



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Veterinarias

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

MENCIÓN: Producción de Rodeos Lecheros

**PARTICIPACIÓN DE MIEMBROS DE LA
SUPERFAMILIA TGF- β EN LA PATOGENIA DE
LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA BOVINA**

AUTOR: M.V. Matías L. Stangaferro

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAGISTER
SCIENTIAE EN CIENCIAS VETERINARIAS**

Esperanza, 10 de junio de 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Veterinarias

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

MENCIÓN: Producción de Rodeos Lecheros

**PARTICIPACIÓN DE MIEMBROS DE LA
SUPERFAMILIA TGF- β EN LA PATOGENIA DE
LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA BOVINA**

AUTOR: M.V. MATÍAS L. STANGAFERRO

DIRECTORA: DRA. NATALIA R. SALVETTI

CO-DIRECTOR: DR. HUGO H. ORTEGA

JURADO: Dra. Bibiana Dallard

M.Sc. Gabriela Romano

PhD. Julián Bartolomé

*La educación es el arma más poderosa que
puedes usar para cambiar el mundo.*

Nelson Mandela

*Dedico este trabajo a mis padres, quienes me apoyaron en todas y cada una de la
decisiones que marcaron el rumbo de mi carrera y de mi vida.*

*A Lucía, porque con su amor e incondicional compañía, conforma
el andamio donde se construyen día a día nuestros sueños.*

AGRADECIMIENTOS



A mi familia que, con gran esfuerzo, permitió que realizara mi sueño, por su apoyo incondicional y soporte emocional.

A mis directores y amigos, la Dra. Natalia Salvetti y el Dr. Hugo Ortega, por su infinita paciencia y por estar siempre en los momentos precisos para dar una mano.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biología Celular y Molecular: Natalia Alfaro, Ayelén Amweg, Carolina Andreotti, Celina Baravalle, Eugenia Baravalle, Bibiana Dallard, Belkis Marelli, Leandro Neme, Carolina Panzani, Elizabet Pereyra, Sol Renna, Fernanda Rodriguez, Melisa Velázquez y Marcelo Zayas, por los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio y por todas las ayudas recibidas.

A Florencia Rey, porque con su sello detallista, concedió su destacada colaboración en este trabajo.

A Valentina Matiller, quien trabajó conmigo codo a codo en la realización de esta tesis.

A mi gran amigo Pablo Uriel Díaz, no sólo por la enorme cantidad de horas de trabajo compartidas sino por formar parte de imborrables momentos de mi vida.

A Natalia Gareis, Ignacio Liprandi, Alberto Lapilli y Bernardo Menichetti, por el último tiempo compartido en el que me cedieron favores desinteresadamente que sumaron a la culminación de este trabajo.

A mi maestro y amigo, el Dr. José Bertoli, quien pudo transmitirme de manera única no sólo sus conocimientos profesionales sino también su experiencia a lo largo de la vida.

A mis compañeros de la cátedra de Teriogenología: Antonio Taboada, Fabián Barberis, Luciano Cattaneo, Emilia Gagliano, Martín Maciel, Alberto Odasso y Juan Ignacio Stratta, por haber estado siempre dispuestos a colaborar durante todos estos años.

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

A aquellos que contribuyeron directa e indirectamente en la realización de esta tesis, y que por una traición de mi memoria no fueron citados.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS UTILIZADAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xv
SUMMARY	xvii
I- INTRODUCCIÓN	1
I.1. Hipótesis	4
I.2. Objetivos	4
I.2.1. General	4
I.2.2. Específicos	5
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
II.1. HISTOFISIOLOGÍA OVÁRICA	7
II.1.1. Foliculogénesis y clasificación folicular	8
II.1.2. Regulación del crecimiento y desarrollo folicular	11
II.1.2.1. Regulación endocrina	11
II.1.2.2. Factores reguladores autocrinos y paracrinos	16
II.1.3. Características de la dinámica ovárica en la hembra bovina	18
II.1.3.1. Reclutamiento	20
II.1.3.2. Selección y dominancia	21
II.1.3.3. Atresia folicular	22
II.1.3.4. Ovulación y Formación del cuerpo lúteo	23
II.1.4. Interacciones endócrinas y foliculares: Integración de conceptos	23
II. 2. ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA	27
II.2.1. Definición	28
II.2.2. Factores predisponentes en la formación de quistes	29
II.2.2.1. Factores Generales	29
II.2.2.2. Factores Específicos	31
II.2.3. Etiología y patogenia	35

II.2.3.1. Disfunción hipotálamo-hipofisaria.....	35
II.2.3.2. Disfunción ovárica/folicular.....	37
II.3. SUPERFAMILIA DE TGF- β	40
II.3.1. Ligandos.....	40
II.3.1.1. Subfamilia del TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3.....	41
II.3.1.2. Subfamilia de inhibina, activina y foliculostatina.....	42
II.3.2. Receptores.....	44
II.3.3. Roles intraováricos de los miembros de la superfamilia de TGF- β	44
II.3.3.1. Activación de los folículos primordiales en reposo.....	45
II.3.3.2. Progresión de los folículos primarios a estadios antrales tempranos.....	47
II.3.3.3. Desarrollo de folículos antrales y mecanismo de selección folicular.....	51
II.3.3.4. Ovulación y formación del cuerpo lúteo.....	57
III- MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
III.1. PROCEDIMIENTOS REALIZADOS CON ANIMALES.....	60
III.1.1. Diagnóstico y obtención de muestras provenientes de casos de COD espontánea identificados “a campo”.....	60
II.1.1.1. Aspiración folicular guiada por ecografía.....	61
II.1.1.2. Ovariectomía bilateral mediante abordaje transvaginal.....	62
III.1.2. Inducción experimental de COD.....	63
II.1.2.1. Animales.....	63
II.1.2.2. Grupos experimentales.....	64
II.1.2.3. Monitoreo de los cambios ováricos.....	65
II.1.2.4. Toma de muestras.....	66
III.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	67
III.2.1. Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas.....	69
III.2.2. Procesamiento de las muestras para Western Blot.....	69
III.3. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES EN SUERO Y LÍQUIDO FOLICULAR.....	70
III.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MIEMBROS DE TGF- β	71
III.4.1. Inmunohistoquímica.....	71
III.4.2. Western Blot.....	73
III.4.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	76
III.4.4. Análisis digital de imágenes.....	77
III.5. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA.....	78

