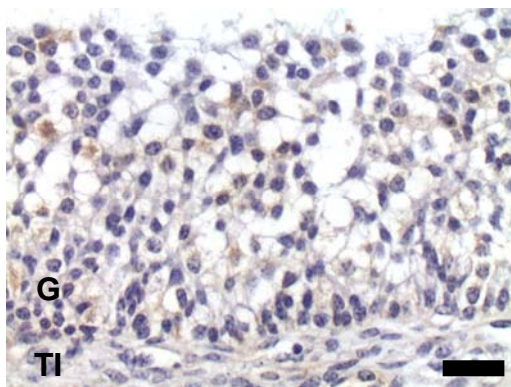


Figura 61: Inmunomarcación de la pared de un folículo terciario del grupo control del modelo experimental, con anti-Hsp27. Barra = 25 μ m.

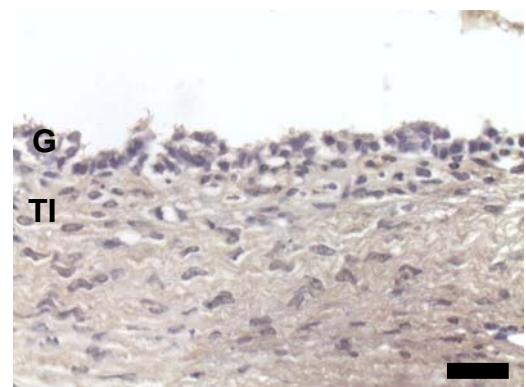


Figura 62: Inmunomarcación con anti-Hsp27 de la pared de un quiste inducido con ACTH. Barra = 25 μ m.

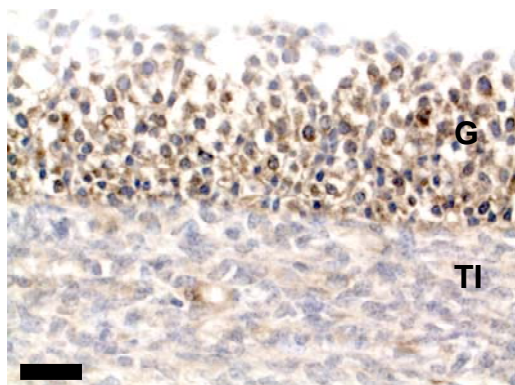


Figura 63. Inmunomarcación con anti-Hsp27 de la pared de un folículo terciario de ovario sano obtenido en frigorífico. Barra = 25 µm.

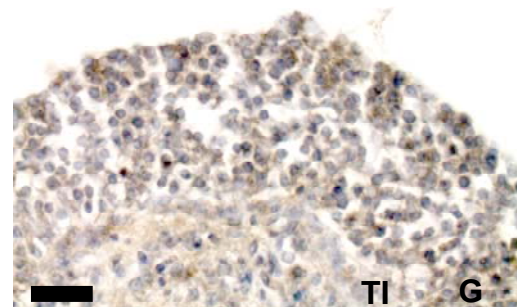


Figura 64. Inmunomarcación con anti-Hsp27 de la pared de un quiste espontáneo de ovario obtenido en frigorífico. Barra = 25 µm.

4.2.3.2 Hsp60

La inmunodetección de la proteína Hsp60 en células de la granulosa no evidenció diferencias significativas al comparar cada estadio del desarrollo folicular normal, con las estructuras quísticas, para el caso de muestras del modelo experimental ($p < 0,05$; Figuras 65, 69 y 70). Sin embargo al evaluar dicha proteína en folículos de ovarios obtenidos en frigorífico, se encontraron diferencias significativas para todos los folículos en crecimiento con respecto a los quistes espontáneos ($p < 0,05$; Figuras 66, 71 y 72).

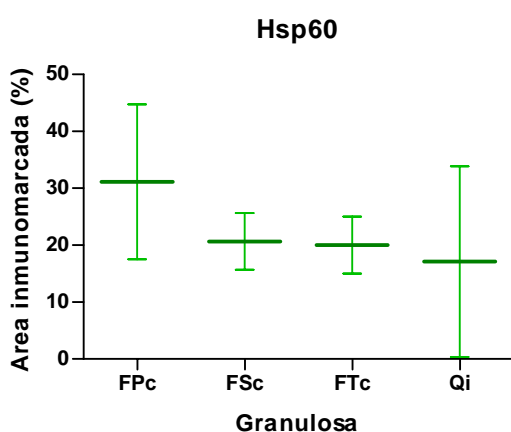


Figura 65: Área inmunomarcada para la proteína Hsp60 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

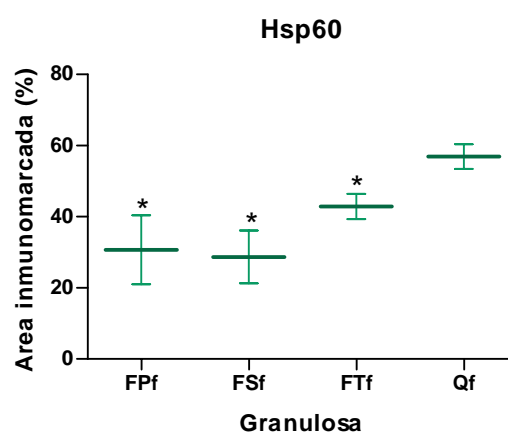


Figura 66: Área inmunomarcada para la proteína Hsp60 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f) (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

Los folículos controles del modelo experimental evidenciaron en células de la teca, niveles proteicos de Hsp60 similares a los encontrados en los quistes inducidos ($p < 0,05$; Figuras 67, 69 y 70). En contraste con ello, hubo notables diferencias entre muestras de frigorífico, ya que la mayor tinción en células de la teca se observó en los quistes espontáneos respecto al resto de las estructuras de la misma procedencia ($p < 0,05$; Figuras 68, 71 y 72).

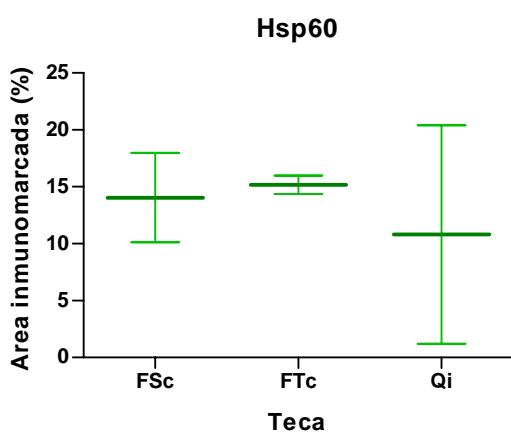


Figura 67: Área inmunomarcada para la proteína Hsp60 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

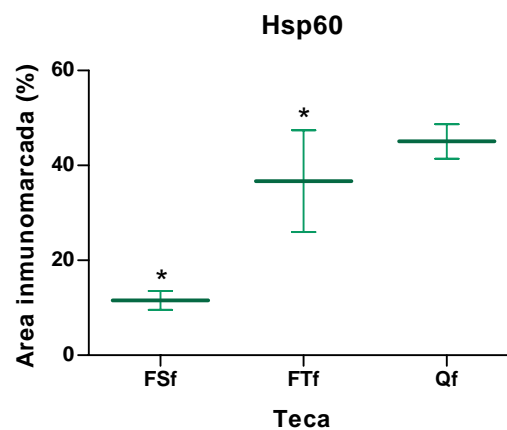


Figura 68: Área inmunomarcada para la proteína Hsp60 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f) (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

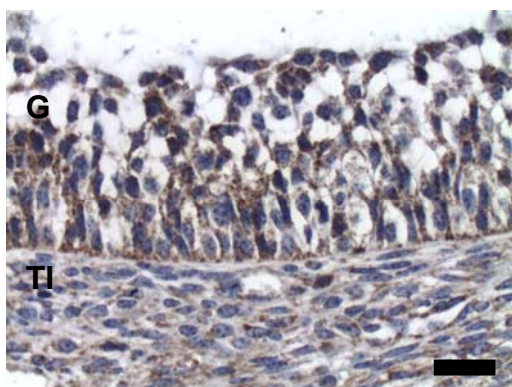


Figura 69. Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un folículo terciario del grupo control, del modelo experimental. Barra = 25 μ m.

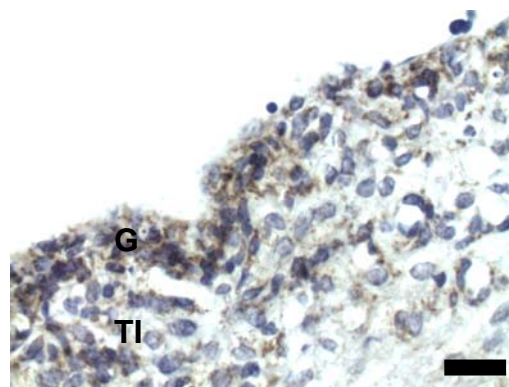


Figura 70. Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un quiste inducido con ACTH. Barra = 25 μ m.

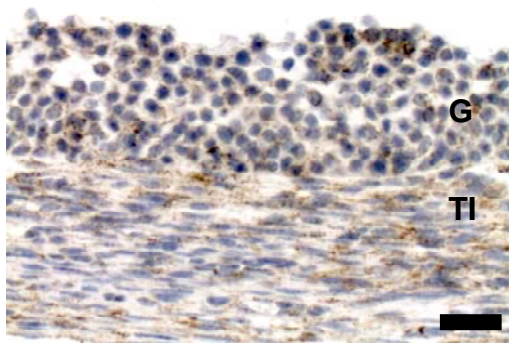


Figura 71. Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un folículo terciario de ovario obtenido en frigorífico. Barra = 25 µm.

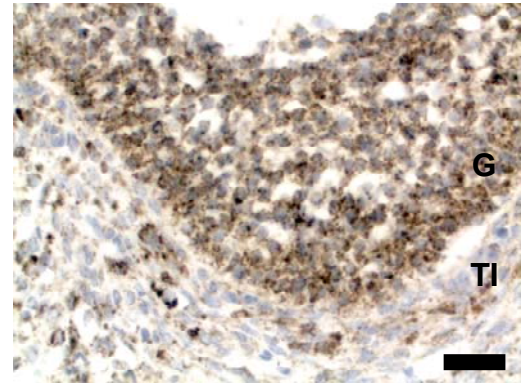


Figura 72. Inmunomarcación con anti-Hsp60 de la pared de un quiste espontáneo de ovario obtenido en frigorífico. Barra = 25 µm.

4.2.3.3 Hsp70

Las estructuras foliculares provenientes de animales controles del modelo experimental reflejaron niveles proteicos de Hsp70 similares a los hallados en quistes inducidos, para el caso de células de la granulosa (Figuras 73, 77 y 78).

Por el contrario, los folículos de ovarios sanos obtenidos en frigorífico, evidenciaron diferencias significativas con respecto a los quistes espontáneos en cuanto a la expresión proteica de Hsp70 en capas de la granulosa. Estas diferencias en la inmunomarcación se observaron en cada uno de los niveles estructurales al contrastarlos con los quistes ($p < 0,05$; Figuras 74, 79 y 80).

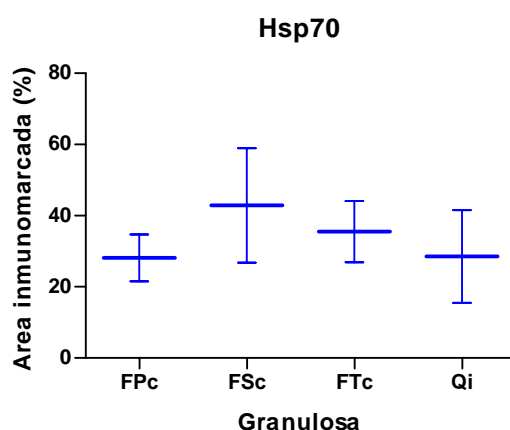


Figura 73: Área inmunomarcada para la proteína Hsp70 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

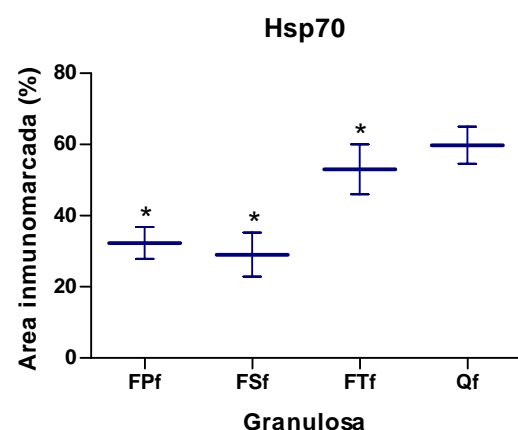


Figura 74: Área inmunomarcada para la proteína Hsp70 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f) (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

No hubo diferencias significativas en cuanto a la inmunomarcación de Hsp70 en las capas celulares de la teca para ninguna categoría folicular de ovarios controles respecto a los quistes inducidos del modelo ($p < 0,05$; Figura 75).

Sin embargo, los folículos terciarios de ovarios de frígido mostraron niveles de Hsp70 significativamente superiores a los hallados en quistes espontáneos, en las capas de la teca (Figuras 76, 79 y 80).

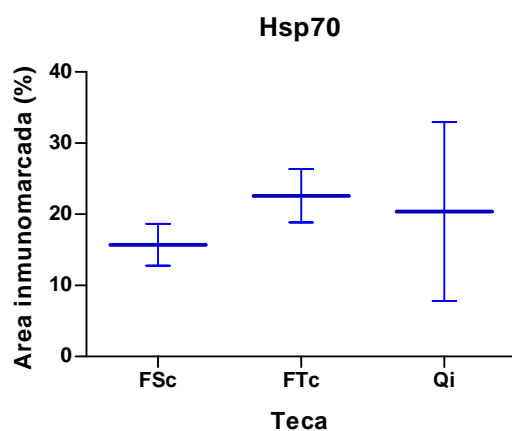


Figura 75: Área inmunomarcada para la proteína Hsp70 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

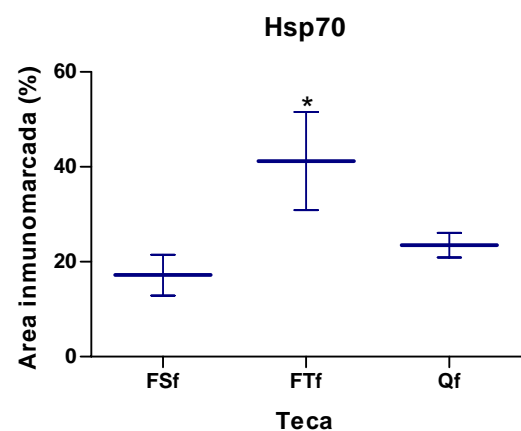


Figura 76: Área inmunomarcada para la proteína Hsp70 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frígido (f) (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

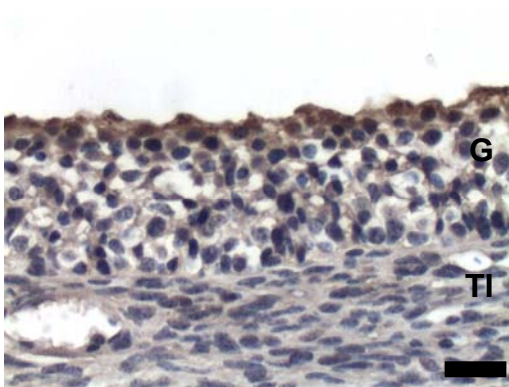


Figura 77. Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un folículo terciario del grupo control, del modelo experimental. Barra = 25 μ m.

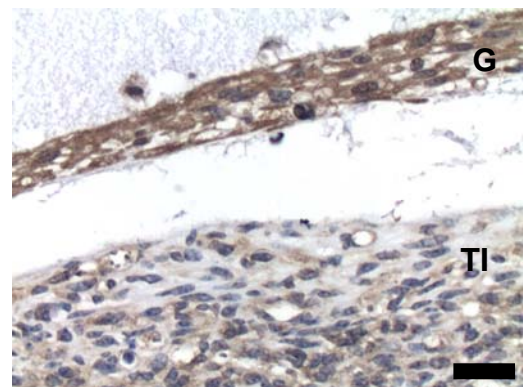


Figura 78. Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un quiste inducido con ACTH. Barra = 25 μ m.

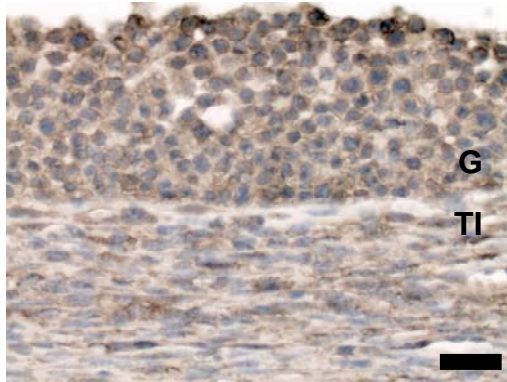


Figura 79. Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un folículo terciario de ovario de frigorífico. Barra = 25 μ m.



Figura 80. Inmunomarcación con anti-Hsp70 de la pared de un quiste espontáneo, obtenido en frigorífico. Barra = 25 μ m.

4.2.3.4 Hsp90

La inmunomarcación de Hsp90 en células de la granulosa, permitió observar las similitudes en los niveles de expresión entre estructuras foliculares de ovarios controles y quistes inducidos del modelo experimental ($p < 0,05$; Figuras 81, 85 y 86).

A diferencia de ello, los folículos provenientes de ovarios sanos obtenidos en frigorífico mostraron diferencias notables en todos los casos con los quistes de la misma procedencia ($p < 0,05$). Se observó una tinción significativamente superior en células de la granulosa de las estructuras quísticas en relación al resto de los folículos (Figuras 82, 87 y 88).

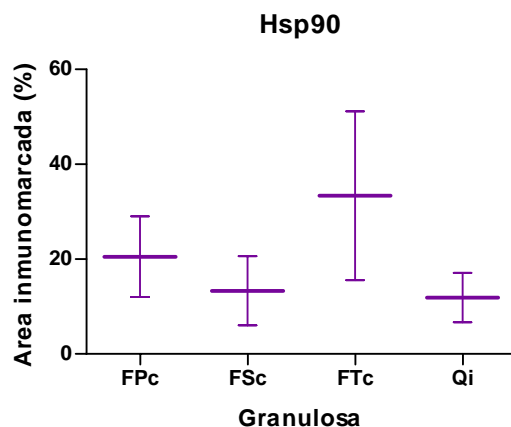


Figura 81: Área inmunomarcada para la proteína Hsp90 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

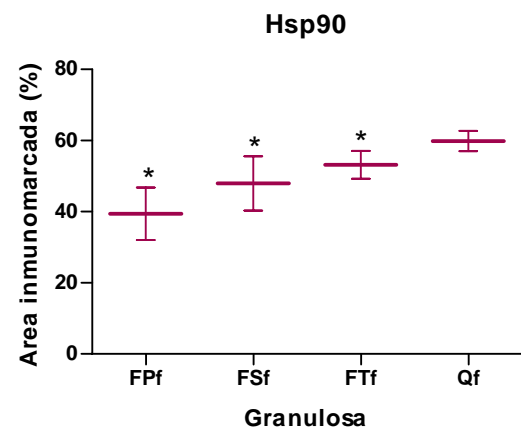


Figura 82: Área inmunomarcada para la proteína Hsp90 en granulosa de FP: Folículos Primarios, FS: Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f) (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

Para las capas celulares de la teca, tampoco hubo diferencias significativas en cuanto a los niveles inmunodetectados de Hsp90, entre folículos de animales controles y quistes de animales inducidos del modelo experimental ($p < 0,05$; Figuras 83, 85 y 86). Sin embargo, las muestras de frigorífico denotaron un comportamiento diferente, ya que los quistes mostraron niveles significativamente superiores a los hallados en estructuras foliculares secundarias ($p < 0,05$; Figuras 84, 87 y 88).

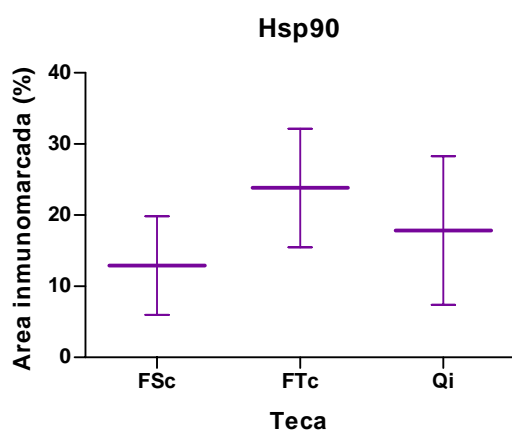


Figura 83: Área inmunomarcada para la proteína Hsp90 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios del grupo control (c) y Q: Quistes inducidos (i), todos provenientes del modelo experimental (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

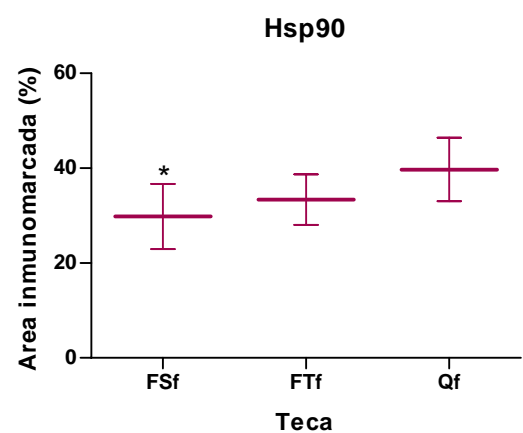


Figura 84: Área inmunomarcada para la proteína Hsp90 en teca de FS: Folículos Secundarios, FT: Terciarios de ovarios sanos y Q: Quistes espontáneos, todos provenientes de frigorífico (f) (promedio \pm DE). * Diferencia significativa con respecto a los quistes ($p < 0,05$).

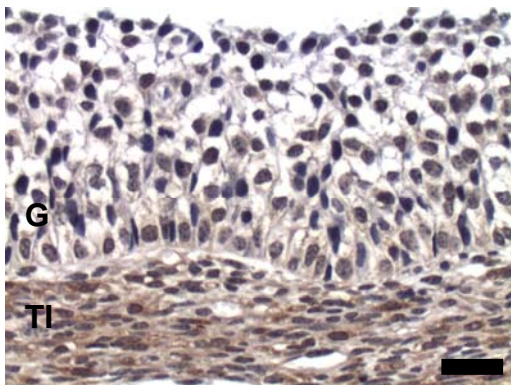


Figura 85. Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un folículo terciario control, del modelo experimental. Barra = 25 μ m.

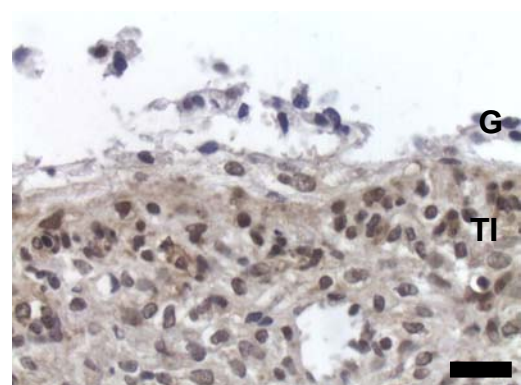


Figura 86. Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un quiste inducido con ACTH. Barra = 25 μ m.

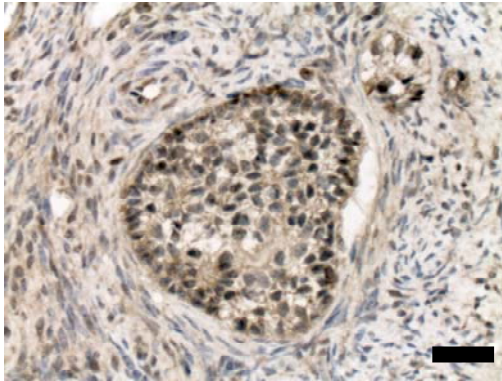


Figura 87. Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un folículo secundario de ovario de frigorífico. Barra = 25 μ m.

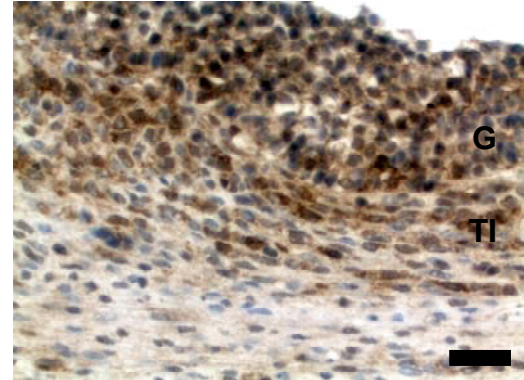


Figura 88. Inmunomarcación con anti-Hsp90 de la pared de un quiste espontáneo. Barra = 25 μ m.

4.3 Evaluación de HSPs en pared folicular completa mediante Western Blot.

En estos ensayos se trabajó con la pared completa de los folículos provenientes de material de frigorífico, utilizando las muestras obtenidas según se describió en la sección 3.1.3.

Se evaluaron en todos los casos, folículos antrales pequeños (< 5mm), folículos antrales grandes (> 10mm) y quistes espontáneos provenientes de material obtenido en playa de faena.

La inmunomarcación en membranas de nitrocelulosa permitió cuantificar en forma relativa los niveles proteicos de cada Hsp respecto a los niveles de β -actina en cada estructura folicular, normalizando los datos y pudiendo compararlos entre sí.

4.3.1 Hsp27

El revelado de las membranas por quimioluminiscencia dio como resultado bandas a la altura de los 27 kDa para el caso de la proteína de golpe térmico Hsp27, en las tres categorías foliculares evaluadas (Figura 90). De la misma manera, en la mitad superior de la membrana se realizó la inmunodetección de la proteína β -actina de 43 kDa, y los niveles cuantificados para esta última se emplearon para la normalización de los correspondientes a Hsp27.

Los folículos antrales grandes evidenciaron los mayores niveles de expresión de Hsp27 respecto al resto de las estructuras estudiadas ($p < 0,05$; Figura 89). Al mismo tiempo, los quistes y los folículos antrales pequeños no mostraron diferencias

significativas entre sí, en cuanto a los niveles de dicha proteína detectados en pared folicular completa.

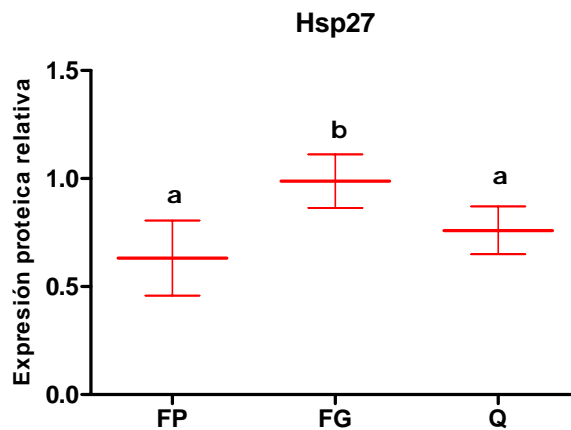


Figura 89. Densidad Óptica Integrada relativa a β -actina para Hsp27, en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Foliculos antrales pequeños, FG: grandes, Q: quísticos) provenientes de material de frigorífico. Diferentes letras indican diferencias significativas (promedio \pm DE; $p < 0,05$).

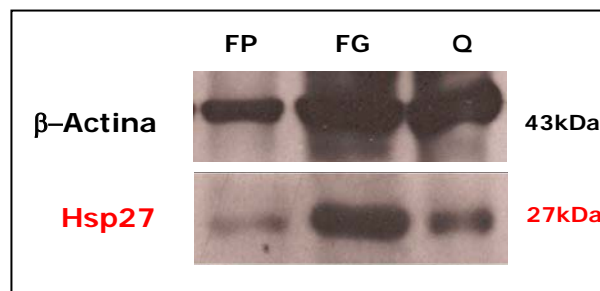


Figura 90: Placa radiográfica representativa de un Western Blot que muestra la expresión de Hsp27 en la pared folicular de foliculos antrales pequeños (FP), grandes (FG), y quistes (Q) provenientes de material obtenido en frigorífico.

4.3.2 Hsp60

La inmunomarcación de las membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo anti-Hsp60 mostró bandas específicas a la altura de los 60 kDa correspondientes a la proteína en cuestión, en todas las estructuras foliculares evaluadas. La cuantificación de Hsp60 relativa a β -actina, demostró que la primera se expresa mayormente en pared de estructuras foliculares antrales normales, respecto a los quistes ($p < 0,05$; Figuras 91 y 92).

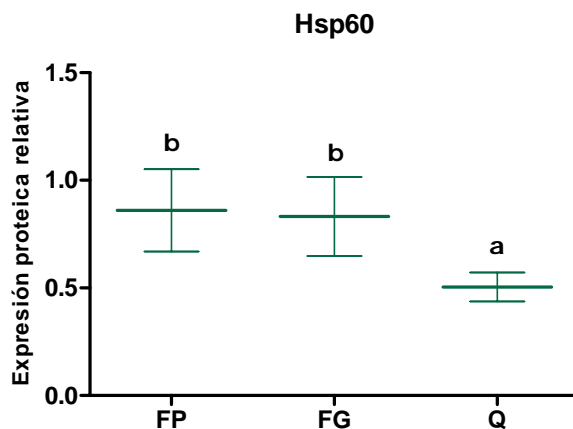


Figura 91. Densidad Óptica Integrada relativa a β -actina para Hsp60, en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Folículos antrales pequeños, FG: grandes, Q: quísticos) provenientes de material de frigorífico. Diferentes letras indican diferencias significativas (promedio \pm DE; $p < 0,05$).

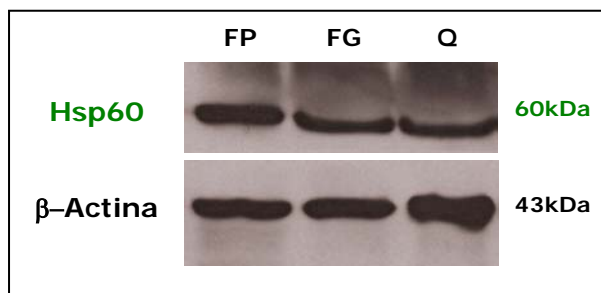


Figura 92: Placa radiográfica representativa de un Western Blot que muestra la expresión de Hsp60 en la pared folicular de folículos antrales pequeños (FP), grandes (FG), y quistes (Q) provenientes de material de frigorífico.

4.3.3 Hsp70

La cuantificación relativa de la proteína de golpe térmico Hsp70 a partir del inmunoblot, permitió comprobar que sus niveles están aumentados significativamente en pared de estructuras quísticas en comparación con el resto de los folículos antrales en crecimiento ($p < 0,05$). Al mismo tiempo, hubo una marcada tendencia de aumento de su expresión conforme avanzó la foliculogénesis (Figuras 93 y 94)

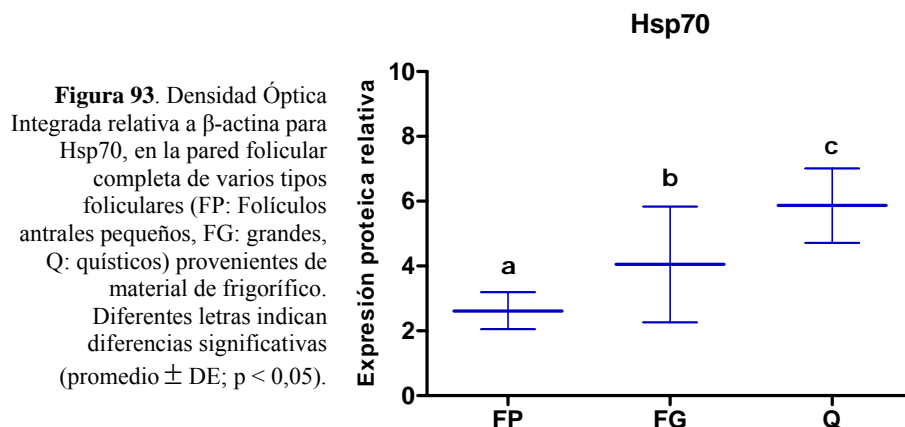
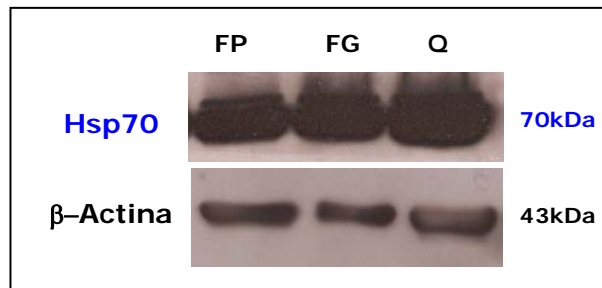


Figura 93. Densidad Óptica Integrada relativa a β -actina para Hsp70, en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Folículos antrales pequeños, FG: grandes, Q: quísticos) provenientes de material de frigorífico. Diferentes letras indican diferencias significativas (promedio \pm DE; $p < 0,05$).

Figura 94: Placa radiográfica representativa de un Western Blot que muestra la expresión de Hsp70 en la pared folicular de folículos antrales pequeños (FP), grandes (FG), y quistes (Q) provenientes de material de frigorífico.



4.3.4 Hsp90

La inmunodetección de la proteína de golpe térmico Hsp90 sobre las membranas de nitrocelulosa se realizó empleando un anticuerpo específico. A partir de las bandas reveladas en las placas radiográficas se observó que los niveles proteicos estuvieron aumentados significativamente en la pared folicular de los quistes (Figuras 95 y 96), en comparación con el resto de las estructuras; al mismo tiempo que folículos antrales pequeños y grandes no mostraron diferencias significativas entre sí.

Figura 95. Densidad Óptica Integrada relativa a β-actina para Hsp90, en la pared folicular completa de varios tipos foliculares (FP: Folículos antrales pequeños, FG: grandes, Q: quísticos) provenientes de material de frigorífico. Diferentes letras indican diferencias significativas (promedio \pm DE; $p < 0,05$).

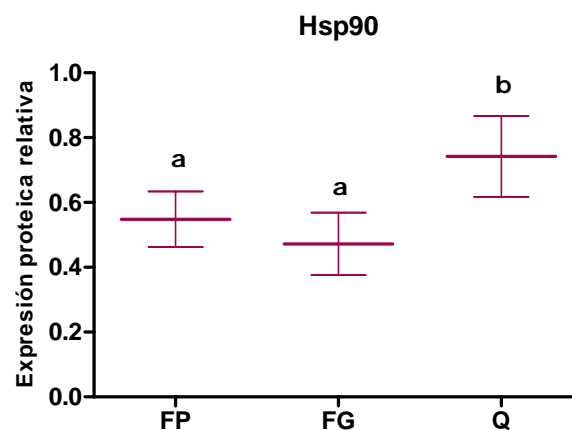
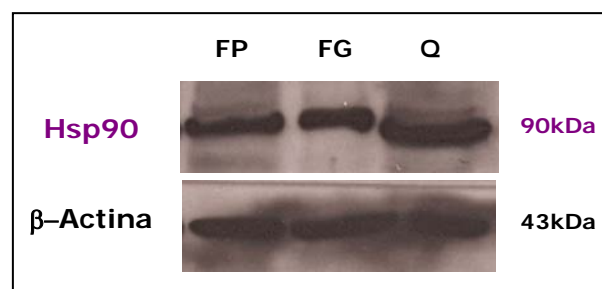


Figura 96: Placa radiográfica representativa de un Western Blot que muestra la expresión de Hsp90 en la pared folicular de folículos antrales pequeños (FP), grandes (FG), y quistes (Q) provenientes de material de frigorífico.



4.4 Evaluación de los niveles de ARNm de HSPs mediante RT-PCR.

4.4.1 Expresión de ARNm de HSPs en folículos provenientes de ovarios obtenidos en frigorífico.

Los ADNc generados a partir de las muestras de los folículos y empleados para el estudio de la expresión de ARNm de las HSPs, evidenciaron la presencia de un solo tipo de células de las que componen la pared de los folículos. Es decir, la amplificación de *Cyp19a1* a partir de los ADNc provenientes de células de la granulosa y de *Cyp17a1* de los ADNc provenientes de células de la teca, permitió la identificación de las muestras a utilizar y descartar aquellas que mostraron contaminación (ver sección 3.3.4).

Los niveles de ARNm de HSPs fueron evaluados en folículos antrales pequeños (< 5mm), medianos (6 - 10mm), grandes (> 10mm) y quísticos provenientes de ovarios obtenidos en frigorífico. La cantidad relativa de cada uno de ellos fue calculada en relación al producto de amplificación obtenido del gen de expresión constitutiva *GAPDH*.

4.4.1.1 Hsp10

Las Figuras 97A y 97B muestran respectivamente, la débil expresión de Hsp10 observada tanto en la granulosa como en células de la teca de quistes en relación al resto de las estructuras foliculares. Los mayores niveles de ARNm en granulosa fueron encontrados en folículos pequeños. En cambio en células de la teca, los folículos medianos y grandes expresaron niveles similares, y éstos fueron superiores a los encontrados en quistes ($p < 0,05$).

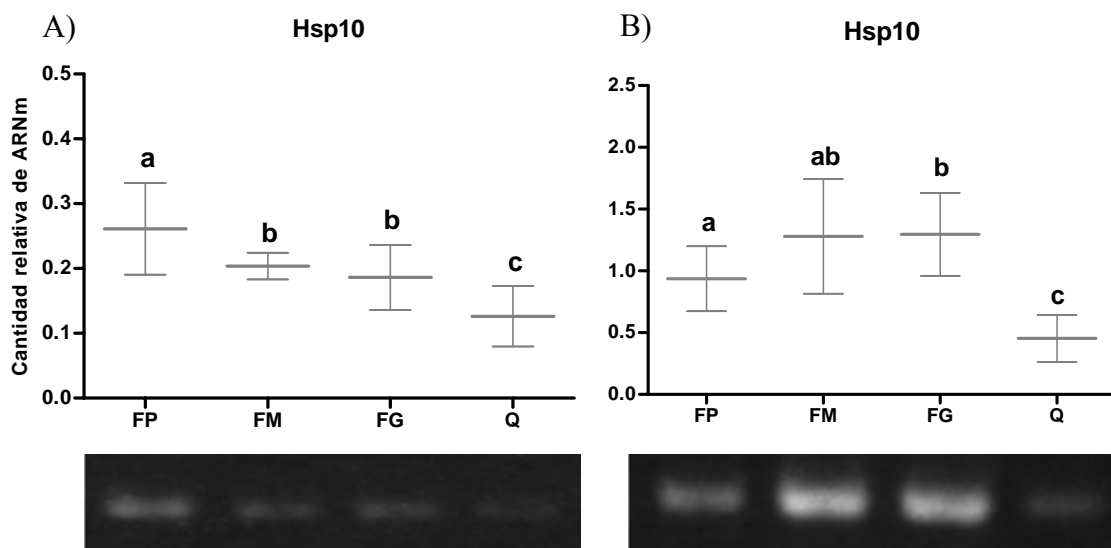


Figura 97. Niveles de ARNm de Hsp10/GAPDH, en células de la granulosa (A) y de la teca (B) en Folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (Q); todos provenientes de ovarios de frigorífico. Las bandas debajo de cada barra corresponden a la visualización en gel de agarosa al 2% de los amplificadores para cada caso. Diferentes letras indican diferencias significativas (promedio \pm DE).

4.4.1.2 Hsp27

La mayor cantidad relativa de transcritos de Hsp27 en células de la granulosa fue detectada en folículos pequeños y medianos, en comparación con el resto de las estructuras foliculares analizadas ($p < 0,05$). No hubo diferencias significativas entre las cantidades de ARNm cuantificados para quistes y folículos antrales grandes, en dicho estrato de células (Figura 98A).

Las células tecales de folículos antrales medianos mostraron niveles significativamente superiores de ARNm para Hsp27 a los hallados en las estructuras foliculares restantes ($p < 0,05$; Figura 98B). No hubo diferencias significativas entre quistes, folículos antrales pequeños y grandes, en cuanto a la expresión de dichos transcritos en esta capa de células.

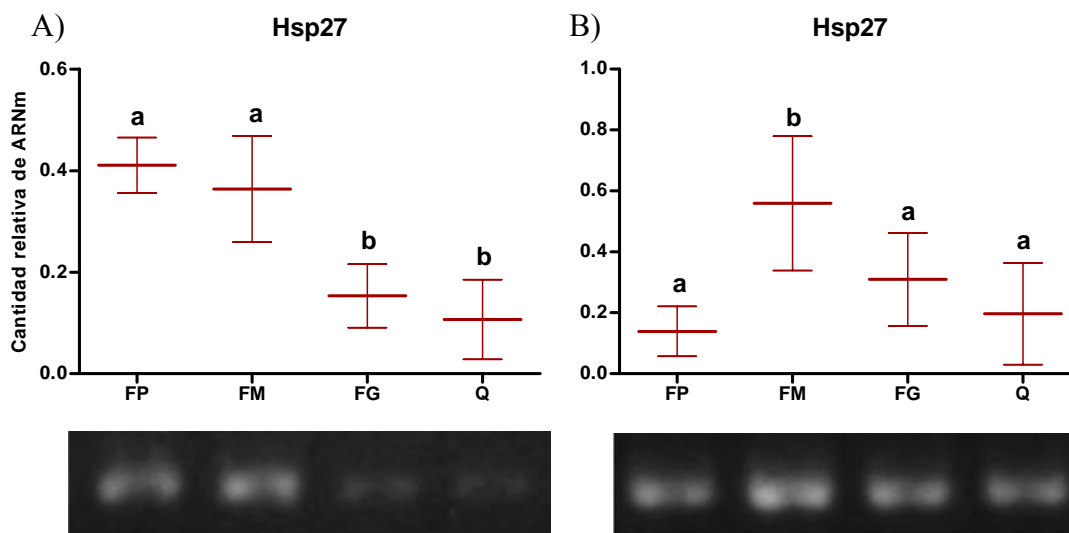


Figura 98. Niveles de ARNm de Hsp27/GAPDH, en células de la granulosa (**A**) y de la teca (**B**) en Folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (Q); todos provenientes de ovarios de frigorífico. Las bandas debajo de cada barra corresponden a la visualización en gel de agarosa al 2% de los amplificadores para cada caso. Diferentes letras indican diferencias significativas (promedio \pm DE).