IV- RESULTADOS	79
IV.1. RESULTADOS DE PROCEDIMIENTOS REALIZADOS CON ANIMALES.....	80
IV.1.1. Diagnóstico y obtención de muestras provenientes de casos de COD espontánea identificados “a campo”.....	80
IV.1.2. Inducción de la enfermedad quística ovárica.....	82
IV.1.3. Efecto de la ACTH sobre los niveles de hormonas esteroides.....	84
IV.1.4. Concentración de hormonas esteroides en suero y líquido folicular....	86
IV.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE LA SUBFAMILIA TGF- β MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	88
IV.2.1. Determinación de la especificidad de los Anticuerpos utilizados.....	88
IV.2.2. TGF- β 1.....	88
IV.2.3. TGF- β 2.....	93
IV.2.4. TGF- β 3.....	96
IV.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE ACTIVINA, INHIBINA Y FOLICULOSTATINA MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	100
IV.3.1. Determinación de la especificidad de los Anticuerpos utilizados.....	100
IV.3.2. Activina.....	101
IV.3.3. Foliculostatina.....	105
IV.3.4. Inhibina.....	110
IV.4. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE INHIBINA EN LÍQUIDO FOLICULAR Y SUERO.....	111
V- DISCUSIÓN	113
V.1. INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA Y RELACIONES CON LOS HALLAZGOS EN LA ENFERMEDAD QUE SE PRESENTA DE MANERA ESPONTÁNEA EN BOVINOS.....	114
V.2. EXPRESIÓN DE TGF- β EN LA FOLICULOGÉNESIS NORMAL Y EN ANIMALES CON COD ESPONTÁNEA E INDUCIDA.....	117
V.3. EXPRESIÓN DE ACTIVINA, INHIBINA Y FOLICULOSTATINA EN LA FOLICULOGÉNESIS NORMAL Y EN ANIMALES CON COD ESPONTÁNEA E INDUCIDA.....	120
VI- CONCLUSIONES	128
VII-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

ABREVIATURAS UTILIZADAS

β-HB	β-hidroxibutirato
μm	micrómetros
°C	Grados centígrados
3-β-HSD	3-β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa
AC	Folículos atrésicos del grupo control
ACTH	Adrenocorticotrofina
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AESP	Folículos atrésicos del grupo con COD espontánea
AGNE	Ácidos grasos no esterificados
AIND	Folículos atrésicos del grupo con COD inducida
AMH	Hormona anti-mulleriana
ANOVA	Análisis de la varianza
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BEN	Balance energético negativo
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
BMP	Proteína morfogénica del hueso
CC	Condición corporal
CL	Cuerpo lúteo
COD	Enfermedad quística ovárica
CRH	Hormona liberadora de corticotrofina
Cyp17	Citocromo P450 17α-hidroxilasa/17,20-liasa
Cyp19	Citocromo P450 aromatasa 19A
DAB	Diaminobencidina
DE	Desvío estándar
dpi	Puntos por pulgada
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FGF-2	Factor de crecimiento fibroblástico básico
FSH	Hormona foliculoestimulante

FSHr	Receptor de la hormona foliculoestimulante
G	Granulosa
GDF	Factor de desarrollo y diferenciación
GDNF	Factor neurotrófico derivado de las células gliales
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
hs	Horas
IGF-1	Factor de crecimiento análogo a insulina-1
IGFs	Factores de crecimiento análogos a insulina
IgG	Inmunoglobulina G
IM	Intramuscular
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramo
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
KL	Kit ligando
LBCMA	Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada
LF	Líquido folicular
LH	Hormona luteinizante
LHr	Receptor de hormona luteinizante
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
mA	Miliampéres
MANOVA	Análisis multivariante de varianza
MEC	Matriz Extracelular
mg	Miligramos
MHz	Megahertzios
ml	Militros
mm	Milímetros
mm Hg	Milímetros de mercurio
ng	Nanogramo
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NTs	Neutropinas
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	buffer fosfato salino

PC	Folículos primarios del grupo control
PESP	Folículos primarios del grupo con COD espontánea
pg	Picogramo
PGF2α	Prostaglandina F2α
PIND	Folículos primarios del grupo con COD inducida
PM	Peso molecular
QESP	Quistes espontáneos
QI	Quistes inducidos con ACTH
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa
SC	Folículos secundarios del grupo control
SDS	Sodio Dodecil Sulfato
SESP	Folículos secundarios del grupo con COD espontánea
SIND	Folículos secundarios del grupo con COD inducida
SNC	Sistema nervioso central
TBS-T	Buffer Tris Salino-Tween
TC	Folículos terciarios del grupo control
TE	Teca externa
TESP	Folículos terciarios del grupo con COD espontánea
TGF	Factor de crecimiento transformante
TGF-α	Factor de crecimiento transformante-α
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante β1
TGF-β2	Factor de crecimiento transformante β2
TGF-β3	Factor de crecimiento transformante β3
TI	Teca interna
TIND	Folículos terciarios del grupo con COD inducida
UI	Unidades internacionales
USA	Estados Unidos de América
UV	Ultravioleta
V	Voltios
WB	Western Blot
ZP	Zona pelúcida

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación morfológica de folículos ováricos según otros autores (Braw-Tal and Yossefi, 1997; Fortune, 2003; Palma, 2008; Aerts and Bols, 2010).....	11
Tabla 2.	Localización de las isoformas de TGF- β en el ovario bovino. Adaptado de Nilsson <i>et al.</i> , 2003...	42
Tabla 3.	Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.....	71
Tabla 4.	Marcadores de PM para SDS-PAGE, amplio espectro (Kaleidoscope Prestained Standards 161-0324. Bio-Rad).....	74
Tabla 5.	Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de western blot.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Anatomía del ovario. Adaptado de Fernández Sánchez, 2008.....	8
Figura 2.	Principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento. Imagen modificada y adaptada a la clasificación de Dellman and Eurell (1998) que muestra el esquema de los diferentes tipos de folículos y microfotografías representativas. Copyright © 2004 Lippincott & Wilkins.....	10
Figura 3.	Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipofisario-ovario-útero. Adaptado de Gartner y Hiatt, 1997 y Schillo, 2008.....	15
Figura 4.	Progresión folicular a través de las sucesivas etapas de desarrollo y su respuesta a las gonadotropinas hipofisarias. Adaptado de Knight and Glister, 2006.....	19
Figura 5.	Esquema representativo del reclutamiento folicular. Adaptado de McGee and Hsueh, 2000.....	21
Figura 6.	Interacciones endócrinas y foliculares del ciclo estral bovino. Adaptado de Aerts and Bols, 2010..	26
Figura 7.	Comunicación bidireccional entre las células de la teca y granulosa y células de la granulosa y el ovocito. Adaptado de Knight and Glister 2006.....	44
Figura 8.	Señalizaciones (+VE, estimulante; -VE, inhibidora) que participan en la transición de folículo primordial a primario. Adaptado de Knight and Glister, 2006.....	47
Figura 9.	Factores locales involucrados en la transición de folículo primario a folículo preantral/antral. Adaptado de Oktem and Urman, 2010.....	51
Figura 10.	Resumen de las posibles funciones de los miembros de la superfamilia TGF- β en los diferentes estadios de desarrollo folicular. Adaptado de Knight and Glister, 2006.....	58
Figura 11.	Técnica de aspirado folicular guiada por ecografía.....	62
Figura 12.	Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje transvaginal.....	63
Figura 13.	Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes foliculares mediante ACTH.....	65
Figura 14.	Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje por flanco izquierdo.....	67
Figura 15.	Esquema de muestras que arriban al laboratorio.....	68
Figura 16.	(A) Imagen ecográfica de un quiste espontáneo siendo aspirado mediante la técnica de aspiración folicular guiada por ecografía. (B) Ovarios de una vaca con COD espontánea obtenidos mediante ovariectomía bilateral.....	81
Figura 17.	Características morfológicas de los folículos preovulatorios y quísticos al momento de la extracción mediante ovariectomía.....	83
Figura 18.	Concentraciones séricas de estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en animales control y tratados con ACTH durante el protocolo experimental.....	85
Figura 19.	Concentración de estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en suero y líquido folicular de animales control, tratados con ACTH y animales COD espontánea, al momento de la ovariectomía.....	87