4.4.1.3 Hsp40

Los quistes foliculares mostraron los menores niveles de expresión de ARNm correspondientes a Hsp40, tanto en células de la granulosa como de la teca respecto al resto de las estructuras foliculares estudiadas ($p < 0,05$; Figuras 99A y 99B, respectivamente).

Las cantidades relativas de transcritos de Hsp40 tanto a nivel de la granulosa como de la teca fueron similares entre las estructuras normales en desarrollo, no registrándose diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$).

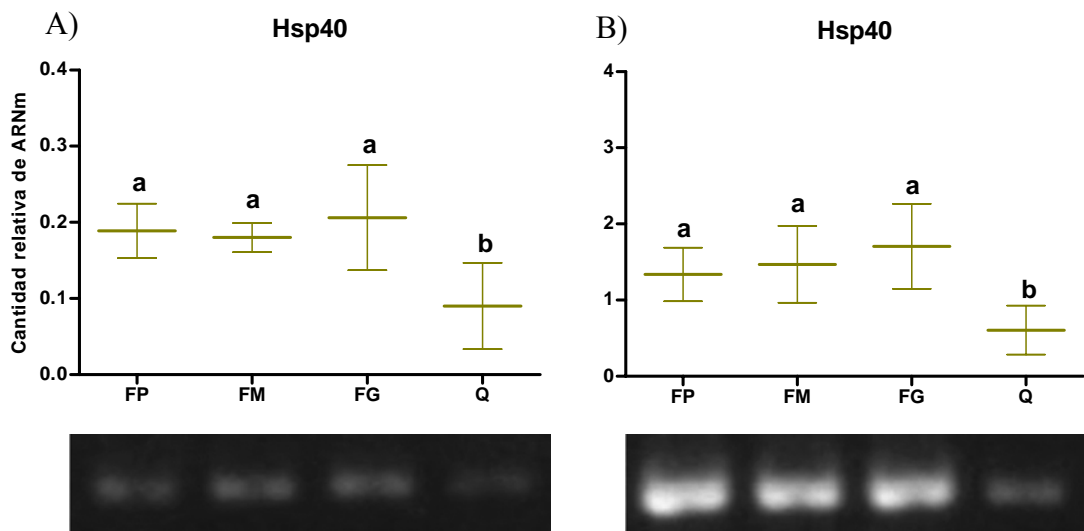


Figura 99. Niveles de ARNm de Hsp40/GAPDH, en células de la granulosa (A) y de la teca (B) en Folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (Q); todos provenientes de ovarios de frigorífico. Las bandas debajo de cada barra corresponden a la visualización en gel de agarosa al 2% de los amplificadores para cada caso. Diferentes letras indican diferencias significativas (promedio \pm DE).

4.4.1.4 Hsp60

Para el caso de Hsp60, los mayores niveles de expresión de ARNm en capas de la granulosa fueron observados en folículos antrales medianos (Figura 100A) respecto al resto de las estructuras evaluadas ($p < 0,05$)

Por otra parte, en células tecales, los transcritos correspondientes a Hsp60 se encontraron significativamente elevados en estructuras quísticas respecto al resto de las categorías foliculares estudiadas ($p < 0,05$). Los niveles de expresión hallados en las estructuras normales mostraron una tendencia a permanecer en cantidades constantes a lo largo del desarrollo folicular (Figura 100B).

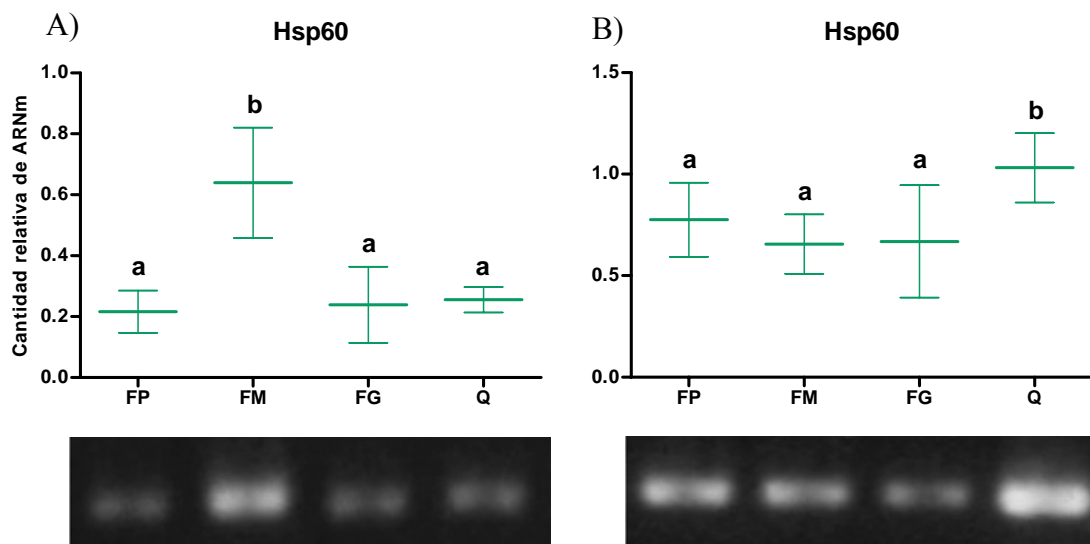


Figura 100. Niveles de ARNm de Hsp60/GAPDH, en células de la granulosa (**A**) y de la teca (**B**) en Folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (Q); todos provenientes de ovarios de frigorífico. Las bandas debajo de cada barra corresponden a la visualización en gel de agarosa al 2% de los amplificados para cada caso. Diferentes letras indican diferencias significativas (promedio \pm DE).

4.4.1.5 Hsp70

En células de la granulosa la expresión de ARNm de Hsp70 fue significativamente inferior en folículos antrales grandes respecto al resto de las estructuras estudiadas. Los folículos antrales pequeños y medianos mostraron niveles similares de estos transcritos y significativamente superiores a los hallados en el resto de las categorías foliculares. Por otro lado los quistes, se diferenciaron significativamente de todos los folículos normales, ya que evidenciaron niveles de transcritos intermedios a los hallados en folículos antrales grandes y medianos ($p < 0,05$; Figura 101A).

Las células de la teca de estructuras foliculares normales, en todas sus categorías, expresaron en mayor medida el ARNm correspondiente a Hsp70, que las estructuras quísticas. En efecto, los quistes fueron los que evidenciaron una expresión significativamente inferior en dicho estrato celular ($p < 0,05$; Figura 101B).

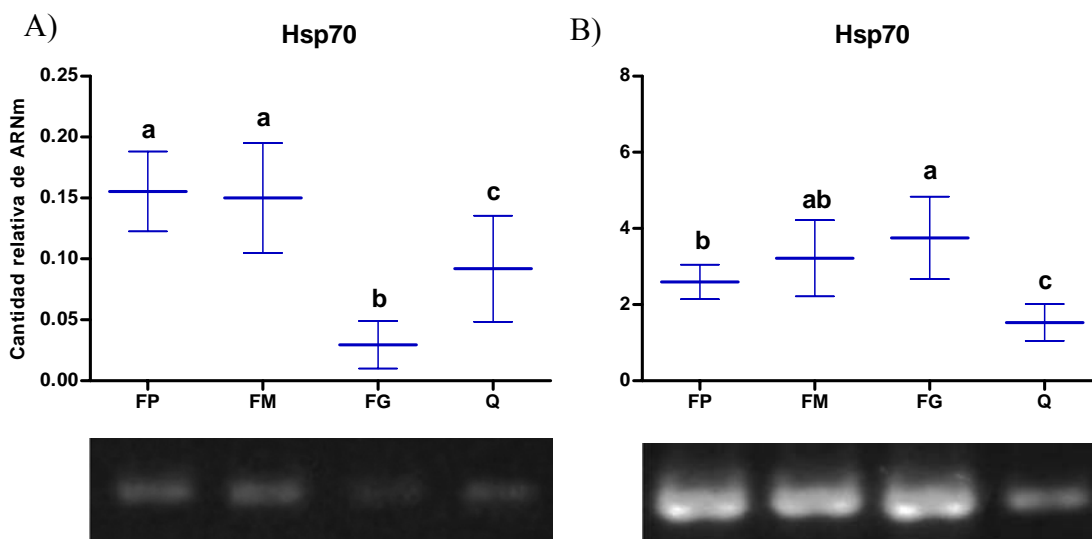


Figura 101. Niveles de ARNm de Hsp70/GAPDH, en células de la granulosa (A) y de la teca (B) en Folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (Q); todos provenientes de ovarios de frigorífico. Las bandas debajo de cada barra corresponden a la visualización en gel de agarosa al 2% de los amplificados para cada caso. Diferentes letras indican diferencias significativas (promedio \pm DE)

4.4.1.6 Hsp90 α

Los niveles de HSP90 α transcriptos en células de la granulosa fueron significativamente superiores en estructuras quísticas ($p < 0,05$), excepto en relación con folículos antrales pequeños (Figura 102A). Por otro lado, no hubo diferencias significativas en cuanto a la expresión de mensajeros de Hsp90 α en las estructuras foliculares normales entre sí ($p < 0,05$).

En células tecales, en cambio, se registró un leve aumento de dichos transcriptos en estructuras quísticas, pero esos niveles no fueron significativamente diferentes a los encontrados en folículos antrales medianos ($p < 0,05$; Figura 102B). Asimismo, en esta capa de células, los folículos antrales pequeños y grandes, fueron los que evidenciaron la menor cantidad relativa de ARNm de Hsp90 α .

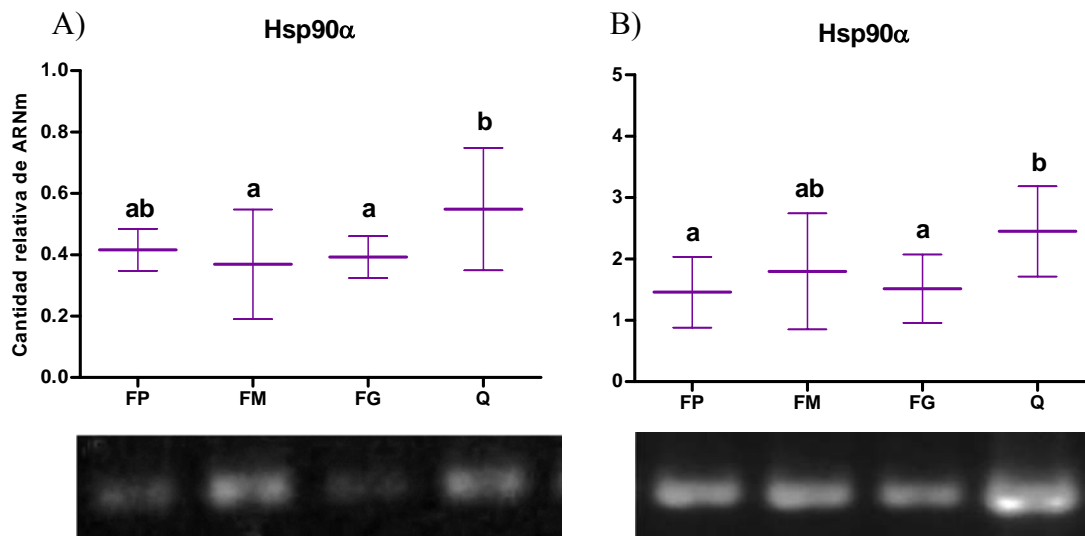


Figura 102. Niveles de ARNm de Hsp90 α /GAPDH, en células de la granulosa (A) y de la teca (B) en Folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (Q); todos provenientes de ovarios de frigorífico. Las bandas debajo de cada barra corresponden a la visualización en gel de agarosa al 2% de los amplificados para cada caso. Diferentes letras indican diferencias significativas (promedio \pm DE).

4.4.1.7 Hsp90 β

Las células de la granulosa de folículos antrales grandes y de quistes expresaron de manera significativamente inferior los ARNm de la proteína Hsp90 β en relación a las demás estructuras ($p < 0,05$; Figura 103A).

En células tecales, los niveles transcritos de Hsp90 β permanecieron constantes conforme avanzó la foliculogénesis normal. Sin embargo, las estructuras quísticas evidenciaron una expresión significativamente menor de dichos ARNm respecto a las demás ($p < 0,05$; Figura 103B).

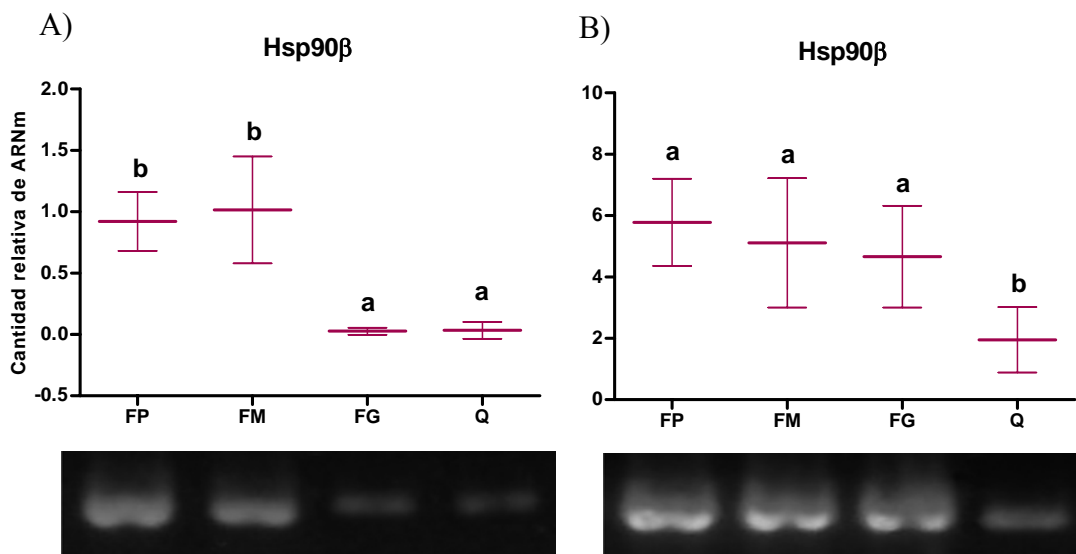


Figura 103. Niveles de ARNm de Hsp90β/GAPDH, en células de la granulosa (A) y de la teca (B) en Folículos antrales pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) y quísticos (Q); todos provenientes de ovarios de frigorífico. Las bandas debajo de cada barra corresponden a la visualización en gel de agarosa al 2% de los amplificadores para cada caso. Diferentes letras indican diferencias significativas (promedio \pm DE)

4.5 Enfermedad quística espontánea diagnosticada en animales en producción de establecimientos pecuarios.

La información recibida de varios productores 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 alimentación que recibieron, el número de pariciones y el estado reproductivo en el que se encontraban, para su análisis posterior.

Las imágenes de dichas ecografías permitieron visualizar la presencia de las estructuras quísticas ováricas tal como se muestra en la Figura 104.



Figura 104. Ultrasonografía de un ovario quístico de un animal en producción, con COD de desarrollo espontáneo. La estructura quística tiene un tamaño superior a 20 x 30mm.

4.5.1 Expresión de ARNm de HSPs en quistes espontáneos diagnosticados en animales en producción. .

A partir de las muestras obtenidas por aspiración folicular, se obtuvieron las células que forman parte de la pared folicular de los quistes y a partir de ellas se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de cada HSP en estudio.

Se trabajó con muestras de ADNc que provenían de ambos tipos celulares (teca y granulosa), verificándose en ellas la expresión tanto de *CyP19a1* como de *CyP17a1*. Por otro lado, también se emplearon muestras de ADNc en las que se comprobó la expresión de uno solo de los genes mencionados, lo que indicó en esos casos, que provenían sólo de células de la granulosa o sólo de células de la teca.

Los niveles de ARNm correspondientes a cada enzima (*CyP17a1* y *CyP19a1*) fueron normalizados en relación al gen de expresión constitutiva *GAPDH* en todos los casos (Figuras 105 y 106).

Los ADNc obtenidos a partir de los cuales no fue posible amplificar *GAPDH* no fueron empleados para la evaluación de la expresión de ARNm de HSPs, dada la imposibilidad de normalizar los datos.

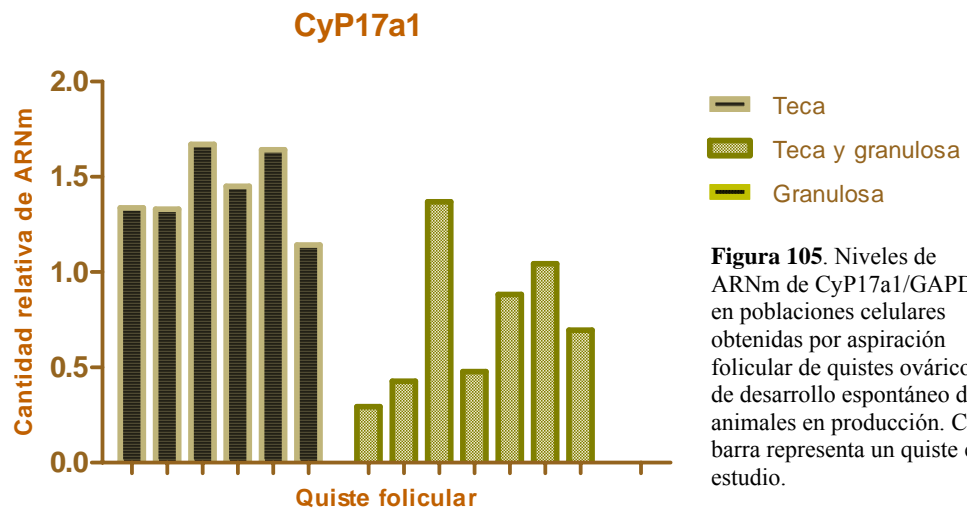


Figura 105. Niveles de ARNm de CyP17a1/GAPDH en poblaciones celulares obtenidas por aspiración folicular de quistes ováricos de desarrollo espontáneo de animales en producción. Cada barra representa un quiste en estudio.

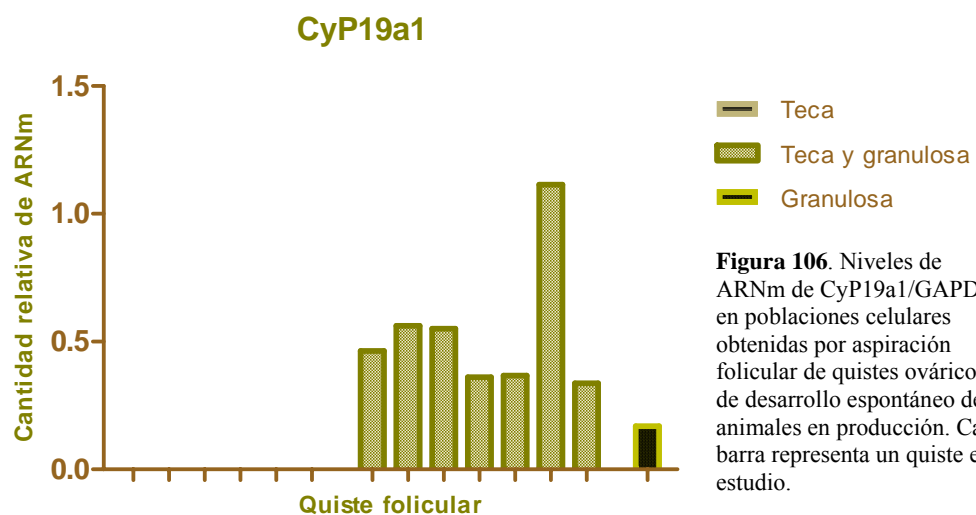


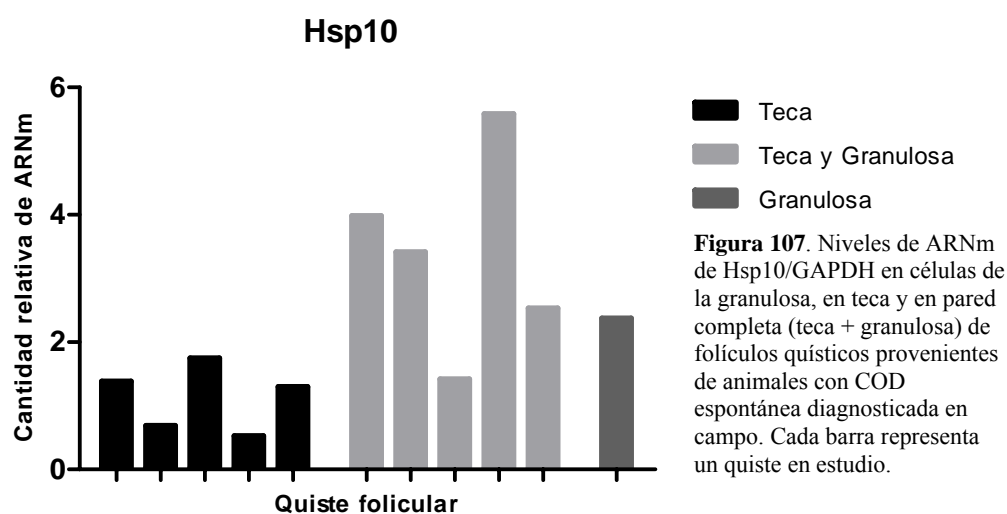
Figura 106. Niveles de ARNm de CyP19a1/GAPDH en poblaciones celulares obtenidas por aspiración folicular de quistes ováricos de desarrollo espontáneo de animales en producción. Cada barra representa un quiste en estudio.

Se lograron identificar 6 muestras de aspiración folicular de quistes que contenían sólo células de la teca; una sola muestra con células de la granulosa y 7 muestras que presentaron ambas poblaciones celulares de las que integran la pared de los quistes (teca + granulosa). A partir de ellas se procedió al estudio de la expresión de los ARNm de cada Hsp.

4.5.1.1 Hsp10

Las muestras de quistes foliculares evaluadas permitieron detectar positivamente los niveles de ARNm correspondientes a Hsp10 en cada una de ellas. Como se observa en la Figura 107, las células de la teca mostraron una tendencia a expresar en menor

medida dichos transcritos que las células de la granulosa. Sin embargo, de todos los quistes estudiados sólo uno de ellos permitió obtener células de la granulosa en ausencia de células de la teca, y en dicha muestra los niveles de ARNm para Hsp10 fueron inferiores a los hallados en muestras donde coexistieron ambas poblaciones celulares (teca + granulosa).



4.5.1.2 Hsp27

Los niveles de ARNm correspondientes a Hsp27 fueron positivamente detectados en todas las estructuras quísticas estudiadas así como también fue posible cuantificar relativamente su expresión en cada capa celular de la pared de los quistes.

Las muestras donde existieron ambas poblaciones celulares (teca + granulosa), los niveles de ARNm para Hsp27 mostraron una tendencia a ser superiores a los hallados en células de la teca e inferiores a los encontrados en capas de la granulosa (Figura 108).

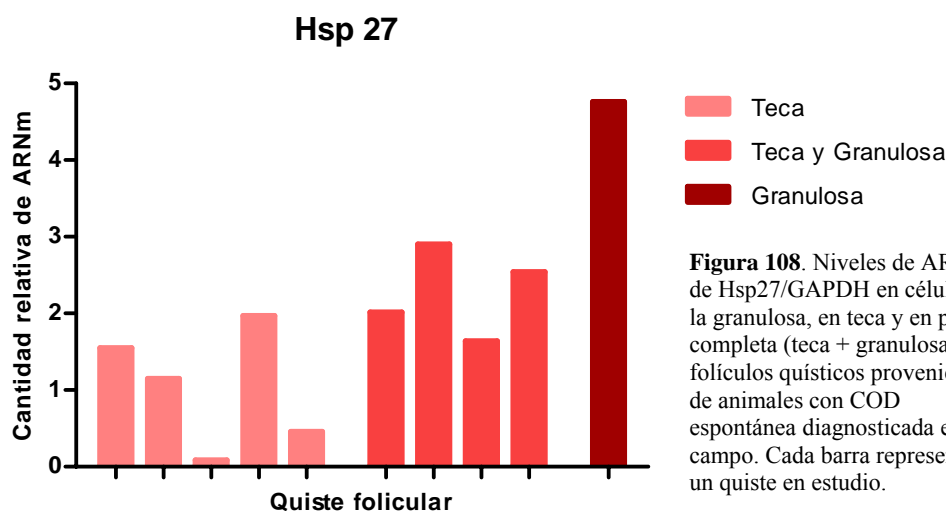


Figura 108. Niveles de ARNm de Hsp27/GAPDH en células de la granulosa, en teca y en pared completa (teca + granulosa) de folículos quísticos provenientes de animales con COD espontánea diagnosticada en campo. Cada barra representa un quiste en estudio.

4.5.1.3 Hsp40

Los transcritos cuantificados de Hsp40 en las muestras obtenidas por aspiración folicular de quistes, permitieron correlacionar los valores obtenidos entre muestras con poblaciones celulares mixtas (teca y granulosa) y aquellas que presentaron sólo un tipo de estas células. La Figura 109 permite inferir que los niveles de ARNm de Hsp40 fueron similares en ambos estratos celulares analizados individualmente, y que la suma entre ellos se correspondió aproximadamente con los niveles obtenidos en muestras de pared completa de quistes (teca + granulosa).

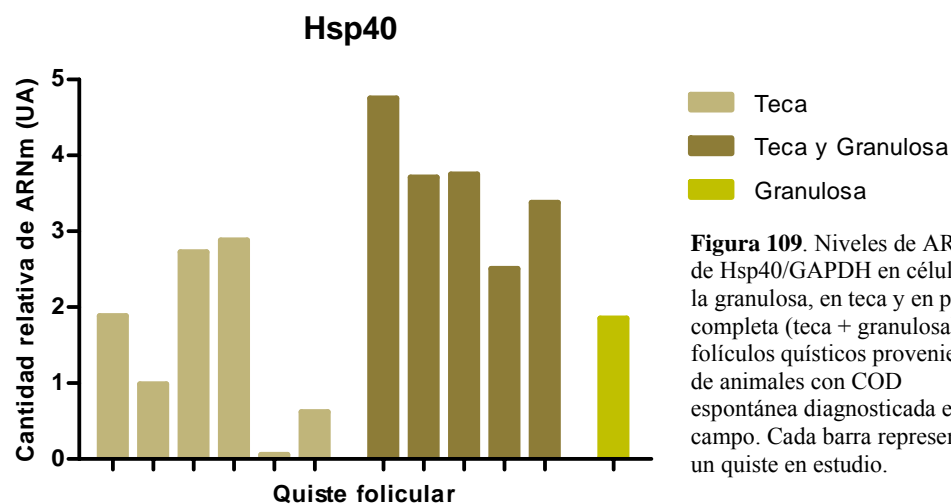
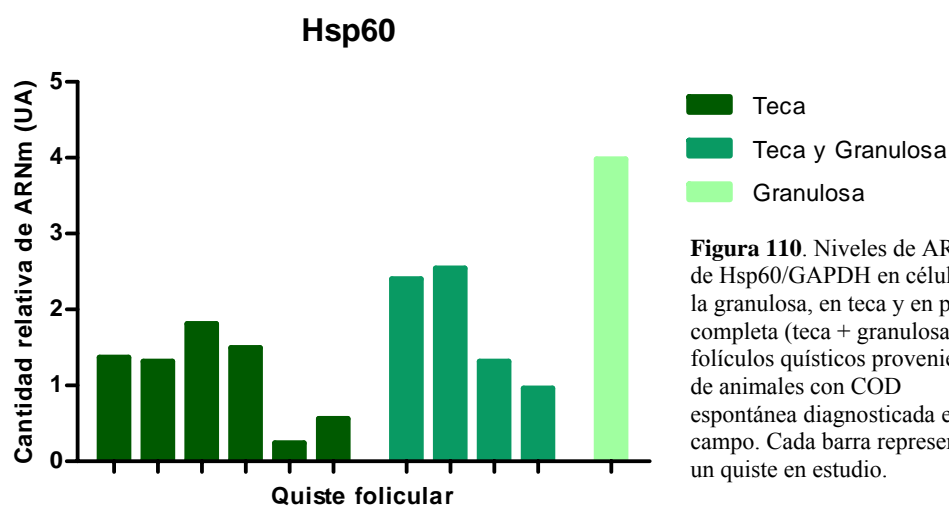


Figura 109. Niveles de ARNm de Hsp40/GAPDH en células de la granulosa, en teca y en pared completa (teca + granulosa) de folículos quísticos provenientes de animales con COD espontánea diagnosticada en campo. Cada barra representa un quiste en estudio.

4.5.1.4 Hsp60

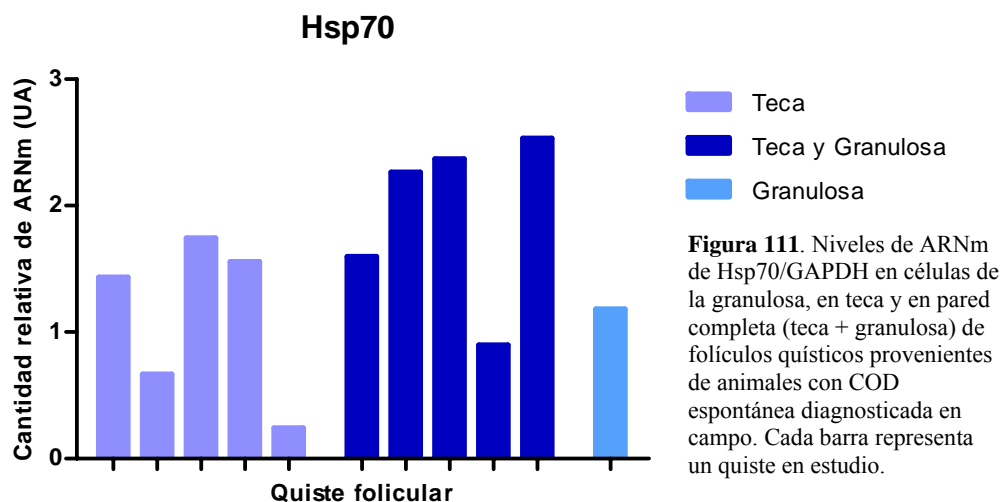
Las estructuras foliculares quísticas mostraron niveles transcritos menores de Hsp60 en capas de la teca respecto a los observados en células de la granulosa. Las muestras de aspiración folicular de quistes con poblaciones celulares mixtas (teca + granulosa), evidenciaron cantidades de ARNm de Hsp60 similares a las encontradas en células de la teca, mientras que la única muestra con únicamente células de la granulosa mostró niveles del ARNm para Hsp60 superiores a todos las demás (Figura 110).



4.5.1.5 Hsp70

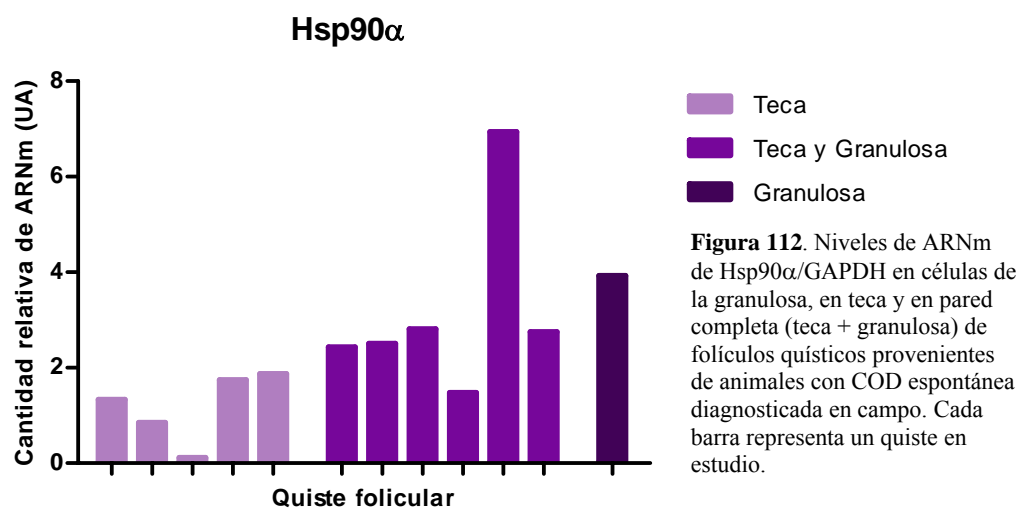
Las muestras de aspiración folicular que evidenciaron la presencia de ambos tipos de células (teca + granulosa) mostraron los mayores niveles de ARNm correspondientes a Hsp70.

El estudio de la expresión de dichos transcritos en cada uno de los estratos celulares por separado permitió observar que su expresión es aproximadamente similar entre células de la teca y células de la granulosa (Figura 111).



4.5.1.6 Hsp90 α

La cuantificación de los mensajeros correspondientes a Hsp90 α permitió comprobar que los mismos tienden a expresarse en menor medida en teca que en granulosa de quistes, ya que se notó un leve aumento en capas de la granulosa respecto a la anterior. No obstante el mayor nivel de dichos transcritos fue observado en aquellas muestras donde coexistieron ambos tipos celulares (Figura 112).



4.5.1.7 Hsp90 β

La evaluación meramente descriptiva de los resultados obtenidos al cuantificar los ARNm de Hsp90 β , permitió inferir que los niveles encontrados en células de la granulosa de quistes parecen ser superiores a los hallados en capas de células tecales, así como las poblaciones celulares mixtas mostraron un leve aumento de la expresión respecto a la observada en teca (Figura 113).

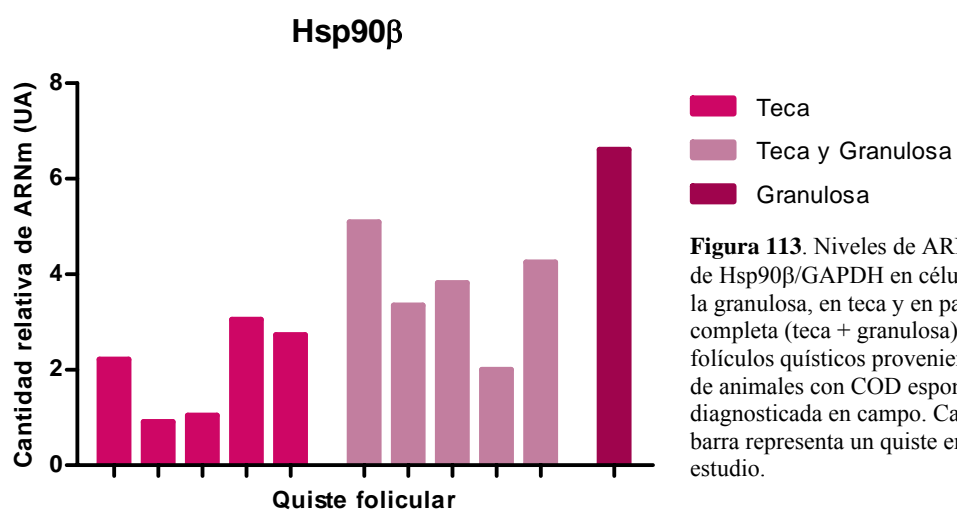


Figura 113. Niveles de ARNm de Hsp90 β /GAPDH en células de la granulosa, en teca y en pared completa (teca + granulosa) de folículos quísticos provenientes de animales con COD espontánea diagnosticada en campo. Cada barra representa un quiste en estudio.

DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

5.1 Expresión de HSPs en la foliculogénesis normal y en animales con COD espontánea e inducida.

Los organismos vivos, han desarrollado una variedad de estrategias para reparar los daños y/o eliminar los componentes dañados de sus sistemas. La respuesta a altas temperaturas y a condiciones de estrés, es parte de la contrapartida celular para mantener la homeostasis en esas condiciones adversas. De lo contrario, pueden ocurrir defectos en la síntesis y estructura proteica, reorganización del citoesqueleto, cambios en el metabolismo, proliferación celular, y modificaciones en la fluidez de la membrana celular (Sonna y col., 2002; Arya y col., 2007).

Se ha demostrado que las altas temperaturas pueden afectar los procesos reproductivos a través de alteraciones en la proliferación y la apoptosis de células ováricas, así como también inducir la hipersecreción de hormonas esteroideas desde esta glándula. Ensayos realizados en cultivos de células ováricas, demostraron la capacidad de las hormonas folículo estimulante (FSH), leptina e IGF-I de contrarrestar los efectos inducidos por el estrés térmico en cuanto a la apoptosis, la proliferación y la actividad secretoria celular (Sirotkin, 2010). En este contexto, se podría inferir que las HSPs formarían parte de la respuesta funcional a hormonas y neurotransmisores inducidos por el estrés. En efecto, existen reportes que indican que controlan las funciones hormonales y viceversa (Driancourt y col., 1999; Jayachandran y Miller, 2002; Bombardier y col., 2009). Diversos autores han llevado a cabo estudios con el fin de conocer el vínculo entre la expresión de HSPs en el ovario y su participación en la regulación de la actividad reproductiva de individuos sometidos a estrés (Guzeloglu y col., 2001; Maniwa y col., 2005; Velázquez y col., 2010; Sirotkin y Bauer, 2011).

En el presente estudio, se evaluó la expresión de diferentes HSPs en el ovario bovino normal así como su significancia en la enfermedad quística ovárica. Considerando que la COD generalmente se desarrolla en condiciones de estrés de los animales, las HSPs podrían ser elementos claves en la activación de las vías de respuesta al estrés en las que están involucradas.

En cuanto a las variaciones de los niveles de ARNm de Hsp10 durante la foliculogénesis normal, los resultados de este trabajo se condicen con los hallados por Fan y col. (2009) en folículos de humanos y de ratón cultivados *in vitro*. Ellos

reportaron que esta proteína se expresa notablemente en todas las células que componen los folículos antrales de dichas especies, a diferencia de lo que ocurre en los estadios preantrales donde se la detectó sólo en ovocito. Para el caso del bovino, los hallazgos efectuados en folículos antrales pequeños, medianos y grandes en relación a los ARNm de Hsp10, confirmaron lo observado por estos autores.

Trabajos previos han demostrado que el rol de esta chaperona se extiende más allá de su colaboración con Hsp60 en el plegamiento de otras proteínas (Summers y col., 1998; Capello y col., 2004). Más aún, se le ha adjudicado una importante contribución en la síntesis de colágeno (Black y col., 2000) debido al aumento significativo en la producción del mismo por parte de osteoblastos cuando son tratados con Hsp10 (Mansell y col., 2002). Recientemente, ensayos realizados con ratones knock-out para esta proteína, demostraron que está implicada en la inhibición de la apoptosis de células de la granulosa, cuando es inducida experimentalmente *in vitro* con cisplatino (Ling y col., 2011). Teniendo en cuenta estos reportes, y que los resultados de este estudio mostraron los mayores niveles de transcripto en estructuras foliculares normales respecto a los quistes, se podría inferir que Hsp10 estaría implicada en el sustento del desarrollo folicular normal y la supervivencia de los folículos en crecimiento.

En cuanto a su participación en la enfermedad, los menores niveles de ARNm de Hsp10 se hallaron en capas de la granulosa y en células de la teca de folículos quísticos espontáneos, respecto al resto de las categorías foliculares analizadas. Al respecto, Ma y col. (2007) reportaron bajos niveles de dicha proteína en todos los tipos de células que integran los folículos de mujeres con síndrome ovárico poliquístico (PCOS), respecto a la expresión detectada en ovarios normales.

Estudios previos han confirmado que los quistes foliculares en bovinos presentan bajos índices de apoptosis (Isobe y Yoshimura, 2000a; Salvetti y col., 2010). Los bajos niveles de ARNm de Hsp10 encontrados en los quistes, hacen pensar que esta proteína no participaría de manera relevante en la inhibición de la apoptosis celular en ovarios con esta enfermedad, sino que dichos eventos estarían supeditados al accionar de otros factores antiapoptóticos mayormente decisivos en la cascada de señalización, como son los de la familia Bcl-2, u otras proteínas de respuesta al estrés como Hsp27 o Hsp70 (Cascales Angosto, 2003; Beere, 2005; Salvetti y col., 2010).