Figura 20.	Estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para TGF- β 1 en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea (X40).....	89
Figura 21.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 1 en células de la granulosa de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP).....	90
Figura 22.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 1 en células de la teca interna de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP).....	91
Figura 23.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 1 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo control (C).....	91
Figura 24.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 1 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD inducida (IND).....	92
Figura 25.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 1 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD espontánea (ESP)....	92
Figura 26.	Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para TGF- β 2 en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea (X40).....	93
Figura 27.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 2 en células de la granulosa de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP).....	94
Figura 28.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 2 en células de la teca interna de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP).....	94
Figura 29.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 2 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo control (C).....	95
Figura 30.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 2 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD inducida (IND).....	95
Figura 31.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 2 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD espontánea (ESP)....	96
Figura 32.	Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para TGF- β 3 en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea (X40).....	97
Figura 33.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 3 en células de la granulosa de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP).....	98
Figura 34.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 3 en células de la teca interna de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP).....	99
Figura 35.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 3 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo control (C).....	99
Figura 36.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 3 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD inducida (IND).....	100
Figura 37.	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 3 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S:	100

Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD espontánea (ESP)....

Figura 38.	Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para activina en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea (X40).....	101
Figura 39.	Porcentaje de área inmunomarcada para activina en células de la granulosa de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP).....	102
Figura 40.	Porcentaje de área inmunomarcada para activina en células de la teca interna de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP).....	103
Figura 41.	Porcentaje de área inmunomarcada para activina de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo control (C).....	104
Figura 42.	Porcentaje de área inmunomarcada para activina de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD inducida (IND).....	105
Figura 43.	Porcentaje de área inmunomarcada para activina de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD espontánea (ESP)....	105
Figura 44.	Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para foliculostatina en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea (X40).....	106
Figura 45.	Porcentaje de área inmunomarcada para foliculostatina en células de la granulosa de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP).....	107
Figura 46.	Porcentaje de área inmunomarcada para foliculostatina en células de la teca interna de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP).....	108
Figura 47.	Porcentaje de área inmunomarcada para foliculostatina de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo control (C).....	109
Figura 48.	Porcentaje de área inmunomarcada para foliculostatina de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD inducida (IND)....	109
Figura 49.	Porcentaje de área inmunomarcada para foliculostatina de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD espontánea (ESP)	109
Figura 50.	Vista panorámica de un corte histológico de ovario del grupo CONTROL inmunomarcado para inhibina (X4).....	110
Figura 51.	Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para inhibina en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea (X40).....	110
Figura 52.	Porcentaje de área inmunomarcada para inhibina en células de la granulosa de varios tipos foliculares (T: Terciarios y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP).....	111
Figura 53.	Concentración de inhibina en suero (A) y líquido folicular (B) de animales control (proestro) y con COD espontánea.....	112

RESUMEN

El objetivo de la presente tesis fue evaluar la localización y expresión ovárica de algunos de los componentes de la superfamilia TGF- β y proteínas relacionadas que podrían participar en la patogenia de la enfermedad quística ovárica bovina. Se utilizaron muestras provenientes de animales con la enfermedad espontánea y muestras provenientes de la enfermedad inducida mediante la administración de ACTH así como de controles de animales en proestro. Se realizó la extracción de muestras ováricas en todos los grupos y se realizaron las determinaciones hormonales correspondientes a hormonas esteroides e inhibina tanto a nivel sérico como folicular y se evaluó la expresión de proteínas en las diferentes estructuras ováricas mediante inmunohistoquímica. Los factores de crecimiento TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 presentaron variaciones en su expresión a lo largo de la foliculogénesis y se observó una sobreexpresión en quistes espontáneos. La expresión de activina y foliculostatina mostró una relación directa con estadio de desarrollo folicular, mientras que la inhibina sólo fue encontrada en folículos antrales de mayor tamaño y en quistes, con modificaciones entre la expresión proteica y su concentración sérica y folicular. Estos resultados concuerdan en parte con los hallados por otros autores y podrían justificar algunos cambios en las concentraciones de hormonas esteroides evaluadas. Además los resultados obtenidos en esta tesis sumados a resultados previos podrían contribuir a la hipótesis de que la etiopatogenia de la enfermedad está influenciada por múltiples factores que actúan tanto a nivel sistémico, alterando el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, así como a nivel intraovárico, contribuyendo a la persistencia de las estructuras foliculares por periodos anormales de tiempo y alterando la normal foliculogénesis. Por

otra parte, podemos concluir que el modelo experimental utilizado es válido para el estudio de esta enfermedad desde etapas tempranas del desarrollo de la misma.

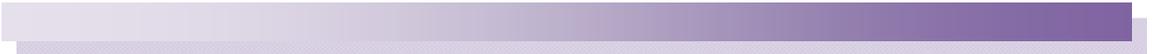
Palabras Claves: enfermedad quística ovárica, bovino, superfamilia de TGF- β , foliculostatina.

SUMMARY

The aim of this thesis was to evaluate the location and ovarian expression of some components of the TGF- β and related proteins that could be involved in the pathogenesis of bovine COD. Samples were obtained from spontaneous and induced cysts with ACTH, as well as control animals. Sampling was performed both from the experimental model and spontaneous COD and steroid hormones concentrations and inhibin was measure in serum and follicular fluid. Proteins expression levels were evaluated by immunohistochemistry. TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 expression showed variations throughout folliculogenesis and were overexpressed in spontaneous cysts. Activin and follistatin expression showed a direct relationship with the stage of follicular development, while inhibin expression was found only in larger antral follicles and cysts, with modifications between protein expression and its serum and follicular concentration. These results agree in part with those found in the literature and could account for some changes in steroid hormones concentrations evaluated. In addition, the results obtained in this thesis together with previous works could contribute to the hypothesis that the pathogenesis of the disease is influenced by multiple factors, acting both systemically by altering the hypothalamic-pituitary-gonadal and intraovarian level, and contributing to the abnormal persistence. Moreover, it can be concluded that the model used is valid for the study of this disease from early stages.

Keywords: cystic ovarian disease, bovine, TGF- β superfamily, follistatin.

I. INTRODUCCIÓN



I- INTRODUCCIÓN

Los ovarios desempeñan dos funciones principales, la producción de óvulos y la secreción de hormonas y ambas funciones se relacionan íntimamente con la eficiencia reproductiva de los bovinos. En este sentido, es la eficiencia reproductiva el factor que más afecta los resultados productivos y económicos en la producción de leche y carne.