Las funciones de Hsp27 han sido abordadas por diferentes autores y se refieren a su interacción con receptores esteroides y especialmente a la protección de las células contra la muerte celular programada (Ciocca y col., 1993; Morimoto, 1998; Garrido y col., 2001; Beere, 2005; Rayner y col., 2010). En el presente trabajo se observó mayor inmunomarcación en células de la granulosa de quistes espontáneos respecto a todas las demás categorías foliculares evaluadas provenientes de muestras obtenidas en frigorífico. En base a estos resultados y sabiendo que la alteración del balance proliferación/apoptosis está asociada a la ocurrencia de quistes foliculares (Isobe y Yoshimura, 2007; Ortega y col., 2008; Salvetti y col., 2010), podría entenderse esta expresión aumentada de Hsp27 en quistes, como un posible mecanismo para la inhibición de la apoptosis celular, lo que permitiría la persistencia en el tiempo de dichas estructuras. La participación de Hsp27 a diferentes niveles de la cascada de señalización apoptótica, fue ampliamente descrita por Beere (2005) y se relaciona principalmente con su capacidad para impedir la translocación del factor Bid a la mitocondria y la consecuente liberación de citocromo c desde esta organela.

La inmunodetección de la proteína en muestras del modelo experimental, mostró que existen cantidades similares de Hsp27 en granulosa de quistes inducidos a las encontradas en estructuras foliculares en desarrollo, provenientes de los mismos ovarios quísticos. Esta similitud también se observó a nivel de la teca, entre los quistes y los folículos antrales. Posiblemente, los cambios en la funcionalidad ovárica y el desbalance entre los eventos de proliferación/apoptosis que ocurren durante la enfermedad quística de bovinos (Isobe y Yoshimura, 2007; Salvetti y col., 2010), ejerzan efectos en todos los estadios de la foliculogénesis en el ovario que desarrolla la enfermedad bajo los efectos de la ACTH. Esta podría ser la razón por la que los quistes y las estructuras en desarrollo de los mismos ovarios, presentaron niveles similares de la proteína de 27 kDa, comprometida en los mecanismos de muerte celular programada.

Se observó claramente que las variaciones en la expresión de Hsp27 en muestras provenientes del modelo experimental, no reprodujeron en su totalidad lo que ocurrió en muestras obtenidas en frigorífico. Al respecto, tal como mencionaron previamente otros autores (Calder y col., 2001; Vanholder y col., 2006), existen variables que se desconocen acerca de los animales que desarrollaron COD de manera espontánea, tales como su balance energético, la aplicación de tratamientos hormonales previos,

trastornos en la alimentación, situaciones de estrés y otras variables ambientales a las que pudieron estar sometidos previamente a ser sacrificados.

Por otro lado, el estudio de la expresión de ARNm de Hsp27 en capas de la granulosa, permitió verificar que los quistes espontáneos mantuvieron los niveles iguales a los folículos antrales grandes de ovarios sanos obtenidos en frigorífico. Sin embargo dichos valores fueron significativamente inferiores a los hallados en folículos antrales medianos y pequeños. En células de la teca, en cambio, un incremento significativo en la expresión de Hsp27 fue detectado en folículos antrales medianos, respecto al resto de las categorías estructurales analizadas.

Los resultados obtenidos mediante técnicas de WB, donde se analizó la pared folicular completa, sólo son comparables con los valores proteicos cuantificados mediante IHQ para folículos terciarios (antrales), ya que debido a su tamaño macroscópicamente observable, son los únicos que pueden ser extraídos del ovario para su análisis. En efecto, estas estructuras foliculares obtenidas del ovario, fueron clasificadas en folículos antrales pequeños y grandes de acuerdo a su dependencia a las gonadotropinas (Ginther y col., 2001) para las técnicas de WB. Los folículos antrales pequeños mostraron valores similares a los de los quistes, tal como ocurrió al analizar las capas de la teca por IHQ. Si bien en las capas de la granulosa no se observó lo mismo, estas diferencias pueden deberse a que, el escaso número de células de la granulosa presente en los quistes pueden ser claramente identificadas en las técnicas microscópicas mientras que por WB se pierde esa posibilidad de saber con qué población celular se cuenta de cada estrato (Braw-Tal y Yossefi, 1997).

Los niveles de ARNm correspondientes a la proteína de golpe térmico de 40 kDa mostraron una expresión significativamente disminuida en los quistes respecto al resto de las categorías foliculares evaluadas. No existen reportes hasta el momento referidos a la implicancia de Hsp40 en trastornos anovulatorios en bovinos como la enfermedad quística ovárica. Sin embargo, ha sido descripta su participación en la PCOS en humanos, donde su expresión estuvo disminuida en ovarios de mujeres con la enfermedad (Jones y col., 2011).

Se ha reportado en estudios previos que Hsp40 está involucrada, en cooperación con Hsp70, en la inhibición de la translocación de Bax a la mitocondria, inhibiendo de esta manera la consecuente señalización hacia la muerte de la célula (Gotoh y col.,

2004). Beere (2004) reforzó estas observaciones y afirmó que, si bien las HSPs pueden funcionar de manera independiente, la interacción cooperativa con sus respectivas co-chaperonas probablemente haría más eficiente su actividad. En este sentido se pudo observar que hubo una correlación entre la baja expresión de ARNm de Hsp40 en folículos quísticos en este trabajo y los bajos niveles de ARNm para Hsp70 hallados también en dichas estructuras, lo que indicaría una posible correspondencia entre los transcritos de ambas proteínas (Velázquez y col., 2011).

En cuanto a la especie bovina, un trabajo reciente de Tang y col. (2010) estuvo enfocado al estudio de Hsp40 en la encefalopatía espongiiforme bovina y su participación en la patogenia de la misma. Ellos pudieron confirmar que Hsp40 y Hsp70 son genes que se sobreexpresan de manera conjunta en respuesta al estrés que sufre la célula en tales condiciones, lo que se condice con la similitud encontrada entre sus ARNm en el presente estudio.

En el contexto de la reproducción, HSP60, HSP70 y HSP90 son las familias más importantes. Dentro de ellas, Hsp60 es expresada de manera constitutiva, así como también inducida bajo condiciones de estrés (Neuer y col., 2000). Respecto a su desempeño como chaperona, actúa conjuntamente con Hsp10 en el interior de la mitocondria, asistiendo en el correcto plegamiento de otras proteínas (Garrido y col., 2001). Algunos autores han descripto su presencia a nivel de la superficie celular (Soltys y Gupta, 1997) así como también otras localizaciones extracelulares tales como: líquido folicular de pacientes que recibieron fertilización *in vitro* (Neuer y col., 1997); fluido peritoneal de mujeres con endometriosis (Kligman y col., 1996) y sangre periférica (Capello y col., 2008).

En el presente trabajo se encontró la mayor inmunomarcación de Hsp60 en quistes espontáneos respecto al resto de las categorías foliculares provenientes de muestras obtenidas en frigorífico, tanto en capas de la granulosa como de la teca. Son escasos los reportes acerca de la participación de esta proteína en la foliculogénesis normal; sin embargo estudios realizados en ovarios prepuberales de ratas, mostraron intensa marcación con anti-Hsp60 de los ovocitos de folículos primordiales y folículos antrales en crecimiento (Paranko y col., 1996). Esto permitió demostrar que estas células activas están provistas de elementos claves, necesarios para el correcto plegamiento e importación de proteínas mitocondriales, dentro de los cuales podría

incluirse Hsp60 (Paranko y col., 1996). Además, en ese mismo trabajo, los autores encontraron que las células tecaes de folículos preovulatorios y células del cuerpo lúteo se marcaron más intensamente que el resto de las estructuras analizadas.

En el presente estudio, la inmunodetección de Hsp60 en muestras del modelo experimental permitió corroborar que en células de la granulosa la expresión proteica se mantuvo constante a lo largo del desarrollo de los folículos en ovarios quísticos, y esos niveles fueron similares a los hallados en los quistes inducidos. Sin embargo en la capa de células de la teca, esta proteína se marcó significativamente de manera más intensa en los folículos terciarios, respecto a folículos secundarios y quísticos de ovarios con enfermedad inducida.

Por otro lado, se detectó que los folículos en crecimiento de ovarios de animales controles del modelo experimental se inmunomarcaron con la misma intensidad que los quistes inducidos, tanto en teca como en granulosa. Estos resultados, tomados de manera conjunta con los anteriores, nos permiten inferir que la foliculogénesis estaría regulada y presentaría características similares en cuanto a la expresión de Hsp60 en ovarios de animales controles y en ovarios con enfermedad quística inducida, al menos en estadios tempranos de la enfermedad. Sin embargo, se observaron diferencias al comparar estos resultados con los obtenidos a partir de muestras recolectadas en frigorífico. En efecto, el escaso conocimiento sobre el tiempo de persistencia de la estructura quística en los animales destinados a faena y de otras variables que podrían estar involucradas en la manifestación de la enfermedad, aumentan la probabilidad de encontrar disparidades entre lo que ocurre en quistes inducidos y espontáneos de esta procedencia. Probablemente por ello las diferencias en cuanto a la expresión de Hsp60 que fueron notables entre estructuras foliculares normales y quísticas en muestras obtenidas en frigorífico, no se reprodujeron al estudiar el modelo experimental.

Aunque mediante WB no se observaron los mismos niveles de expresión para Hsp60 que los cuantificados por IHQ, las diferencias se podrían explicar teniendo en cuenta que en esta última técnica se evalúan separadamente los cambios dentro de cada capa de células de la pared folicular; mientras que en los ensayos de WB se trabaja con pared completa, lo que puede estar enmascarando algunas diferencias entre las categorías foliculares (Velázquez y col., 2010). Además, debe sumarse que al homogeneizar los tejidos para las técnicas de WB, las proporciones relativas de cada

componente tisular, así como su solubilidad y la influencia de las proteínas extracelulares no son las mismas en teca y granulosa, tal como se mencionó anteriormente.

El análisis de la expresión de ARNm de Hsp60, evidenció los niveles más elevados en células de la granulosa de folículos medianos respecto al resto de las categorías foliculares y quistes, de ovarios obtenidos en frigorífico. En cambio, en células tecales, los niveles fueron superiores en folículos terciarios y quísticos (Velázquez y col., 2011). Estos resultados se condicen con la detección de esta proteína realizada por inmunohistoquímica en células de la teca, donde la mayor marcación se visualizó también en los quistes (Velázquez y col., 2010).

Las funciones principales de Hsp60, están relacionadas con la estabilización de receptores de esteroides (Edwards y col., 1992; Smith y Toft, 1993; Shan y col., 2003), con la fertilidad (Werner y col., 1997; Neuer y col., 1997) y en los últimos años se ha reconocido su accionar en el mantenimiento de la homeostasis, dada su capacidad de conectar los componentes del sistema inmune (Quintana y Cohen, 2011). En este sentido, sabiendo que la ovulación se caracteriza por la manifestación típica de una reacción inflamatoria (Espey, 1994), las proteínas de golpe térmico mitocondriales y nucleares como Hsp60 y Hsp90 (Ohsako y col., 1995; Paranko y col., 1996) podrían desempeñar importantes funciones en el mantenimiento de la actividad metabólica y la supervivencia de los ovocitos durante los estadios de desarrollo folicular. En efecto, la expresión aumentada de ARNm de Hsp60 observada en granulosa de folículos medianos podría estar en relación con dicha capacidad de Hsp60.

La mayor inmunomarcación de Hsp70 se encontró en células de la granulosa de quistes, observándose en los estadios de desarrollo folicular normal un claro aumento de la misma conforme avanzó la foliculogénesis, en el caso de muestras obtenidas en frigorífico. También se pudo corroborar por WB este aumento de expresión en pared folicular completa de dichas estructuras. En relación con estos reportes, Maniwa y col. (2005) encontraron altos niveles de Hsp70 en líquido folicular de quistes bovinos. Ellos reconocieron que aunque no está completamente dilucidada cuál es la asociación entre las condiciones de estrés y el aumento de esta proteína en líquido folicular de quistes, la sobreexpresión de la misma provocó una disminución de la apoptosis celular en teca interna de estas estructuras. Sin embargo, los quistes espontáneos estudiados en el

presente trabajo evidenciaron niveles intermedios de Hsp70 a nivel de la teca, en relación al resto de las estructuras foliculares evaluadas (Velázquez y col., 2010).

Otros trabajos han confirmado que Hsp70 está intensamente expresada en células de la granulosa cultivadas *in vitro* de folículos ováricos humanos (Benifla y col., 2002); en ovocitos y células del cúmulo ovífero de bovinos (Edwards y Hansen, 1997) y en células de la granulosa de folículos de ratas (Yoon y col., 2002). Además, trabajos realizados previamente demostraron que Hsp70 se expresa de manera aumentada en quistes de ratas con enfermedad inducida por exposición a luz permanente respecto a los niveles hallados en el grupo control de dicho ensayo (Salveti y col., 2009). Estos resultados se correlacionaron con los observados en bovinos en el presente estudio, para el caso de células de la granulosa (Velázquez y col., 2010).

La capacidad para inhibir la apoptosis ha sido ampliamente reconocida como una de las funciones más importantes de Hsp70 (Beere, 2005). Conjuntamente con Hsp27, pueden bloquear o neutralizar interacciones de factores proapoptóticos impidiendo que se complete el mecanismo de señalización que lleva a la muerte celular programada (Garrido y col., 2003). En este sentido, si bien la modulación de la apoptosis vía Hsp70 es a nivel del factor proapoptótico Bid, su accionar indirectamente estaría impidiendo la activación de caspasa 3, hacia el final de la cascada de señalización (Gabai y col., 2002). Al respecto, reportes recientes mostraron que existen bajos niveles de caspasa 3 en folículos quísticos de vacas con COD respecto a folículos atrésicos (Salveti y col., 2010). Estos resultados tomados en conjunto, indican que podría existir en bovinos una asociación entre los altos niveles proteicos de Hsp70 en estructuras quísticas y los bajos índices de apoptosis celular encontrados en ellas como consecuencia del impedimento de la activación de caspasa 3.

Otras funciones descritas para Hsp70 están en relación con su actividad como chaperona, ya que participa en el ensamblaje y tráfico de receptores de esteroides así como en la esteroidogénesis (Khanna y col., 1995; Liu y Stocco, 1997; Pratt y Toft, 1997). Hurd y col. (2000) han reportado que Hsp70 se une al receptor nuclear de estrógeno α (RE α), actuando como coactivador y modulando su actividad en células tumorales de glándula mamaria. Por otro lado, estudios realizados en líneas celulares de endometrio humano han evidenciado la regulación ejercida por los estrógenos a la que están sometidos Hsp70 y el factor involucrado en su transcripción (Tang y col., 1995).

Asimismo en un trabajo realizado en oviducto de rata, se demostró que el porcentaje de células que expresaban Hsp70 tendió a disminuir durante el estro y a aumentar durante el diestro. A su vez, estos cambios se correspondieron con las variaciones observadas en dicho tejido para la expresión del RE α (Mariani y col. 2000). Los reportes en bovinos en cuanto a la expresión de RE α demostraron que los folículos quísticos espontáneos presentaron una elevación considerable de los niveles del mismo en ambas capas foliculares, en relación a las demás categorías estudiadas (Salveti y col., 2007). Esto permitiría suponer que la cantidad relativa de Hsp70 encontrada en estas estructuras en el presente estudio, estaría en relación con su participación en la modulación de la actividad de dichos receptores.

Asimismo, varios inhibidores de la síntesis de progesterona inducida por la LH y agentes luteolíticos estimulan la expresión de Hsp70. Esto refuerza la teoría de la participación de esta proteína como mediadora en la inhibición de la esteroideogénesis (Khanna y col., 1995). En este sentido, se han realizado estudios en ovario de rata normal y con COD inducida donde se observó que folículos atrésicos y quísticos presentaban bajos índices de proliferación y altos niveles de expresión de la Hsp70. Al mismo tiempo, fueron detectados niveles elevados de esta proteína en folículos quísticos cuando los niveles de expresión de RE β y receptores de progesterona (RP) fueron bajos. De esta manera, dado que la proliferación celular en los folículos en crecimiento sería una de las principales respuestas a esteroides, se podría suponer que la Hsp70 actuaría inhibiendo estos efectos (Salveti y col., 2009).

Con respecto a los resultados obtenidos a partir del modelo experimental, se pudo observar que los folículos provenientes de animales del grupo control se inmunomarcaron de manera similar a los quistes inducidos, no habiendo diferencias significativas con respecto a los últimos, ni a nivel de la teca ni de la granulosa. Sin embargo, el análisis de la expresión proteica de Hsp70 dentro del grupo de animales inducidos tanto en capas de la granulosa como de la teca, mostró que los niveles están aumentados en las estructuras quísticas respecto al resto de las categorías foliculares provenientes de esos mismos ovarios con COD. Estos resultados se correlacionaron con los descriptos previamente para muestras obtenidas en frigorífico.

La menor cantidad relativa de ARNm de Hsp70 se encontró en folículos quísticos respecto al resto de las categorías foliculares, en células de la teca. En este

sentido varios autores han reportado que los mecanismos regulatorios de Hsp70 muestran una aparente discordancia entre transcripción y traducción. Es decir, la activación transcripcional de los genes de Hsp70 es independiente de la síntesis proteica (Wu y col., 1986; Hensold y col., 1990; Bruce y col., 1993). A esto se deben probablemente las diferencias entre los niveles proteicos y los de ARN mensajeros observados en dichas estructuras.

La inmunomarcación para la proteína Hsp90 en muestras provenientes de frigorífico, mostró una distribución similar a la observada para Hsp70 en muestras de la misma procedencia. Los quistes espontáneos fueron las estructuras que mayormente expresaron esta proteína, tanto a nivel de la granulosa como de la teca. El rol de esta proteína como potencial reguladora de la expresión génica, ha sido reconocido en función de su capacidad de asociarse con receptores de hormonas esteroideas cuando éstos se encuentran libres de su ligando, evitando su unión al ADN (Beato, 1989; Tsai y Steinberger, 1982; Smith, 1993; Pratt y Toft, 1997). Para tal función, Hsp90 parece formar un heterocomplejo con otras proteínas y cochaperonas, tales como Hsp70, Hop (Proteína organizadora de HSPs), Hsp40 y p23 (Pratt y Toft, 2003). En este sentido, la correlación encontrada entre los niveles proteicos de Hsp70 y Hsp90 podría explicarse teniendo en cuenta dicha función ejercida de manera conjunta en la estabilización de los receptores. Al respecto, estudios realizados *in vitro* estuvieron enfocados en evaluar cuál era el efecto de la administración de agentes capaces de unirse a Hsp90, sobre la funcionalidad del receptor de estrógenos en células tumorales de mama T47D. En ese trabajo, los autores observaron que la presencia de drogas como Geldamicina y Radicol producía la desestabilización de dichos receptores (en su estado no unido a ligando) llevando a una marcada depleción de sus niveles en el tiempo, lo cual impedía su interacción a nivel del ADN (Bagatell y col., 2001).

Para el caso de muestras provenientes del modelo experimental, no hubo diferencias entre folículos de ovarios controles y folículos quísticos de animales inducidos en cuanto a la expresión de Hsp90. Sin embargo, al comparar estructuras foliculares todas provenientes de ovarios con COD inducida se pudieron identificar en granulosa niveles similares en quistes y folículos terciarios (antrales). Éstos fueron inferiores a los encontrados en estructuras preantrales. Al respecto, es importante destacar que en trabajos previos se ha reportado que Hsp90 puede ser expresada de

manera constitutiva en células somáticas y germinales del ovario (Curci y col., 1991; Ben-Ze'ev y Ámsterdam, 1989; Guzeloglu y col., 2001) así como también puede ser encontrada en el líquido folicular de bovinos (Driancourt y col., 1999). Asimismo, Ohsako y col. (1995) a partir de un trabajo realizado en roedores, demostraron que durante el desarrollo folicular, la inmunodetección de Hsp90 fue notable tanto en ovogonias como en ovocitos de ratas prepuberales.

Los resultados referidos a la expresión de transcritos correspondientes a las dos isoformas de Hsp90 (α y β) mostraron una baja expresión de los ARNm de Hsp90 β en quistes foliculares provenientes de frigorífico y un aumento notable de la cantidad de los correspondientes a Hsp90 α . En concordancia con estos resultados, en un trabajo previo se encontraron bajos niveles de RE β en dichas estructuras (Salvetti y col., 2010), razón por la cual podría suponerse que los efectos hormonales estarían supeditados a la presencia de dicha isoforma para la estabilización del receptor correspondiente. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Powell y col. (2010) quienes demostraron la implicancia crítica de Hsp90 en la actividad transcripcional de los homodímeros de RE β . Asimismo, el aumento de ARNm de Hsp90 detectado en los quistes espontáneos, se correspondió con los niveles proteicos detectados por IHQ en dichas estructuras y con los resultados obtenidos por WB. También se correlacionó la expresión tanto proteica como transcripcional de Hsp90 α obtenidas en el presente estudio, con los reportes anteriormente mencionados en relación a RE α , los que evidenciaron también niveles aumentados en quistes de bovinos con enfermedad espontánea (Salvetti y col., 2007, 2010). En función de esto y sabiendo que la proliferación de los folículos en crecimiento en proestro es dependiente de hormonas esteroideas sexuales, se podría pensar que la falta de cantidades apropiadas de dichos receptores estaría en relación a la falta de regulación por parte de proteínas asociadas, tales como Hsp90 y Hsp70, requeridas para su funcionalidad (Bagchi y col., 1991; Pratt y Toft, 1997; Powel y col., 2010). Tales circunstancias podrían interrumpir o desregular la foliculogénesis normal llevando a alteraciones reproductivas tales como persistencia folicular y COD (Taft y col., 1996; Pettersson y col., 1997; Lingenfelter y col., 2007).