La Enfermedad Quística Ovárica, del inglés *cystic ovarian disease* (COD), es uno de los desórdenes reproductivos más comunes en las vacas lecheras, presentándose también en animales destinados a la producción de carne aunque con menor frecuencia. Se ha descrito que en diferentes tipos de rodeos, los quistes foliculares pueden afectar hasta un 15% de las vacas durante el período post-parto, prolongando el intervalo parto-concepción y provocando pérdidas significativas a la producción pecuaria en general (Silvia *et al.*, 2005). Además, en muchos casos, los quistes normalmente son acompañados por la expresión de conducta sexual receptiva (estro), resultando en costos adicionales por las infructuosas inseminaciones artificiales realizadas (Webb *et al.*, 1998).

Entre los años 1940 y 1950 se publicaron numerosos reportes acerca de la morfología ovárica, las observaciones clínicas y la epidemiología de esta enfermedad (Casida *et al.*, 1944; Garm, 1949; Casida and Chapman, 1951; Wiltbank *et al.*, 1953). La mayoría de esos investigadores postulaban al desbalance endócrino como la principal causa de la formación de quistes. Esto llevó a la aparición de una gran cantidad de tratamientos basados en la administración de hormonas, incluyendo esteroides (Johnson and Ulberg, 1967), gonadotropinas (Casida *et al.*, 1944; Nakao *et al.*, 1978) y GnRH (Kesler and Garverick, 1982; Nanda *et al.*, 1988). Sin embargo, la

mayoría de estos tratamientos no poseían un sustento teórico adecuado (Silvia *et al.*, 2002).

A pesar de que la enfermedad ha sido ampliamente estudiada en relación a su diagnóstico y tratamiento (Nanda *et al.*, 1991; Opsomer *et al.*, 1996; Christopher and Devanathan, 1997; Agarwal and Shankar, 1998; Sharma, 1998; Calder *et al.*, 1999; Douthwaite and Dobson, 2000), actualmente se conoce poco acerca de los mecanismos que causan su desarrollo y de los cambios que ocurren principalmente a nivel ovárico (Kesler and Garverick, 1982; Yoshioka *et al.*, 1998; Heuer *et al.*, 1999; Ribadu *et al.*, 1999, 2000; Salvetti *et al.*, 2010, 2012).

En este sentido, se ha determinado claramente que la progresión a través de los estadios de desarrollo folicular requiere de una comunicación bidireccional entre el ovocito y las células de la granulosa así como entre estas últimas y las de la teca (Eppig, 2001). Esta comunicación es dependiente de las apropiadas y cronometradas señales endocrinas de las gonadotropinas hipofisarias y las hormonas metabólicas, las cuales actúan sobre los receptores de las células somáticas e interactúan con una miríada de factores producidos localmente operando de manera autocrina/paracrina para coordinar y controlar la función celular. Muchas de las moléculas implicadas en este diálogo pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β ; Knight and Glister 2006; Webb *et al.*, 2007). Dentro de ellos, algunos de los más reconocidos son: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, BMP (del inglés: *Bone Morphogenetic Protein*: proteína morfogénica del hueso), AMH (del inglés: *anti-Mullerian Hormone*: hormona anti-mulleriana), activina e inhibina.

Conocer la expresión de los principales componentes de la superfamilia TGF- β en folículos de ovarios normales y en aquellos de ovarios quísticos, con su posterior

comparación y establecimiento de inferencias, es el resultado fundamental que cabe esperar a partir de esta investigación. Esto contribuiría a conocer con mayor profundidad algunos de los cambios que ocurren a nivel intraovárico en situaciones patológicas, lo cual constituye un verdadero enigma del conocimiento actual en el estudio de la enfermedad quística ovárica.

Este trabajo de tesis tiene importancia en el incremento de conocimientos relacionados a las alteraciones reproductivas del ganado bovino, debido a la implicancia de las mismas no sólo para productores agropecuarios individuales sino para la economía del país, debido a las enormes pérdidas económicas y en la producción de alimentos de demanda mundial, como lo son la leche y la carne bovina.

I.1. HIPÓTESIS

Se plantea como hipótesis general que una alteración en la expresión de ciertos componentes de la superfamilia de TGF- β y proteínas relacionadas podría afectar el normal desarrollo folicular, siendo parte de la etiopatogenia de la enfermedad quística ovárica bovina.

I.2. OBJETIVOS

I.2.1. General:

Estudiar la localización y expresión ovárica de algunos de los componentes de la superfamilia de TGF- β y proteínas relacionadas que podrían participar en las modificaciones ováricas relacionadas a la COD en bovinos.

I.2.2. Específicos:

- a) Identificar y obtener muestras de COD espontánea diagnosticada a campo.
- b) Inducir experimentalmente la COD en hembras bovinas.
- c) Determinar los niveles séricos e intrafoliculares de hormonas esteroides y cortisol en animales con COD espontánea e inducida, relacionándolos con el resto de las variables estudiadas.
- d) Determinar la expresión de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 en la pared de folículos ováricos quísticos.
- e) Determinar la expresión de activina, inhibina y foliculostatina en la pared folicular de quistes ováricos.
- f) Cuantificar los niveles de inhibina en líquido folicular y en suero de vacas sanas como en aquellas con COD espontánea, como posibles indicadores tempranos de disfunción ovárica.
- g) Comparar estadísticamente los hallazgos obtenidos en vaquillonas con COD inducida experimentalmente, con aquellos realizados en ovarios de animales diagnosticados “a campo”, con la finalidad de validar el modelo experimental utilizado.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



II- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. HISTOFISIOLOGÍA OVÁRIVA

Los ovarios son órganos esenciales para la reproducción en la hembra. Puede decirse que son de naturaleza doble: endocrina y citógena (productora de células), pues a la vez que elaboran hormonas que van a la circulación, producen los ovocitos, posteriormente expulsados por la glándula (Frandsen and Spurgeon, 1995). Esta dualidad funcional es complementaria, puesto que la fecundación del ovocito requiere de ciertos cambios en el aparato genital (oviductos, útero, vagina e incluso en el mismo ovario) que están asociados a las hormonas sexuales (García Sacristán, 1995; Urroz, 2010).

La estructura del ovario normal varía enormemente con la especie, la edad y la fase del ciclo sexual. En el bovino, esta glándula está constituida por una médula interna y una corteza externa, rodeada por el epitelio superficial, comúnmente llamado epitelio germinativo (Hafez and Hafez, 2000). La médula es el área compuesta principalmente por tejido conectivo en la que se encuentran gran cantidad de nervios, vasos sanguíneos y linfáticos, así como también los componentes de la *rete ovarii* (figura 1); mientras que la corteza contiene folículos en distintos estadios de desarrollo, cuerpos lúteos y cuerpos blancos inmersos en una malla de tejido conectivo muy celular que da sostén y es origen de varios de los componentes de los folículos (células tecales) y posteriores cuerpos lúteos (Dellmann and Eurell, 1998).