5.2 Expresión de transcritos de HSPs en quistes espontáneos diagnosticados en animales de producción.

La posibilidad de contar con muestras provenientes de animales de establecimientos pecuarios con diagnóstico de COD de desarrollo espontáneo permitió recabar datos referentes a la historia clínica de estos animales, como por ejemplo la alimentación que recibieron, medidas de manejo, número de pariciones, tratamientos previos, persistencia de la/s estructura/s anovulatoria/s y estado energético; antes de proceder al estudio de la enfermedad quística. Esta información es de gran importancia al momento de establecer asociaciones entre la actividad reproductiva de los animales y los trastornos anovulatorios y permitiría esclarecer aspectos relacionados a su patogenia. Nuevos estudios están siendo encaminados en este sentido.

En el presente trabajo se analizaron de manera descriptiva muestras obtenidas por aspiración folicular provenientes de quistes espontáneos diagnosticados en distintos establecimientos de la zona, con el fin de identificar y comparar la expresión de HSPs en las células recuperadas en el líquido folicular. Fue posible identificar en algunas muestras, la combinación de células de la granulosa y de la teca. De la misma manera en otras, existieron únicamente células de la granulosa o únicamente células de la teca.

En las muestras obtenidas por aspiración folicular, la expresión de ARNm de Hsp10 mostró una tendencia a ser similar en granulosa y en teca de los quistes estudiados; y las muestras que presentaron ambas poblaciones celulares, reflejaron niveles aumentados respecto a los observados en cada capa de células por separado. Se ha descrito previamente que esta proteína está expresada en bajos niveles de todos los tipos celulares de ovarios poliquísticos de humanos (Ma y col., 2007). Sin embargo en bovinos, los reportes respecto a la expresión de transcritos de Hsp10 han estado basados en muestras obtenidas en frigorífico (Velázquez y col., 2011), por lo que son escasas las referencias existentes respecto a la participación de Hsp10 en la enfermedad quística ovárica en la especie, más aún en lo que respecta a modelos experimentales de la misma.

Los niveles proteicos de Hsp27, en cambio, fueron estudiados previamente en quistes de ovarios obtenidos en frigorífico (Velázquez y col., 2010), y también en muestras del modelo experimental de inducción (datos no publicados). En relación a ello, en este trabajo se cuantificaron los niveles ARNm de Hsp27 en muestras de aspiración folicular de quistes espontáneos diagnosticados en animales en producción. En dichas muestras, fue posible detectar ARNm de Hsp27 en ambas poblaciones

celulares de los quistes espontáneos de animales en producción, tal como ocurrió al trabajar con quistes de ovarios obtenidos en frigorífico (Velázquez y col., 2011).

En el caso de Hsp40, si bien son escasos los reportes respecto a su expresión en órganos reproductivos (Jones y col., 2011; Velázquez y col., 2011), se ha podido confirmar en este trabajo que sus transcriptos son detectables en quistes espontáneos de animales en producción con COD. Al respecto, los niveles de ARNm de Hsp40 expresados en células de la granulosa y de la teca, evaluando cada una de las capas separadamente, se correlacionaron con los niveles encontrados en muestras que poseían conjuntamente ambos tipos celulares.

Previamente se han podido describir los niveles de ARNm correspondientes a Hsp60 en ovarios sanos y con enfermedad quística espontánea en bovinos sacrificados en frigorífico. Se encontró que las células de la teca de los quistes expresaban en mayor medida dichos transcriptos que las capas de la granulosa de los mismos (Velázquez y col., 2011). Sin embargo, en este trabajo se abordó también el estudio de la expresión de estos ARNm en muestras de aspiración folicular de quistes espontáneos diagnosticados en animales en producción. Los resultados obtenidos reflejaron la presencia de ARNm para Hsp60 tanto en capas de la granulosa como de la teca de quistes, no habiendo correlación exacta entre los niveles encontrados en cada tipo celular por separado y los hallados en muestras con ambas poblaciones celulares. Más aún, pareció existir una tendencia a que la expresión detectada en estas últimas muestras se corresponda con los niveles encontrados en teca.

Los ARNm de Hsp70 encontrados en capas de la granulosa y de la teca en los quistes espontáneos de animales en producción, mostraron una mejor correlación que la observada para Hsp60. Las muestras con ambos tipos celulares evidenciaron niveles de ARNm de Hsp70 representativos de lo observado en cada capa de células por separado. Sin embargo, a diferencia de lo previamente observado en quistes obtenidos en frigorífico donde la expresión de dichos ARNm fue mayor en la teca folicular (Velázquez y col., 2011), en muestras de aspiración folicular se encontraron niveles aparentemente similares para ambas capas de la pared de los quistes.

Ambas isoformas de Hsp90 (α y β) fueron evaluadas en cuanto a la expresión de sus ARNm en muestras obtenidas en frigorífico, lo que permitió describir su participación en la foliculogénesis normal como en la enfermedad (Velázquez y col.,

2011). A su vez, el análisis de muestras obtenidas por aspiración folicular de los quistes diagnosticados en animales de campo, permitió identificar una cierta tendencia de aumento de los ARNm de la isoforma β en relación a los de la isoforma α en ambas capas foliculares de los quistes. Sin embargo, estos resultados no concordaron con lo hallado en quistes de animales sacrificados en frigorífico, ya que en ellos la expresión de ARNm de Hsp90 α fue superior a los niveles encontrados de los correspondientes a Hsp90 β , tanto en capas de la granulosa como de la teca.

La importancia de trabajar con muestras de procedencia conocida, así como la posibilidad de obtener información de aspectos tales como el estado reproductivo, la edad de los animales, la alimentación y el tiempo de persistencia de las estructuras anovulatorias, permitirá en futuros estudios esclarecer mejor el origen y los factores determinantes de la enfermedad quística ovárica en el bovino.

CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal analizar el impacto de la implementación de un sistema de gestión de la calidad (SGC) en una empresa manufacturera. Se exploran los aspectos teóricos y prácticos de la implementación, así como los desafíos y beneficios asociados. El estudio se basa en una metodología cualitativa que incluye entrevistas y análisis de documentos. Los resultados indican que la implementación exitosa de un SGC requiere un compromiso sólido de la alta dirección, recursos adecuados y una cultura organizacional que favorezca la mejora continua. Se concluye que, aunque la implementación puede ser un proceso complejo y costoso, los beneficios a largo plazo en términos de eficiencia, satisfacción del cliente y reducción de costos justifican la inversión.

6. CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis y su relación con los reportes de otros autores permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

1- Los niveles proteicos de Hsp27, Hsp60, Hsp70 y Hsp90 fueron claramente detectables en todos los estadios de desarrollo folicular ovárico bovino. Más aún, la expresión proteica presentó variaciones a lo largo de la foliculogénesis y estos patrones de expresión se diferenciaron de los encontrados en ovarios con enfermedad quística ovárica tanto inducida como espontánea.

2- Hsp27 y Hsp70, proteínas implicadas en la inhibición de los mecanismos de apoptosis, estuvieron sobreexpresadas en estructuras quísticas espontáneas. Para el caso de Hsp60 los ensayos a partir de ovarios obtenidos en frigorífico permitieron confirmar que se expresa mayormente en quistes, mientras que su ARNm parece estar elevado en granulosa de folículos antrales medianos confirmando lo hallado previamente por otros autores. Por su parte, la inmunodetección de Hsp90 mostró similitudes a lo encontrado para Hsp70, y esta correlación en los niveles de expresión podría explicarse teniendo en cuenta las funciones compartidas que cumplen dichas chaperonas.

3- Los transcriptos cuantificados correspondientes a Hsp10, Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 α y Hsp90 β evidenciaron diferencias en cuanto a su expresión entre estructuras foliculares normales y quistes foliculares. En cuanto a las variaciones de Hsp10 durante la foliculogénesis normal, los mayores niveles se observaron en folículos antrales con respecto a los quistes foliculares; lo que se condice con los hallazgos de otros autores en folículos de humanos y de ratón. Los ARNm correspondientes a las Hsp27, Hsp40 y Hsp70 se expresaron de manera similar en la granulosa de los quistes, ya que en todos los casos sus niveles fueron inferiores a los encontrados en folículos antrales pequeños y medianos. La expresión de ARNm de Hsp60 en células de la teca coincidió con los niveles aumentados de la proteína encontrados en quistes espontáneos. Sin embargo, en la granulosa, la mayor expresión de ARNm para Hsp60 se encontró en folículos antrales medianos. Por otra parte, los resultados referidos a la expresión de ARNm para las dos isoformas de Hsp90 (α y β) mostraron una baja expresión de los correspondientes a Hsp90 β en quistes foliculares

provenientes de frigorífico y un aumento notable en dichas estructuras de la cantidad de ARNm para Hsp90 α .

4- Se han podido establecer relaciones entre algunas de las proteínas estudiadas en la presente tesis (HSPs) y variables descriptas previamente por otros autores como partícipes de la enfermedad quística ovárica en bovinos. En este sentido, proteínas tales como Hsp27, Hsp70, Hsp40 podrían estar involucradas en el desbalance de los eventos de proliferación/apoptosis existente en las estructuras quísticas, inhibiendo a diferentes niveles la muerte celular programada y favoreciendo de esta manera la persistencia de las mismas. Asimismo, las isoformas Hsp90 α /Hsp90 β mostraron estar relacionadas con los niveles de expresión de los RE α y RE β , mediante lo cual se corroboró la implicancia de las HSPs mencionadas en la foliculogénesis normal y en alteraciones de la misma.

5- El modelo experimental utilizado permite el estudio y conocimiento de aspectos difíciles de abordar trabajando con muestras provenientes de animales que presentaron la enfermedad de manera espontánea. Sin embargo, hubo diferencias entre el modelo utilizado y los casos espontáneos de quistes obtenidos en frigorífico, lo que podría explicarse por la alta variabilidad de las muestras de dicha procedencia y la falta de información respecto a los animales de los cuales provinieron estas muestras. El trabajo con animales de establecimientos pecuarios que desarrollaron la enfermedad espontáneamente y de los cuales se conoce la historia clínica, podría ayudar a establecer y fijar mayor cantidad de variables tales como estado corporal, balance energético, tratamientos previos, etc., que se relacionen con la patogenia de la enfermedad quística ovárica en el bovino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, G.P.; Jaiswal, R.; Singh, J. y Malhi, P. (2008) *Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle*. Theriogenology 69: 72–80.

Alfaro, N.S.; Salvetti, N.R.; Velazquez, M.M.; Stangaferro, M.L.; Rey, F. y Ortega, H.H. (2011) *Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease*. Res. Vet. Sci. En prensa.

Amweg, A.N.; Paredes, A.H.; Salvetti, N.R.; Lara, H.E. y Ortega, H.H. (2011) *Expression of melanocortin receptors mRNA, and direct effects of ACTH on steroids secretion in the bovine ovary*. Theriogenology. 75: 628-637.

Armstrong, D.G.; Baxter, G.; Hogg, C.O. y Woad, K.J. (2002) *Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine pre-antral follicles*. Reproduction 123: 789-797.

Arya, R.; Mallik, M. y Lakhotia, S.C. (2007) *Heat shock genes – integrating cell survival and death* J. Biosci. 32: 595–610.

Asea, A. (2005) *Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72*. Exerc. Immunol. Rev. 11: 34–45.

Bagatell, R.; Khan, O.; Paine-Murrieta, G.; Taylor, C.W.; Akinaga, S. y Whitesell, L. (2001) *Destabilization of steroid receptors by heat shock protein 90-binding drugs: a ligand-independent approach to hormonal therapy of breast cancer*. Clin. Cancer Res. 7: 2076-2084.

Bagchi, M.K.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.J. y O'Malley, B.W. (1991) *Progesterone enhances target gene transcription by receptor free of heat shock proteins hsp90, hsp56, and hsp70*. Mol. Cell Biol. 11: 4998-5004.

Banerji, U.; Walton, M.; Raynaud, F.; Grimshaw, R.; Kelland, L.; Valenti, M.; Judson, I. y Workman, P. (2005) *Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitor 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in human ovarian cancer xenograft models*. Clin. Cancer Res. 11: 7023-7032.

Bao, B. y Garverick, H.A. (1998) *Expression of steroidogenic enzyme and gonadotrofin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review*. J. Anim. Sci. 76: 1903-1921.

Baravalle, C.; Salvetti, N.R.; Mira, G.A.; Lorente, J.A. y Ortega, H.H. (2007) *Role of ACTH in the pathogenesis of Polycystic Ovarian Syndrome in the rat: hormonal profiles and ovarian morphology*. Physiol. Res. 56: 67-78.

Bartlett, P.C.; Ngategize, P.K.; Kaneene, J.B.; Kirk, J.H.; Anderson, S.M. y Mather, E.C. (1986) *Cystic follicular disease in Michigan Holstein-Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology and economic impact*. Prev. Vet. Med. 4: 15-33.

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*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227: 1409-1414.

Basu, S.; Binder, R.J.; Suto, R.; Anderson, K.M. y Srivastava, P.K. (2000) *Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway*. Int. Immunol. 12: 1539-1546.

Battaglia, D.F.; Krasa, H.B.; Padmanaban, V.; Viguie, C. y Karsch, F.J. (2000) *Endocrine alterations that underlie endotoxin mediated disruption of the follicular phase in ewes*. Biol. Reprod. 62, 45-53.

- Beam, S.W. (1995) *Follicular development in postpartum cattle: effects of energy balance and dietary lipid*. PhD dissertation, Cornell University, p. 124–136.
- Beam, S.W. y Butler, W.R. (1999) *Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows*. J. Reprod. Fertil. Suppl. 54: 411–424.
- Beato, M. (1989) *Gene regulation by steroid hormones*. Cell. 56: 335-44.
- Beere, H.M. (2004) *'The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis*. J. Cell Sci. 117: 2641-2651.
- Beere, H.M. (2005) *Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways*. J. Clin. Invest. 115: 2633–2639.
- Beere, H.M.; Wolf, B.B.; Cain, K.; Kuwana, T.; Taylor, P.; Morimoto, R.I.; Cohen, G. y Green, D.R. (2000) *Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the apaf-1 apoptosome*. Nat. Cell Biol. 2: 469–475.
- 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.
- Benifla, J.L.; Sifer, C.; Bringuier, A.F.; Blanc-Layrac, G.; Camus, E.; Madelenat, P. y Feldmann, G. (2002) *Induced apoptosis and expression of related proteins in granulosa cells from women undergoing IVF: a preliminary study*. Hum. Reprod. 17: 916–920.
- Ben-Ze'ev, A. y Amsterdam, A. (1989) *A regulation of heat shock protein synthesis by gonadotropins in cultured granulosa cells*. Endocrinology 124: 2584–2594.
- Black, A.J.; Topping, J.; Durham, B.; Farquharson, R.G. y Fraser W.D. (2000) *A detailed assessment of alterations in bone turnover, calcium homeostasis, and bone density in normal pregnancy*. J. Bone Miner. Res. 15: 557–563.

- Blake, M.J.; Buckley, D.J. y Buckley, A.R. (1993) *Dopaminergic regulation of heat shock protein-70 expression in adrenal gland and aorta*. *Endocrinology* 132: 1063-1070.
- Bodensteiner, K.J.; Wiltbank, M.C.; Bergfelt, D.R. y Ginther, O.J. (1996) *Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles*. *Theriogenology*. 45: 499-512.
- Bombardier, E.; Vigna, C.; Iqbal, S.; Tiidus, P.M. y Tupling, A.R. (2009) *Effects of ovarian sex hormones and downhill running on fiber-type-specific HSP70 expression in rat soleus*. *J. Appl. Physiol.* 106: 2009–2015
- 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: 713–21.
- Bosu, W.T.K. 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.
- Braw-Tal, R. y Yossefi, S. (1997) *Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary*. *J. Reprod. Fertil.* 109: 165-171.
- Brinker, A.; Pfeifer, G.; Kerner, M.J.; Naylor, D.J.; Hartl, F.U. y Hayer-Hartl, M. (2001) *Dual function of protein confinement in chaperonin assisted protein folding*. *Cell* 107: 223–233.
- Brown, D.D.; Christine, K.S.; Showell, C. y Conlon, F.L. (2007) *Small heat shock protein Hsp27 is required for proper heart tube formation*. *Genesis* 45: 667–678.
- Bruce, J.L.; Price, B.D.; Coleman, N. y Calderwood, S.K. (1993) *Oxidant injury rapidly activates the heat shock transcription factor but fails to increase levels of heat shock proteins*. *Cancer Res.* 53: 12–15.

- Bukau, B. y Horwich A.L. (1998) *The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines*. Cell 92: 351–666.
- Bukau, B.; Weissman, J. y Horwich, A. (2006) *Molecular chaperones and protein quality control*. Cell 125: 443–451.
- Butler, W.R. (1997) *Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle*. Anim. Reprod. Sci. 60-61: 449-457.
- Byers, M.; Kuiper, G.G.J.M.; Gustafsson, J-Å. y Park-Sarge, O-K. (1997) *Estrogen receptor- β mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins*. Mol. Endocrinol. 11: 172–182.
- 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.
- Calderwood, S.K.; Khaleque, M.A.; Sawyer, D.B. y Ciocca D.R. (2006) *Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis*. Trends Biochem. Sci. 31: 164-172.
- Calderwood, S.K.; Mambula, S.S. y Gray, P.J., Jr. (2007) *Extracellular Heat Shock Proteins in Cell Signaling and Immunity*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1113: 28–39.
- Canfield, R.W. y Butler, W.R. (1990) *Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle*. Domest. Anim. Endocrinol. 7: 323-330.
- Cappello, F.; Tripodo, C.; Farina, F.; Franco, V. y Zummo, G. (2004) *Hsp10 selective preference for myeloid and megakaryocytic precursors in normal human bone marrow*. Eur. J. Histochem. 48: 261-266.

Cappello, F.; Conway de Macario, E.; Marasà, L.; Zummo, G. y Macario, A.J. (2008) *Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy*. *Cancer Biol. Ther.* 7: 801-809.

Cardozo, C.P.; Michaud, C.; Ost, M.C.; Fliss, A.E.; Yang, E.; Patterson, C.; Hall, S.J. y Caplan, A.J. (2003) *C-terminal Hsp-interacting protein slows androgen receptor synthesis and reduces its rate of degradation*. *Arch. Biochem. Biophys.* 410: 134-140.

Carrie're, P.D.; Amaya, D. y Lee, B. (1995) *Ultrasonography and endocrinology of ovarian dysfunction in heifers with estradiol valerate*. *Theriogenology* 43: 1061–1076.

Cascales Angosto M. (2003) *Bases moleculares de la apoptosis*. *Anal. Real Acad. Nal. Farm.* 69: 36-64.

Catalani, E.; Amadori, M.; Vitali, A.; Bernabucci, U.; Nardone, A. y Lacetera, N. (2010) *The Hsp72 response in peri-parturient dairy cows: relationships with metabolic and immunological parameters*. *Cell Stress Chaperon.* 15: 781–790.

Ciocca, D.R.; Oesterreich, S.; Chamness, G.C.; McGuire, W.L. y Fuqua, S.A.W. (1993) *Heat shock protein 27,000 (hsp27): biological and clinical implications*. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1558-1570.

Ciocca, D.R.; Stati, A.O.; Fanelli, M.A. y Gaestel, M. (1996) *Expression of heat shock protein 25,000 in rat uterus during pregnancy and pseudopregnancy*. *Biol. Reprod.* 54: 1326-1335.

Clarke, I.J. y Cummins, J.T. (1985) *GnRH pulse frequency determines LH pulse amplitude by altering the amount of releasable LH in the pituitary glands of ewes*. *J. Reprod. Fertil.* 73: 425-431.

Concannon, C.G.; Gorman, A.M. y Samali, A. (2003) *On the role of Hsp27 in regulating apoptosis* *Apoptosis* 8: 61–70.