El ovario de los mamíferos es, por lo tanto, un órgano heterogéneo en cuanto a la población celular presente en un momento dado, y también lo es a lo largo del tiempo. Las gametas femeninas en el ovario adulto, los ovocitos, se encuentran rodeados por una o más capas de células que cumplen múltiples funciones, como protección,

nutrición y sostén, que crecen gradualmente en número y forman eventualmente un folículo esférico lleno de líquido (Geneser, 2005). El folículo es el compartimiento que permite al ovario cumplir su doble función de gametogénesis y esteroidogénesis. Es una unidad fisiológica equilibrada cuyo funcionamiento y estructura dependen de factores externos y locales, los que llevan a una sucesión de transformaciones subcelulares y moleculares en sus diversos componentes: el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca (Hafez and Hafez, 2000).

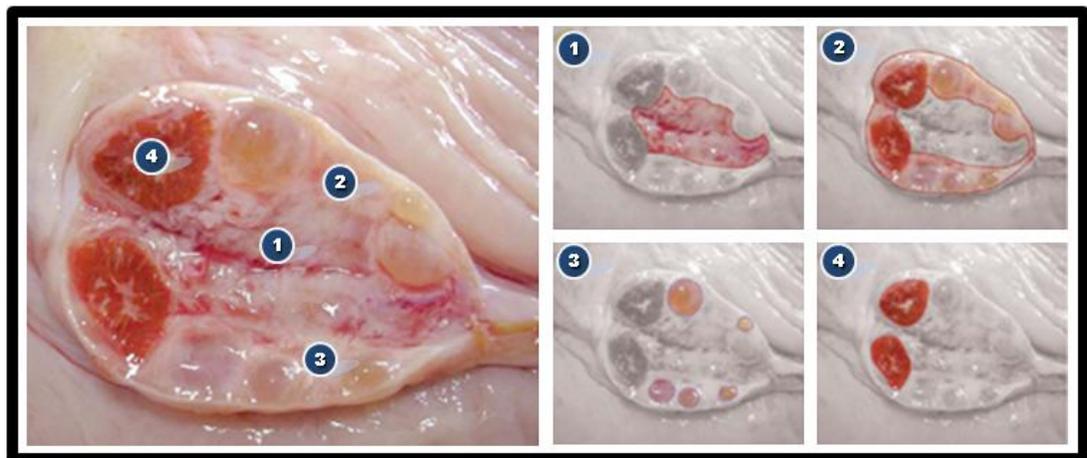


Figura 1: Anatomía del Ovario. El ovario se compone de dos zonas: región medular (1) (abarca la región central del ovario y se forma de tejido conectivo, vasos y nervios) y la región cortical (2) (contiene folículos en diferentes estadios de desarrollo (3), cuerpos lúteos (4) y el estroma ovárico). Adaptado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

II.1.1. Foliculogénesis y clasificación folicular

La conformación de los *folículos primordiales* comienza con un ovocito rodeado, en forma incompleta, de células planas (escamosas) llamadas pre-granulosas o células foliculares. Los mismos, constituyen el reservorio de folículos “en reposo”, también conocido como “reserva folicular”, los cuales se agotan progresivamente a lo largo de la vida fértil de la hembra (Priedkalns, 1993; Nilsson and Skinner, 2001). Cuando algunos de estos folículos primordiales salen de la reserva e inician su maduración, sus células

foliculares se transforman de un epitelio plano simple a uno cúbico, dando lugar a los denominados *foliculos primarios* (Priedkalns, 1993).

La transformación del folículo primario a *folículo secundario o preantral* implica diversos cambios en las células foliculares que rodean al ovocito, entre los que se destacan la intensa división mitótica y consiguiente estratificación paulatina del epitelio que originalmente era simple. En este momento las células pasan a denominarse granulosas. Los folículos secundarios se caracterizan por el desarrollo de la *zona pelúcida* (ZP), una capa glicoproteica de 3 a 5mm 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* (Dellmann and Eurell, 1998).

Conforme crecen y proliferan las células granulosas y tecaes, 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* (figura 2). Estas transformaciones dan lugar a los *foliculos terciarios* (multilaminares, antrales y en crecimiento) o también llamados *foliculos 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 ovífero* (Dellmann and Eurell, 1998).

El estrato granuloso en los folículos antrales está rodeado por la teca, que se diferencia en dos capas: una interior, glandular y vascularizada, llamada teca interna, y otra exterior, formada por tejido conectivo y, en algunos casos, células musculares lisas, denominada teca externa. La membrana basal que limita la capa de células de la

granulosa y las separa de la teca interna se encuentra muy desarrollada en este estadio. En los folículos terciarios grandes las células de la granulosa que rodean íntimamente al ovocito se vuelven cilíndricas y se disponen radialmente formando la *corona radiada* que nutre al ovocito. Estas células permanecen junto al ovocito incluso después de la ovulación en la mayoría de las especies. (Dellmann and Eurell, 1998).

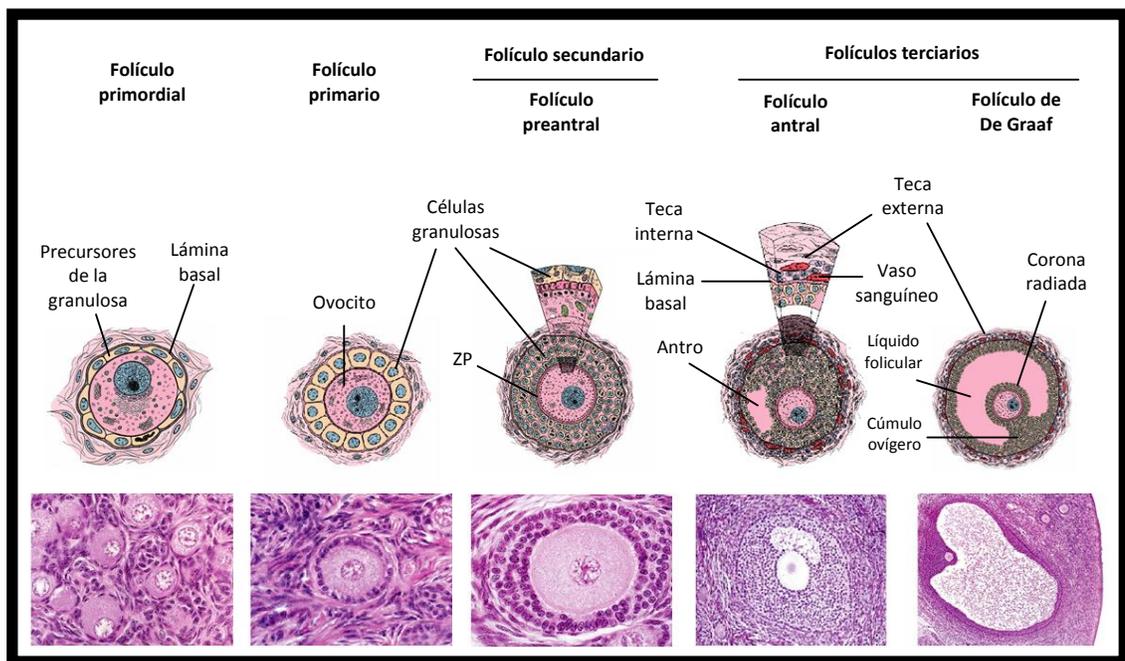


Figura 2. Principales Categorías de Folículos en Reposo y en Crecimiento. Imagen modificada y adaptada a la clasificación de Dellman and Eurell (1998) que muestra el esquema de los diferentes tipos de folículos y microfotografías representativas. Copyright © 2004 Lippincott & Wilkins.

Existen otras clasificaciones de los folículos ováricos (tabla 1) utilizadas por diversos investigadores que consideran las características mencionadas anteriormente y que presentan algunas variaciones (Braw-Tal and Yossefi, 1997; Fortune, 2003; Palma, 2008; Aerts and Bols, 2010). En la presente tesis utilizamos la clasificación detallada previamente de Dellman and Eurell (1998).

Tabla 1: Clasificación morfológica de folículos ováricos según otros autores (Braw-Tal and Yossefi, 1997; Fortune, 2003; Palma, 2008; Aerts and Bols, 2010).

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

II.1.2. Regulación del crecimiento y desarrollo folicular

II.1.2.1. Regulación endocrina

El proceso reproductivo de los mamíferos está regulado por una cascada compleja, a través de la combinación de actividades del sistema nervioso central, ciertos tejidos secretores, tejidos diana y varias hormonas. El sistema nervioso central (SNC) recibe información del entorno del animal (estímulos visuales, olfativos, auditivos y táctiles) y transmite la información relevante para la reproducción a las gónadas mediante el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal-uterino (Hafez and Hafez, 2000; Callejas, 2001).

El sistema hipotálamo-hipofisario coordina el proceso que destina a un folículo a ovular mediante el control del ciclo estral en los animales. El factor que regula la función reproductiva es un decapeptido denominado hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual es sintetizada en núcleos neurales 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 actúa sobre las células gonadotropas de la hipófisis anterior, que son las encargadas de

sintetizar la hormona luteinizante (LH) y la foliculoestimulante (FSH), y, tras su unión a receptores de alta afinidad expuestos en la membrana, estimula la liberación de estas gonadotropinas. Es indispensable que su secreción se dé en forma pulsátil, para la secreción normal de gonadotropinas hipofisarias (Hillier, 2001).

Las gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH) son hormonas glicoproteicas formadas por dos cadenas polipeptídicas α y β . La subunidad α es idéntica en las dos hormonas y le confiere la especificidad de especie y la subunidad β difiere y genera la especificidad biológica. Para que la hormona tenga acción biológica es necesaria la presencia de las dos subunidades y su mecanismo de acción se ejerce a través de la unión de la hormona a receptores ubicados en la membrana celular (Bousfield *et al.*, 1994; Hafez and Hafez, 2000; Callejas, 2001).

Tanto la FSH como la LH son secretadas a la circulación en forma de pulsos y son reguladas por dos sistemas: el tónico o generador de pulsos de la GnRH, y el cíclico o generador del pico preovulatorio de GnRH (Hafez and Hafez, 2000; Callejas, 2001; Hillier, 2001; Geneser, 2005). El primero, produce el nivel basal circulante, siempre presente, de hormonas hipofisarias, las cuales promueven el desarrollo de los elementos germinales y endocrinos de las gónadas. El segundo, opera agudamente, siendo evidente por sólo 12 a 24 horas en cada uno de los ciclos reproductivos de la hembra. El modo cíclico tiene por función desencadenar el pico preovulatorio de LH y, en consecuencia, la ovulación (Callejas, 2001; Hillier, 2001; Geneser, 2005).

Además de requerir la pulsatilidad de GnRH, existe una regulación por parte de las hormonas ováricas tanto en la hipófisis como en el hipotálamo. 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 FSH y 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 foliculostatina, que son producidos por los folículos antrales y complementan el efecto del estradiol (Wiltbank *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2008; Rey *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2011).

La respuesta diferencial al mismo ambiente de FSH parece ser fundamental en la selección del folículo dominante y en la regresión de los folículos subordinados. Varios factores de crecimiento peptídicos, incluyendo los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y el sistema del factor de crecimiento análogo a la insulina (*insulin-like growth factor*, IGF), están involucrados en el desarrollo folicular (Evans *et al.*, 2009).

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 esteroidogénica del folículo maduro. Estos eventos responden a cambios en los patrones de expresión de los receptores de gonadotropinas (LHr y FSHr) así como de enzimas esteroidogénicas (citocromo P450 aromatasa o Cyp19-, 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa o 3- β -HSD) que ocurren en este estadio del desarrollo folicular y en cada uno de los estratos celulares que integran los folículos (Bao and Garverick, 1998; Webb *et al.*, 1999; Zurvarra *et al.*, 2009; Pretheeban *et al.*, 2010; Alfaro *et al.*, 2012). Por otro lado, las concentraciones séricas basales de LH, interaccionan con los receptores gonadotrópicos presentes en las células de la teca interna de los folículos antrales y estimulan la producción de andrógenos. 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 la Cyp19 (aromatasa). 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, debido a la presencia de receptores de LH en las células de la granulosa de los folículos maduros (Bodensteiner *et al.*, 1996; Robert *et al.*, 2003). Este aumento en el número total de LHR 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 *et al.*, 1994; Wiltbank *et al.*, 2002; Mihm and 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 *cuero hemorrágico*. Las células de la granulosa aumentan de tamaño, se multiplican bajo el estímulo 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 (células luteínicas pequeñas). La LH hace que las células de la granulosa y de la teca alcancen el grado de máxima diferenciación al convertirse en células luteínicas, productoras de *progesterona*, hormona necesaria para el mantenimiento de la gestación. En la vaca, el cuerpo lúteo está totalmente desarrollado y vascularizado a los seis días de la ovulación, pero continúa creciendo hasta el duodécimo día, en el que alcanza un

diámetro aproximado de 25 mm. La progesterona producida en altas concentraciones por dicha glándula es esencial para el mantenimiento de la preñez temprana, y controla (inhibe), mediante el sistema de retroalimentación negativa, los niveles de LH hipofisaria (Day and Anderson, 1998).