- Cook, D.L.; Smith, C.A.; Parfet, J.R.; Youngquist, R.S.; Brown, E.M. y Garverick, H.A. (1990) *Fate and turnover of ovarian follicular cysts in dairy cattle*. J. Reprod. Fertil. 90: 37–46.
- Curci, A.; Bevilacqua, A.; Mangia, F. (1987) Lack of heat-shock response in preovulatory mouse oocytes. Dev Biol 123: 154-160.
- Curci, A.; Bevilacqua, A.; Fiorenza, M.T. y Mangia, F. (1991) *Developmental regulation of heat-shock response in mouse oogenesis: identification of differentially responsive oocyte classes during Graafian follicle development*. Dev. Biol. 144: 362–368.
- Czarnecka A.M.; Campanella, C.; Zummo, G. y Cappello F. (2006) *Heat shock protein 10 and signal transduction: a ‘capsula eburnea’ of carcinogenesis?* Cell Stress Chaperon. 11: 287–294.
- Day, M.L. y Anderson L.H. (1998) *Current concepts on the control of puberty in cattle*. J. Anim. Sci. 76: 1–15.
- Day, N. (1991) *The treatment and prevention of cystic ovarian disease*. Vet. Med. 86: 761–766.
- De Silva, M. y Reeves, J.J. (1988) *Hypothalamic-pituitary function in chronically cystic and regularly cycling dairy cows*. Biol. Reprod. 38: 264–269.
- Díaz, T. (1999) *Dinámica del desarrollo folicular ovárico durante el ciclo estral en el bovino*. Rev. Fac. Cien. Vet. UCV 40: 3-18.
- Diskin, M.G.; Mackey, D.R.; Roche, J.F. y Sreenan, J.M. (2003) *Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle*. Anim. Reprod. Sci. 78: 345 – 370.

- Dobson, H. y Nanda, A.S. (1992) *Reliability of cyst diagnosis and effect of energy status on LH released by estradiol or GnRH in cows with ovarian cysts*. Theriogenology 37: 465–472.
- Dobson, H. y Smith, R.F. (1995). *Stress and reproduction in farm animals*. J. Reprod. Fertil. (Suppl.) 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.
- Driancourt, M.A.; Guet, P.; Reynaud, K.; Chadli, A. y Catelli, M.G. (1999) *Presence of an aromatase inhibitor, possibly heat shock protein 90, in dominant follicles of cattle*. J. Reprod. Fertil. 115: 45-58.
- Driancourt, M.A.; Guet, P. y Magallon, T. (2000) *Ovine follicular fluid inhibits aromatase activity*. Domest. Anim. Endocrinol. 18: 349-362.
- Edwards, D.P.; Estes, P.A.; Fadok, V.A.; Bona, B.J.; Onate, S.; Nordeen, S.K. y Welch, W.J. (1992) *Heat shock alters the composition of heteromeric steroid receptor complexes and enhances receptor activity in vivo*. Biochemistry 31: 2482–2491.
- Edwards, J.L. y Hansen, P.J. (1997) *Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock*. Mol. Reprod. Dev. 46: 138–145.
- Ellis, J. (1987) *Proteins as molecular chaperones*. Nature 328: 378-379.
- Eppig, J.J. (2001) *Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals*. Reproduction 122: 829-838.

- Espey, L.L. (1994) *Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction*. Biol. Reprod. 50: 233-238.
- Espinoza-Villavicencio, J. L.; Ortega-Pérez, R.; Valencia-Méndez, J. y Aréchiga-Flores, C.F. (2007) *Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión*. Interciencia 32: 93-99.
- Evans, T.G.; Yamamoto, Y.; Jeffery, W.R. y Krone, P.H. (2005) *Zebrafish Hsp70 is required for embryonic lens formation*. Cell Stress Chaperon. 10: 66-78.
- Eyestone, W.H. y Ax, R.L. (1984) *A review of ovarian follicular cysts in cows, with comparisons to the conditions in women, rats, and rabbits*. Theriogenology 22: 109-125.
- Fan, L.; Ling, J.; Ma, X.; Cui, Y.G. y Liu, J.Y. (2009) *Involvement of HSP10 during the ovarian follicular development of polycystic ovary syndrome: Study in both human ovaries and cultured mouse follicles*. Gynecol. Endocrinol. 25: 392-397.
- 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.
- Fielden, E.D.; Harris, R.E.; Macmillan, K.L. y Shrestha, S.L. (1980) *Some aspects of reproductive performance in selected town-supply dairy herds*. NZ Vet. Journal 131/132: 141-142.
- Fleischer, P.; Metzner, M.; Beyerbach, 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.
- Fliss, A.E.; Benzeno, S.; Rao, J. y Caplan, A.J. (2000) *Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90*. J Steroid Biochem. Mol. Biol. 72: 223-230.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Frandsen, R.D. y Spurgeon, T.L. (1995) *Capítulo 26: Anatomía del sistema reproductor de la hembra*. En: *Anatomía y Fisiología de los animales domésticos*. Frandsen RD y Spurgeon T.L. 5ta Edición. Interamericana. Mc Graw-Hill.
- Gabai, V.L.; Mabuchi, K.; Mosser, D.D. y Sherman, M.Y. (2002) *Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis*. Mol. Cell Biol. 22: 3415-3424.
- Galigniana, M. D.; Echeverría, P. C.; Erlejman, A. y Piwien-Pilipuk, G. (2010). *Role of molecular chaperones and TPR-domain proteins in the cytoplasmic transport of steroid receptors and their passage through the nuclear pore*. Nucleus 1: 299-308.
- Garnero, O.; Perusia, O. (2002) *Manual de anestésicos y cirugías del bovino*. 1ra. Edición. - Editorial Imprenta San Cayetano, Santa Fe, Argentina, p. 125.
- Garrido, C.; Bruey, J.M.; Fromentin, A.; Hammann, A.; Arrigo, A.P. y Solary, E. (1999) *HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9*. FASEB J. 13: 2061–2070.
- Garrido, C.; Gurbuxani, S., Ravagnan, L. y Kroemer, G. (2001) *Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 286: 433–442.
- Garrido, C.; Schmitt, E.; Candé, C.; Vahsen, N.; Parcellier, A. y Kroemer, G. (2003) *HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors*. Cell Cycle 2: 579-584.
- Gartner, L.P. y Hiatt, J.L. (1997) *Histología. Texto y Atlas*. McGraw-Hill Interamericana, México, p. 506.
- Garverick, H.A. (1997) *Ovarian follicular cysts in dairy cows*. J. Dairy Sci. 80: 995–1004.

- Gasque Gómez, R. (2008). *Capítulo 10: Reproducción Bovina*. En: *Enciclopedia Bovina*. (Ed. Comité Editorial de la Universidad Nacional Autónoma de México) 1ra Edición, México, p. 393.
- 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. (2000) *Selection of the dominant follicle in cattle and horses*. Anim. Reprod. Sci. 60-61: 61-79.
- Ginther, O.J.; Knopf, L. y Kastelic, J.P. (1989) *Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycle with two and three follicular waves*. J. Reprod. Fertil. 87: 223-230.
- 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.; Bergfelt, D.R.; Beg, M.A. y Kot, K. (2001) *Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameter ranking, and capacity for dominance*. Biol. Reprod 65: 345-350.
- Gore-Langton, R.E. y Armstrong, D.T. (1994) *Follicular steroidogenesis and its control*. En: *The physiology of reproduction*. (Eds. Knobil E., Neill J.D.) Raven Press. Nueva York, EEUU. p. 571-627.
- Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. (2004) *hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria*. Cell Death Differ. 11: 390-402.
- Grad, I. y Picard, D. (2007). *The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones*. Mol. Cell. Endocrinol. 275: 2-12.

- Gümen, A. y Wiltbank, M.C. (2002) *An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle*. Biol. Reprod. 66:1689–95.
- Gümen, A.; Sartori, R.; Costa, F.M. y Wiltbank, M.C. (2002) *A GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure can induce development of follicular cysts*. J. Dairy Sci. 85, 43–50.
- Gümen, A.; Guenther, J.N. y Wiltbank, M.C. (2003) *Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular 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 anovular condition in dairy cows*. Theriogenology 63: 202–218.
- Guzeloglu, A.; Ambrose, J.D.; Kassa, T.; Diaz, T.; Thatcher, M.J. y Thatcher, W.W. (2001) *Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress*. Anim. Reprod. Sci. 66: 15-34.
- Hafez, E.S.E y Hafez, B. (2000) *Capítulo 5: Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación*. En: *Reproducción e inseminación artificial en animales*. (Eds. Hafez E. S. E y Hafez B) 7ma Edición. Mc Graw-Hill.
- Hafez, E.S.E.; Jaunudeen, M.R. y Rosnina Y. (2000) *Capítulo 3: Hormonas, factores de crecimiento y reproducción*. En: *Reproducción e inseminación artificial en animales*. (Eds. Hafez E. S. E y Hafez B). 7ma Edición. Mc Graw-Hill.
- 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.

- Hamilton, K.L.; Gupta, S. y Knowlton, A.A. (2004) *Estrogen and regulation of heat shock protein expression in female cardiomyocytes: cross-talk with NF kappa B signaling*. J. Mol. Cell Cardiol. 36: 577-584.
- Hartl, F.U. y Hayer-Hartl, M. (2002) *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science. 295: 1852-1858.
- Hatayama, T.; Takigawa, T.; Takeuchi, S. y Shiota, K. (1997) *Characteristic expression of high molecular mass heat shock protein HSP105 during mouse embryo development*. Cell Struct. Funct. 22: 517-525.
- Hatayama, T.; Yamagishi, N.; Minobe, E. y Sakai, K. (2001) *Role of hsp105 in protection against stress-induced apoptosis in neuronal PC12 cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 288: 528-534.
- Hatler, T.B.; Hayes, S.H.; Laranja da Fonseca, L.F.; Silvia, W.J. (2003) *Relationship between endogenous progesterone and follicular dynamics in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts*. Biol. Reprod. 69: 218–223.
- Helmbrecht, K.; Zeise, E. y Rensing, L. (2000) *Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review*. Cell Prolif. 33: 341–365.
- Henderson, B. y Pockley, A. (2010) *Molecular chaperones and protein-folding catalysts as intercellular signaling regulators in immunity and inflammation*. J. Leukoc. Biol. 88: 445-462.
- Hensold, J.O.; Hunt, C.R.; Calderwood, S.K.; Housman, D.E. y Kingston, R.E. (1990) *DNA binding of heat shock factor to the heat shock element is insufficient for transcriptional activation in murine erythroleukemia cells*. Mol. Cell Biol. 41: 1600–1608.

- Herwitz, A. y Adashi, E.Y. (1993) *Ovarian follicular atresia as an apoptotic process*. En: *The Ovary* (Eds. E.Y. Adashi y P.C. K. Leung) 1ra. Edición. New York, Raven Press, p. 473–485.
- Hillier, S.G. (2001). *Gonadotrophic control of ovarian follicular growth and development*. Mol. Cell. Endocrinol. 179: 39-46.
- Hirsh, M.I. y Junger, W.G. (2008) *Roles of heat shock proteins and $\gamma\delta$ T cells in inflammation*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 39: 509–513.
- Hooijer, G.A.; van Oijen, M.A.A.J.; Frankena, K. y Valks, M.M.H. (2001) *Fertility parameters of dairy cows with cystic ovarian disease after treatment with gonadotrophin-releasing hormone*. Vet. Rec. 149: 383–386.
- Hsu, C.J. y Hammond, J.M. (1987) *Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine granulosa cells in vitro*. Endocrinology 120: 198-207.
- Hsueh, A.J. y Erickson, G.F. (1978) *Glucocorticoid inhibition of FSH-induced estrogen production in cultured rat granulosa cells*. Steroids 32: 639-648.
- Humblot, P.; Holm, P.; Lonergan, P.; Wrenzycki, C.; Lequarre, A.S.; Joly, C.G.; Herrmann, D.; Lopes, A.; Rizos, D.; Niemann, H. y Callesen, H. (2005) *Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes*. Theriogenology 63: 1149-1166.
- Hurd, A.M.; Schiff, R.; Parra, I.; Friedrichs, W.E.; Osborne, C.K.; Morimoto, R.I.; Hopp, T. y Fuqua S.A.W. (2000) *Heat shock protein 70 can modulate estrogen receptor activity in breast cancer cells*. Proc Am Assoc Cancer Res 41: 73.

- Irving-Rodgers, H.F.; van Wezel, I.L.; Mussard, M.L.; Kinder, J.E. y Rodgers, R.J. (2001) *Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles*. *Reproduction* 122: 761–775.
- 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. 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.E. (2000) *Capítulo 11: Bovinos y búfalos*. En: *Reproducción e inseminación artificial en animales*. (Eds. Hafez E. S. E y Hafez B). 7ma Edición. Mc Graw-Hill.
- Jainudeen, M.R. y Hafez, E.S.E. (2000) *Capítulo 17: Incapacidad reproductiva en hembras*. En: *Reproducción e inseminación artificial en animales*. (Eds. Hafez E. S. E y Hafez B.) 7ma Edición. Mc Graw-Hill.
- Jayachandran, M. y Miller, V.M. (2002) *Ovariectomy upregulates expression of estrogen receptors, NOS, and HSPs in porcine platelets*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283: H220–H226.
- Jolly, C. y Morimoto, R.I. (2000) *Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death*. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 1564-1572.
- Jolly, P.D.; Tisdall, D.J.; Heath, D.A.; Lun, S. y McNatty, K.P. (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.

Johnson, 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.

Jones, M.R.; Chua, A.; Chen, Y-D.I.; Li, X.; Krauss, R.M.; Rotter, J.I.; Legro, R.S.; Azziz, R. y Goodarzi, M.O. (2011) *Harnessing Expression Data to Identify Novel Candidate Genes in Polycystic Ovary Syndrome.* PLoS ONE 6: e20120.

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

Kelley, W.L. (1998) *The J-domain family and the recruitment of chaperone power.* TIBS 23.

Kesler, D.J. y Garverick, H.A. (1982) *Ovarian cysts in dairy cattle: a review.* J. Anim. Sci. 55: 1147–1159.

Khanna, A.; Aten, R.F. y Behrman, H.R. (1995) *Heat shock protein-70 induction mediates luteal regression in the rat.* Mol. Endocrinol. 9: 1431–1440.

Klass, M.G.; Gavrikov, V.; Krishnamoorthy, M. y Csete, M. (2008) *Heat shock proteins, endothelin, and peripheral neuronal injury.* Neurosci. Lett. 433: 188-193.

Kligman, I.; Grifo, J.A.; y Witkin, S.S. (1996) *Expression of the 60 kDa heat shock protein in peritoneal fluids from women with endometriosis: implications for endometriosis-associated infertility.* Hum. Reprod. 11: 2736-2738.

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

Koshiyama, M.; Konishi, I.; Nanbu, K.; Nanbu, Y.; Mandai, M.; Komatsu, T.; Yamamoto, S.; Mori, T. y Fujii, S. (1995) *Immunohistochemical localization of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in the human endometrium: correlation with sex steroid receptors and Ki-67 antigen expression*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 80: 1106-1112.

Kregel, K.C. (2002) *Molecular Biology of Thermoregulation. Invited review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance*. J. Appl. Physiol. 92: 2177-2186.

Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227: 680-685.

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, Z.; Menoret, A. y Srivastava, P. (2002) *Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation*. Curr. Opin. Immunol. 14: 45-51.

Liao, J.; Xu, X. y Wargovich, M.J. (2000). *Direct Reprobing with Anti- β -actin Antibody as an Internal Control for Western Blotting Analysis*. BioTechniques 28: 216-218.

Lindquist, S. y Craig, E.A. (1988) *The heat shock proteins*. Annu. Rev. Genet. 22: 631-637.

Ling, J.; Zhao, K.; Cui, Y.G.; Li, Y.; Wang, X.; Li, M.; Xue, K.; Ma, X.; Liu, J.Y. (2011) *Heat shock protein 10 regulated apoptosis of mouse ovarian granulosa cells*. Gynecol. Endocrinol. 27: 63-71.

- Lingenfelter, B.M., Dailey, R.A.; Inskoop, E.K.; Vernon, M.W.; Poole, D.H.; Rhinehart, J.D. y Yao, J. (2007) *Changes of maternal transcripts in oocytes from persistent follicles in cattle*. Mol. Reprod. Dev. 74: 265-272.
- Liptrap, R.M. y McNally P.J. (1976) *Steroid concentrations in cows with corticotropin-induced cystic ovarian follicles and the effect of prostaglandin F2alpha and indomethacin given by intrauterine injection*. Am. J. Vet. Res. 37: 369–375.
- Liu, Z.; Stocco, D.M. (1997) *Heat shock-induced inhibition of acute steroidogenesis in MA-10 cells is associated with inhibition of the synthesis of the steroidogenic acute regulatory protein*. Endocrinology 138: 2722-2728.
- 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.
- López-Gatius, F.; Santolaria, P.; Yaniz, J.; Rutllant, J. y Lopez-Bejar, M. (2001) *Persistent ovarian follicles in dairy cows: a therapeutic approach*. Theriogenology 56: 649–59.
- López-Gatius, F.; Santolaria, P.; Yániz, J.; Fenech, M. y López-Béjar, M. (2002) *Risk factors for postpartum ovarian cysts and their spontaneous recovery or persistence in lactating dairy cows*. Theriogenology 58: 1623–1632.
- Lucy, M.C. (2001) *Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?* J. Dairy Sci. 84: 1277–1293.
- 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.
- Ma, X.; Fan, L.; Meng, Y.; Hou, Z.; Mao, Y.D.; Wang, W.; Ding, W. y Liu, J.Y. (2007) *Proteomic analysis of human ovaries from normal and polycystic ovarian syndrome*. Mol. Hum. Reprod. 13: 527–535.

Maizels, E.T.; Cottom, J.; Jones, J.C. y Hunzicker-Dunn, M. (1998) *Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells*. *Endocrinology* 139: 3353-3356.

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*. *Domest. Anim. Endocrinol.* 3: 135–144.

Manabe, O.; Inoue, N.; Miyano, T.; Sakamaki, K.; Sugimoto, M. y Miyamoto H. (2004) *Chapter 21: Follicle Selection in Mammalian Ovaries: Regulatory Mechanisms of Granulosa Cell Apoptosis during Follicular Atresia*. En: *The Ovary*. (Eds. Leung P.C.K., Adashi E.Y). 2da Edición. Elsevier Academic Press.

Maniwa, J.; Izumi, S.; Isobe, N. y Terada, T. (2005) *Studies on substantially increased proteins in follicular fluid of bovine ovarian follicular cysts using 2-D PAGE and MALDI-TOF MS*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 23.

Mansell, J.P.; Yarram, S.J., Brown, N.L. y Sandy, J.R. (2002) *Type I collagen synthesis by human osteoblasts in response to placental lactogen and chaperonin 10, a homolog of early-pregnancy factor*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 38: 518–522.

Mariani, M.L.; Souto. M.; Fanelli, M.A. y Ciocca, D.R. (2000) *Constitutive expression of heat shock proteins hsp25 and hsp70 in the rat oviduct during neonatal development, the oestrous cycle and early pregnancy*. *J. Reprod. Fertil.* 120: 217-223.

Marion, G.B.; Gier, H.T. y Choudary, J.B. (1968) *Micromorphology of the bovine ovarian follicular system*. *J. Anim. Sci.* 27: 451–465.

- Markusfeld, O. (1987) *Inactive ovaries in high-yielding dairy cows before service: etiology and effect on conception*. Vet. Rec. 121: 149–153.
- Martin, P. (1997) *Wound healing – aiming for perfect skin regeneration*. Science 276: 75–81.
- Mihm, M. y Austin E.J. (2002) *The final stages of dominant follicle selection in cattle*. Domest. Anim. Endocrinol. 23: 155–166.
- Milioti, N.; Bermudez-Fajardo, A.; Penichet, M.L. y Oviedo-Orta, E. (2008) *Antigen-induced immunomodulation in the pathogenesis of atherosclerosis*. Clin. Dev. Immunol. 723539.
- Moberg, G.P. (1991) *How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals*. J. Dairy Sci. 74: 304-311.
- Monget, P., Monniaux, D. (1995) *Growth factors and the control of folliculogenesis*. J. Reprod. Fertil. 49: 321-333.
- Morimoto, R.I. (1998) *Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators*. Gene Dev. 12: 3788–3796.
- Moseley, P. (2000) *Stress proteins and the immune response*. Immunopharmacology 48: 299–302
- Mosser, D.D.; Caron, A.W.; Bourget, L.; Meriin, A.B.; Sherman, M.Y.; Morimoto, R.I. y Massie, B. (2000) *The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis*. Mol. Cell Biol. 19: 7146–7159.