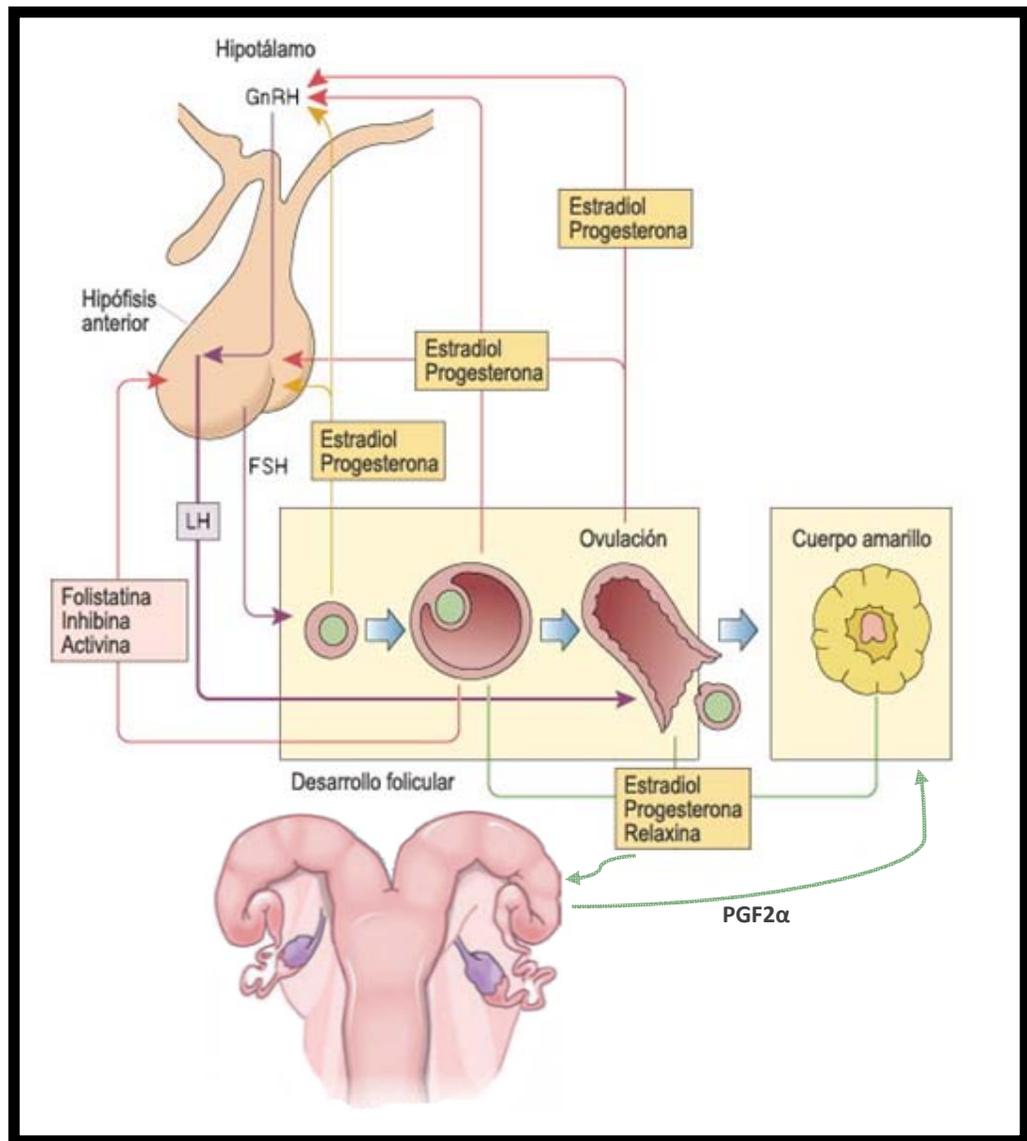


Figura 3: Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipofisario-ovario-útero. Adaptado de Gartner y Hiatt (1997) y Schillo (2008).

Finalmente, y considerado por algunos autores como una parte más que se agrega al eje hipotálamo-hipófisis-gónada, se encuentra el útero, que es el responsable de la secreción de prostaglandina F2 α (PGF2 α) (Shemesh *et al.*, 1997; Callejas, 2001; Schillo, 2008). Esta hormona, secretada en forma pulsátil, interviene en la regulación neuroendocrina del ciclo estral a través de su efecto luteolítico, y permite el inicio de un nuevo ciclo estral en ausencia de fecundación (Hafez and Hafez, 2000; Callejas, 2001; Ungerfeld, 2002, Adams, 2008).

II.1.2.2. Factores reguladores autocrinos y paracrinos

Es ampliamente reconocido que FSH y LH regulan tanto las funciones ováricas como las testiculares. Sin embargo, es difícil explicar los procesos reproductivos como la foliculogénesis, la selección folicular y la maduración del ovocito sólo con base en los cambios en las concentraciones de gonadotropinas (Hafez and Hafez, 2000).

En los estadios foliculares tempranos, las gonadotropinas parecen no ser un requisito definitivo para el desarrollo folicular (Campbell *et al.*, 2003; Webb *et al.*, 2003; Hunter *et al.*, 2004). En ese momento, son los factores locales los que regulan el proceso de foliculogénesis. Los folículos primordiales permanecen en una fase latente hasta ser reclutados en la primera etapa de crecimiento y convertirse en primarios. El pensamiento tradicional propone que en lugar de una sola vía de señalización, una orquesta multidireccional de comunicación entre el ovocito y células somáticas (células de la granulosa y de la teca) a través ciertos componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento, actuando en forma autocrina y paracrina, juegan un papel en esta transición y posterior crecimiento de los folículos (Oktay *et al.*, 1997, 2000; Eppig, 2001; Skinner, 2005). Sin embargo, estudios recientes demostraron que existen, de

hecho, algunas señales inhibitorias que mantienen a los folículos primordiales en estado latente, evitando su activación. La pérdida de alguna de estas moléculas inhibitorias, tales como la hormona anti-mulleriana (AMH), conduce a la prematura activación del pool de folículos primordiales y el agotamiento de la reserva folicular (Castrillon *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2008; Adhikari *et al.*, 2010; Oktem and Urman, 2010).

Los factores autocrinos y paracrinos involucrados en el desarrollo y diferenciación folicular incluyen a proteínas y hormonas (Hussein, 2005; Skinner, 2005; Song and Wessel, 2005; Van der Hurk and Zhao, 2005; Pangas and Rajkovic, 2006; Palma, 2008). Dentro de ellos, se pueden citar a las neutropinas (NTs) que son miembros de la familia del factor de crecimiento nervioso (*nerve growth factor*, NGF), el ligando Kit (*Kit ligand*, KL), el factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF), el factor de crecimiento transformante-alfa (*Transforming growth factor- α* , TGF- α), el factor de crecimiento de queratinocitos (*keratinocyte growth factor*, KGF; también conocido como factor de crecimiento fibroblástico-7, FGF-7), el factor de crecimiento fibroblástico básico (*basic fibroblast growth factor*, bFGF; también conocido como FGF-2), el factor inhibidor de la leucemia (*leukemia inhibitory factor*, LIF), el IGF con sus receptores y proteínas de unión, y todos los miembros de la superfamilia del TGF- β (Durlinger *et al.*, 2002; Nilsson *et al.*, 2002, Nilsson and Skinner, 2003, Nilsson and Skinner, 2004; Knight and Glister 2006; Webb *et al.*, 2007; Palma *et al.*, 2008; Oktem and Urman, 2010).