- Mulligan, F.J. y Doherty, M.L. (2008) *Production diseases of the transition cow*. Vet. J. 176: 3–9.
- Mwaanga, E.S. y Janowski, T. (2000) *Anoestrus in dairy cows: causes, prevalence and clinical forms*. Reprod. Domest. Anim. 35: 193–200.
- Nadaraja, R. y Hansel, W. (1976) *Hormonal changes associated with experimentally produced cystic ovaries in the cow*. J. Reprod. Fertil. 47: 203–208.
- Nakayama, M.; Manabe, N.; Nishihara, S. y Miyamoto, H. (2000). *Species specific differences in apoptotic cell localization in granulosa and theca interna cells during follicular atresia in porcine and bovine ovaries*. J. Reprod. Dev. 46: 147–156.
- 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.
- Neuer, A.; Lam, K.N.; Tiller, F.W.; Kiesel, L. y Witkin, S.S. (1997) *Humoral immune response to membrane components of Chlamydia trachomatis and expression of human 60 kDa heat shock protein in follicular fluid of in-vitro fertilization patients*. Hum. Reprod. 12: 925–929.
- Neuer, A.; Spandorfer, S.D.; Giraldo, P.; Dieterle, S.; Rosenwaks, Z. y Witkin, S.S. (2000). *The role of heat shock proteins in reproduction*. Hum. Reprod. Update 6: 149–159.
- 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.
- 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.

Ohsako, S.; Bunick, D. y Hayashi, Y. (1995) *Immunocytochemical observation of the 90 kD heat shock protein (HSP90): high expression in primordial and pre-meiotic germ cells of male and female rat gonads.* J. Histochem. Cytochem. 43: 67–76.

Olvera-Sanchez, S.; Espinosa-Garcia, M.T.; Monreal, J.; Flores-Herrera, O. y Martinez, F. (2011) *Mitochondrial heat shock protein participates in placental steroidogenesis.* Placenta 32: 222-229.

Opsomer, G.; Wensing, T.; Laevens, H.; Coryn, M.; 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.

Ortega, H.H.; Lorente, J.A.; Mira, G.A.; Baravalle, C.; Salvetti, N.R. (2004) *Constant light exposure cause dissociation in gonadotrophins secretion and inhibits partially neuroendocrine differentiation of Leydig cells in adult rats.* Reprod. Domest. Anim. 39: 417-423.

Ortega H. H.; Salvetti N.R.; Müller L.A.; Amable P.; Lorente J.A; Barbeito C.G. y Gimeno E.J. (2007a). *Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with Cystic Ovarian Disease.* J. Comp. Pathol. 136: 222-230.

Ortega, H.H.; Stangaferro, M.L.; Salvetti, N.R.; Arcangelo, D. y Palomar, M.M. (2007b) *Estudio del balance proliferación/apoptosis en estructuras foliculares de bovinos con enfermedad quística ovárica inducida experimentalmente.* Medicina (Supl III) 67: 185.

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 of cows with spontaneous and induced cystic ovarian disease. Res. Vet. Sci. 84: 419–427.

Overton, T.R. y Waldron, M.R. (2004). *Nutritional management of transitions dairy cows: strategies to optimize metabolic health. J. Dairy Sci.* 87: E105–E119.

Ozturk, M.; Smith, R.F. y Dobson, H. (1998) *Effect of prolonged exposure to oestradiol on subsequent LH secretion in ewes. J. Reprod. Fertil.* 114: 1–9.

Palleros, D.R.; Welch, W.J. y Fink, A.L. (1991) *Interaction of hsp70 with unfolded proteins: effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 5719-5723.

Paranko, J.; Seitz, J. y Meinhardt, A. (1996) *Developmental expression of heat shock protein 60 (HSP60) in the rat testis and ovary. Differentiation* 60: 159-167.

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.

Parsell, D.A. y Lindquist, S. (1993) *The function of heat-shock proteins in stress tolerance-degradation and reactivation of damaged proteins. Annu. Rev. Genet.* 27: 437-496.

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.

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

Peter, A.T. (2004) *An update on cystic ovarian degeneration in cattle*. *Reprod. Dom. Anim.* 39: 1-7.

Peter, A.T. *Managing postpartum health and cystic ovarian disease*. Proceed Eighteenth Annual Western Canadian Dairy Seminar: Advances in Dairy Technology, Año 2000, Alberta, Canada, p. 85–99.

Peter, A.T. y Liptrap, R.M. (1985) *Plasma gonadotrophin levels in sows with experimental cystic ovarian follicles*. *Br. Vet. J.* 141: 288–296.

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.; Malven, P.V.; Shaftoe, S. y Bosu, W.T.K. (1991) *Quantification of circulating beta-endorphin and white blood cells in heifers after intrauterine administration of Escherichia coli endotoxin*. *Theriogenology* 36: 1009–1014.

Peter, A.T.; Perrone, M.S. y Asem, E.K. (1995) *Bovine ovarian follicular fluid vitronectin content is influenced by follicle size*. *Theriogenology* 43: 1239–1247.

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.; Grandien, K.; Kuiper, G.G.; Gustafsson, J.A. (1997). *Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor α* . *Mol. Endocrinol.* 11: 1486-1496.

Picard, D.; Khursheed, B.; Garabedian, M.J.; Fortin, M.G., Lindquist, S. y Yamamoto, K.R. (1990) *Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo*. *Nature* 348: 166-168.

- Powell, E.; Wang, Y.; Shapiro, D.J. y Xu, W. (2010) *Differential requirements of Hsp90 and DNA for the formation of estrogen receptor homodimers and heterodimers*. J Biol. Chem. 285: 16125-16134.
- Pratt, W.B. y Toft, D.O. (1997) *Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones*. Endocr. Rev. 18: 306-360.
- Pratt, W.B. y Toft, D.O. (2003) *Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery*. Exp. Biol. Med. 228: 111–133.
- Pratt, W.B.; Galigniana, M.D.; Morishima, Y. y Murphy, P.J. (2004) *Role of molecular chaperones in steroid receptor action*. Assays Biochem. 40: 41-58.
- Pretheeban, T.; Balendran, A.; Gordon, M.B. y Rajamahendran R. (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.
- Priedkalns, J. (1993) *Capítulo 13: Sistema reproductor femenino*. En: *Histología Veterinaria* (Ed. Dellman H.D). 2da. Edición. Acribia. España.
- Quintana, F.J. y Cohen, I.R. (2011) *The HSP60 immune system network*. Trends Immunol. 32: 89-95.
- Rajakoski, E. (1960) *The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, end left–right variations*. Acta Endocrinol-Buch 34: 1–68.
- Rayner, K.; Chen, Y.X.; Siebert, T.; O'Brien, E.R. (2010) *Heat Shock Protein 27: Clue to understanding estrogen-mediated atheroprotection?* Trends Cardiovasc. Med. 20: 54-58.

- Refsdal, A.O. (1982) *Ovariecyster hos melkekyr*. Norsk Veterinærtidsskrift 94: 789–796.
- 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 adrenocorticotropic 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.
- 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*. PhD Thesis, University of Liverpool, UK.
- 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.; Jonassen, J.A.; Rofles, A.L.; Kersey, K. y Reichert, L.E. (1979) *Adenosine 3',5'-monophosphate, luteinizing hormone receptor, and progesterone during granulosa cell differentiation: effects of estradiol and follicle-stimulating hormone*. Endocrinology 104: 765-773.
- Robert, C.; Gagne, D.; Lussier, J.G.; Bousquet, D.; Barnes, F.L. y Sirard, M.A. (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.

Roberts, S.J. (1986) *Cystic ovaries*. En: *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases – Theriogenology*. (Ed. Roberts, S.J.) Woodstock, Vermont, p 483.

Rodgers, R.J. y Irving-Rodgers, H.F. (2010) *Morphological classification of bovine ovarian follicles*. *Reproduction* 139: 309–318.

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.

Roelofs, J.B.; van Eerdenburg, F.J.; Soede, N.M. y Kemp, B. (2005) *Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle*. *Theriogenology* 63: 1366–1377.

Romanucci, M.; Bastow, T. y Della Salda, L. (2008) *Heat shock proteins in animal neoplasms and human tumours—a comparison*. *Cell Stress Chaperon.* 13: 253–262.

Rosenfeld, C.S.; Yuan, X.; Manikkam, M.; Calder, M.D. y Garverick, H.A. (1999) *Cloning, sequencing, and localization of bovine estrogen receptor- β within the ovarian follicle*. *Biol. Reprod.* 60: 691–697.

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

Ruden, D.M.; Xiao, L.; Garfinkel, M.D. y Lu, X. (2005). *Hsp90 and environmental impacts on epigenetic states: a model for the trans-generational effects of diethylstilbestrol on uterine development and cancer*. *Hum. Mol. Genet.* 14: R149-155.

Saluja, A. y Dudeja, V. (2008) *Heat shock proteins in pancreatic diseases*. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23: 42–45.

- Salveti, 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.
- Salveti, 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.; Baravalle, C.; Mira, G.A.; Gimeno, E.J.; Dallard, B.E.; Rey, F. y Ortega, H.H. (2009) *Heat shock protein 70 and sex steroid receptors in the follicular structures of induced ovarian cysts*. Reprod. Domest. Anim. 44: 805-814.
- 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.
- Schernthaner, W.; Wenigerkind, H.; Stojkovic, M.; Palma, G.A; Mödl, J.; Wolf, E. y Brem, G. (1999) *Pregnancy rate after ultrasound-guided follicle aspiration in nonlactating cows from different breeds*. Zentralbl Veterinarmed A. 46: 33-37.
- Schultz, G.S. y Wysocki, A. (2009) *Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing*. Wound Repair and Regen 17: 153–162.
- Seneda, M.M.; Esper, C.R.; Garcia, J.M.; Andrade, E.R.; Binelli, M.; Oliveira, J.A. y Nascimento A.B. (2003) *Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration*. Theriogenology 59: 1435-1440.

- Senger, P.L. (2003) *Pathways to pregnancy and parturition*. Pullman, WA: Current Conceptions, Inc.
- Shan, Y.X.; Yang, T.L.; Mestril, R. y Wang, P.H. (2003) *Hsp10 and Hsp60 suppress ubiquitination of insulin-like growth factor-1 receptor and augment insulin-like growth factor-1 receptor signaling in cardiac muscle: implications on decreased myocardial protection in diabetic cardiomyopathy*. J. Biol. Chem. 278: 45492-45498.
- Shiozawa, T.; Miyamoto, T.; Kashima, H.; Nakayama, K.; Nikaido, T.; Konishi, I. (2004) *Estrogen-induced proliferation of normal endometrial glandular cells is initiated by transcriptional activation of cyclin D1 via binding of c-Jun to an AP-1 sequence*. Oncogene 23: 8603-8610.
- Shiozawa, T.; Shih, H.C.; Miyamoto, T.; Feng, Y.Z.; Uchikawa, J.; Itoh, K. y Konishi, I. (2003) *Cyclic changes in the expression of steroid receptor coactivators and corepressors in the normal human endometrium*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 88: 871-878.
- Shrestha, H.K.; Nakao, T.; Higaki, T.; Suzuki, T. y Akita, M. (2004) *Effects of abnormal ovarian cycles during pre-service period postpartum on subsequent reproductive performance of highproducing Holstein cows*. Theriogenology 61: 1559-1571.
- 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.
- Sirois, J. y J. E. Fortune. (1988). *Ovarian follicular dynamics during estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography*. Biol. Reprod. 39: 308-317.

- Sirotkin, A.V. (2010) *Effect of two types of stress (heat shock/high temperature and malnutrition/serum deprivation) on porcine ovarian cell functions and their response to hormones*. J. Exp. Biol. 213: 2125-2130.
- Sirotkin, A.V. y Bauer, M. (2011) *Heat shock proteins in porcine ovary: synthesis, accumulation and regulation by stress and hormones*. Cell Stress Chaperon. 16: 379–387.
- Smith, D.F. (1993) *Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes*. Mol. Endocrinol. 7: 1418–1429.
- Smith, D.F.y Toft, D.O. (1993) *Steroid receptors and their associated proteins*. Mol. Endocrinol. 7: 4–11.
- Soltys, B.J. y Gupta, R.S. (1997) *Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells*. Cell Biol. Int. 21: 315-320.
- Sonna, L.A.; Fujita, J.; Gaffin, S.L. y Lilly, C.M. (2002) *Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression*. J. Appl. Physiol. 92: 1725–1742.
- Sordillo, L.M.; Contreras, G.A. y Aitken, S.L. (2009) *Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows*. Anim. Health Res. Rev. 10: 53–63.
- Sreedhar, A.S.; Kalmar, E.; Csermely, P. y Shen, Y.F. (2004) *Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance*. FEBS Lett. 562, 11-15.
- Staples, G.R.; Burke, J.M. y Thatcher, W.W. (1998) *Influence of supplemental fats on reproductive tissue and performance of lacting cows*. J. Anim. Sci. 81: 856-871.
- Stoebel, D.P. y Moberg, G.P. (1982) *Effect of adrenocorticotropin and cortisol on luteinizing hormone surge and estrous behaviour of cows*. J. Dairy Sci. 65: 1016–1024.

- Summers, K.M.; Fletcher, B.H. y Macaranas, D.D. (1998) *Mapping and characterization of the eukaryotic early pregnancy factor/chaperonin 10 gene family*. Somat. Cell. Mol. Genet. 24: 315–326.
- Suzuki, C.; Yoshioka, K.; Iwamura, S. y Hirose, H. (2001) *Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous in Holstein heifers*. Domest. Anim. Endocrinol. 20: 267–278.
- Taft, R.; Ahmad, N. y Inskeep, E.K. (1996). *Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle*. J. Anim. Sci. 74:2985-2991.
- Tang, P.Z.; Gannon, M.J.; Andrew, A. y Miller, D. (1995) *Evidence for oestrogenic regulation of heat shock protein expression in human endometrium and steroid-responsive cell lines*. Eur. J. Endocrinol. 33: 598-605.
- Tang, Y.; Xiang, W.; Terry, L.; Kretzschmar, H.A. y Windl, O. (2010) *Transcriptional Analysis Implicates Endoplasmic Reticulum Stress in Bovine Spongiform Encephalopathy*. PLoS ONE 5: e14207.
- Thiéry, J.C. y Martin, G.B. (1991) *Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep--a review*. Reprod. Fertil. Dev. 3: 137-173.
- Tilly, J.L. (1998) *Cell death and species propagation: Molecular and genetic aspects of apoptosis in the vertebrate female gonad*. En: *When Cells Die* (Eds. R. A. Lockshin, Z. Zakeri, y J. L. Tilly) New York:Wiley-Liss, Inc. p431–452.
- Tsai, Y.H. y Steinberger, A. (1982) *Effect of sodium molybdate on the binding of androgen-receptor complexes to germ cell and Sertoli cell chromatin*. J. Steroid. Biochem. 17: 131-136.

Tsan, M-F. y Gao, B. (2004) *Cytokine function of heat shock proteins*. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 286: C739–C744.

Vanholder T.; G. Opsomer y A. De Kruif. (2006) Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. Reprod. Nutr. Develop. 46: 105-119.

Velázquez, M.M.L.; Alfaro, N.S; Dupuy, C.R.F; Salvetti, N.R.; Rey, F. y Ortega, H.H. (2010) *Heat shock protein patterns in the bovine ovary and relation with cystic ovarian disease*. Anim. Reprod. Sci. 118: 201- 209.

Velázquez, M.; Alfaro, N.S.; Salvetti, N.R.; Stangaferro, M.L.; Rey, F.; Panzani, C. y Ortega, H.H. (2011) *Levels of heat shock proteins transcripts in normal follicles and ovarian follicular cysts*. Reprod. Biol. 11: 276-283.

Walter, S. y Buchner, J. (2002) *Molecular chaperones—cellular machines for protein folding*. Angew Chem. Int. Ed. Engl. 41: 1098–1113.

Wang, H.; Eriksson, H. y Sahlin, L. (2000). *Estrogen receptors α and β in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle*. Biol. Reprod. 63: 1331-1340.

Webb, R. y Campbell, B.K. (2007) *Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality*. Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 64: 141-63.

Webb, R.; Campbell, B.K.; Garverick, H.A.; Gong, J.G.; Gutierrez, C.G. y Armstrong DG. (1999) *Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection*. J. Reprod. Fertil. Suppl. 54: 33-48.

Webb, R.; Nicholas, B.; Gong, J.G.; Campbell, B.K.; Gutiérrez, C.G.; Garverick, H.A.; y Armstrong, D.G. (2003) *Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle*. Reproduction 61: 71-90.

Welch, W.J. (1993) *How cells respond to stress*. Sci. Am. 268: 56–64.

- Werner, A.; Meinhardt, A.; Seitz, J. y Bergmann, M. (1997) *Distribution of heat-shock protein 60 immunoreactivity in testes of infertile men*. Cell Tissue Res. 288: 539-544.
- Williams, C.Y.; Harris, T.G.; Battaglia, D.F.; Viguie, C. y Karsch, F.J. (2001) *Endotoxin inhibits pituitary responsiveness to gonadotrophin-releasing hormone*. Endocrinology 142: 1915– 1922.
- Wiltbank, J.N. (1966). *Modification of ovarian activity in the bovine following injection of oestrogen and gonadotrophin*. J. Reprod. Fertil. (Suppl.) 1: 1–10.
- Wiltbank, M.; Gümen, A. y Sartori, R. (2002) *Physiological classification of anovulatory conditions in cattle*. Theriogenology 57: 21–52.
- 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, B.J.; Kingston, R.E. y Morimoto, R.I. (1986) *Human HSP70 promoter contains at least two distinct regulatory domains*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 629–633.
- Yeyati, P.L. y van Heyningen, V. (2008) *Incapacitating the evolutionary capacitor: Hsp90 modulation of disease*. Curr. Opin. Genet. Dev. 18: 264–272.
- Yoon, S.J.; Choi, K.H. y Lee, K.A. (2002) *Nitric oxide-mediated inhibition of follicular apoptosis is associated with HSP70 induction and Bax suppression*. Mol. Reprod. Dev. 61: 504–510.
- 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.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Yuan, J.; Xiao, L.; Lu, C.; Zhang, X.; Liu, T.; Chen, M.; Hu, Z.; Gao, F. y Liu Y. (2009) *Increased expression of heat shock protein 105 in rat uterus of early pregnancy and its significance in embryo implantation*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7: 23.
- Zhu, Y.; Zhu, J.; Wanb X.; Zhu, Y.; Zhang, T. (2010) *Gene expression of sHsps, Hsp40 and Hsp60 families in normal and abnormal embryonic development of mouse forelimbs*. *Toxicology Letters* 193: 242-251.
- Zulu, V.C. y Penny, C. (1998) *Risk factors of cystic ovarian disease in dairy cattle*. *J. Reprod. Physiol.* 44: 191–195.
- Zulu, V.C.; Sawamukai, Y.; Nakada, K.; Kida, K. y Moriyoshi, M. (2002) *Relationship among insulinlike growth factor-I, blood metabolites and post partum ovarian function in dairy cows*. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 879–885.
- Zurvarra, F.M.; Salvetti, N.R.; Ian Mason, J.; Velazquez, M.M. L.; 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. Fertil. Dev.* 21: 827–839.

PUBLICACIONES



8. PUBLICACIONES

Publicaciones en relación con la tesis:

Velázquez, M.; Alfaro, N.S.; Salvetti, N.R.; Stangaferro, M.L.; Rey, F.; Panzani, C. y Ortega, H.H. (2011) *Levels of heat shock proteins transcripts in normal follicles and ovarian follicular cysts*. *Reprod. Biol.* 11: 276-283.

Velázquez, M.M.L.; Alfaro, N.S.; Dupuy, C.R.F.; Salvetti, N.R.; Rey, F. y Ortega, H.H. (2010) *Heat shock protein patterns in the bovine ovary and relation with cystic ovarian disease*. *Anim. Reprod. Sci.* 118: 201- 209.

Otras publicaciones

Salvetti, N.R.; **Velazquez M.M.L.**; Alfaro, N.S.; Amweg, A.N.; Ortega, H.H. *Expression of steroid receptors, correulators, and associated molecules in ovarian follicles of cows with induced cystic ovarian disease*. *Theriogenology*. Trabajo enviado.

Alfaro NS., Salvetti NR., **Velázquez MML.**, Stangaferro ML, Rey F, Ortega HH. *Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease*. *Research in Veterinary Science* doi:10.1016/j.rvsc.2011.04.009.

Ortega H.H., Rey F., **Velazquez M.M.L.**, Padmanabhan V. (2010) *Developmental Programming: Effect of Prenatal Steroid Excess on Intraovarian Components of Insulin Signaling Pathway and Related Proteins in Sheep*. *Biology of Reproduction* 82, 1065–1075.

Zurvarra, F.M.; Salvetti, N.R.; Ian Mason, J.; **Velazquez, M.M. L.**; 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. Fertil. Dev.* 21: 827–839.

Velázquez M; Diez CN; Mora C; Diosque P; Marcipar IS. 2008. *Trypanosoma cruzi: An analysis of the minicircle hypervariable regions diversity and its influence on strain typing*. *Experimental Parasitology* 120(3): 235 - 241.