La función de estos factores es indispensable en la activación de los folículos primordiales en reposo, progresión de los folículos primarios a los estadios preantrales y antrales tempranos, desarrollo y maduración de los folículos antrales y mecanismo de selección folicular, ovulación, luteinización y formación del cuerpo lúteo (Massague

and Wotton, 2000; Nilsson and Skinner, 2004; Kezele *et al.*, 2005; Knight and Glister 2006; Webb *et al.*, 2007; Palma *et al.*, 2008; Oktem and Urman, 2010). La función específica de cada uno de ellos se detalla más adelante, haciendo especial hincapié en los miembros de la superfamilia del TFG- β .

II.1.3. Características de la dinámica ovárica en la hembra bovina

El perfeccionamiento de las técnicas para monitorear la concentración de hormonas y sus receptores, así como de la ultrasonografía para evaluar los cambios morfológicos en el ovario, han permitido una mayor comprensión del desarrollo folicular en el bovino. Rajakoski (1960), basado en estudios histológicos de los ovarios, fue el primer investigador que postuló una teoría planteando la existencia de ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. Sin embargo, esa teoría no fue rápidamente aceptada y generó controversias hasta finales de la década del 80, con trabajos a favor (Dufour *et al.*, 1971; Matton *et al.*, 1981; Ireland, 1987) o en contra (Staigmiller and England, 1982; Hansel and Convey, 1983; Spicer and Echtenkamp, 1986) de la teoría de ondas de Rajakoski (Bó and Caccia, 2002). Fue recién a partir del desarrollo y difusión de la ultrasonografía ovárica cuando se pudo documentar fehacientemente que el crecimiento folicular en el bovino ocurre a modo de ondas (Knopf *et al.*, 1988; Savio *et al.*, 1988; Sirios and Fortune, 1988). Desde ese momento se realizaron numerosos trabajos que demuestran que el patrón de ondas se repite en casi todos los estadios de la vida de la hembra, incluyendo el período prepúber (Evans *et al.*, 1994), la preñez (Ginther *et al.*, 1989) y el período posparto (Savio *et al.*, 1990; Bó and Caccia, 2002).

En primer lugar, cabe resaltar que las gonadotropinas probablemente no estén involucradas en la iniciación del crecimiento folicular, de tal manera que las etapas de

folículo primordial y primario dependen totalmente de factores autocrinos y paracrinos (Hunter *et al.*, 2004; Palma, 2008). A medida que el folículo crece y aumenta el número de células foliculares (folículo secundario o preantral), comienza a expresar receptores de FSH con capacidad de responder a ella, pero sin ser dependiente de FSH para su crecimiento (Oktem and Urman, 2010). De hecho, en las etapas tempranas del desarrollo folicular, las gonadotropinas parecen no ser un pre-requisito fundamental para el mismo (Campbell *et al.*, 2003; Webb *et al.*, 2003). Sin embargo, en las etapas tardías del crecimiento el folículo es claramente dependiente de las gonadotropinas (Hunter *et al.*, 2004). Los folículos antrales pequeños en el bovino, diámetro de 0,1 a 0,2 mm (figura 4), tienen una primera etapa de crecimiento hasta los 4 mm, con proliferación de las células de la granulosa regulada por FSH (no dependiente) y por factores de crecimiento (regulación autocrina y paracrina); una segunda etapa en la cual crecen de 4 a 9 mm y que es dependiente de FSH y de determinados factores de crecimiento como IGF-1 y una tercera etapa que va desde que el folículo alcanza los 10 mm hasta el tamaño preovulatorio (10–20 mm) en la cual es dependiente de LH, factores de crecimiento y concentraciones basales de FSH (Evans, 2009).

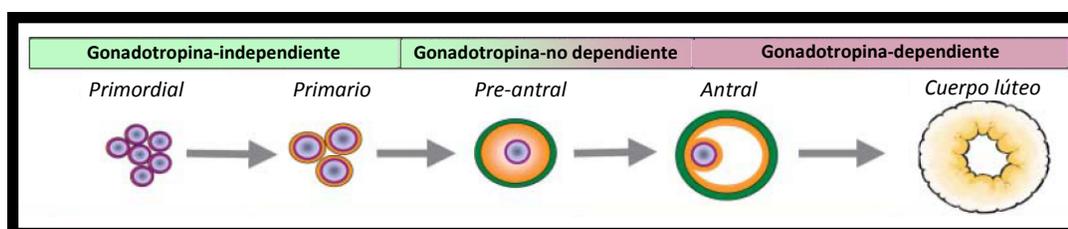


Figura 4. Progresión folicular a través de las sucesivas etapas de desarrollo y su respuesta a las gonadotropinas hipofisarias. Adaptado de Knight and Glistler (2006).

El desarrollo folicular durante el ciclo estral bovino se presenta típicamente bajo un patrón de 2 o 3 ondas, aunque ciclos de 1 o 4 ondas también han sido observados (Ghinter *et al.*, 1989; Bó and Caccia, 2002; Aerts and Bols, 2010). 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, seguido por atresia u ovulación del folículo dominante (Adams *et al.*, 2008; Forde *et al.*, 2011).

II.1.3.1.Reclutamiento

Existen dos tipos de reclutamiento, el inicial y el cíclico (figura 5). El reclutamiento *inicial* se da de forma continua y empieza en el preciso momento en que se han formado los folículos, casi inmediatamente después del nacimiento. Es el responsable de que los folículos primordiales salgan de su estado de reposo y comiencen una etapa de crecimiento. Durante el reclutamiento inicial, factores intraováricos y otros factores desconocidos, estimulan a un grupo de folículos primordiales a iniciar el crecimiento, mientras el resto permanece senescente durante meses o años. Este proceso podría deberse a la liberación de estímulos inhibitorios que hasta ese momento mantenían a los folículos en reposo (McGee and Hsueh, 2000).

El reclutamiento *cíclico*, en cambio, comienza antes de la llegada a la pubertad como resultado de un aumento en los niveles de FSH circulante o incrementos en la secreción de FSH de manera transitoria (Mihm and Austin, 2002; Espinoza-Villavicencio *et al.*, 2007). Esto permite que una cohorte de folículos en crecimiento sea rescatada del proceso de atresia (McGee and Hsueh, 2000), e implica el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos antrales (típicamente 5-10 folículos según Aerts and Bols, 2010; u 8-41 folículos según Adams *et al.*, 2008), identificables por ultrasonografía a partir de los 4 mm, que ocurre al mismo tiempo en los dos ovarios (Ginther *et al.*, 1989). La “ventana de reclutamiento” o sea el momento de la

emergencia folicular, es de 2 días en el bovino. La regresión del folículo dominante de una onda de crecimiento o la ovulación al final de un ciclo estral, provoca un aumento transitorio en las concentraciones circulantes de FSH. Esto se debe a que la pérdida del folículo dominante es acompañada por la disminución de los niveles de hormonas sintetizadas por el folículo, tales como estrógenos e inhibina, que conducen a través de un sistema de retroalimentación negativa, al aumento de la secreción hipofisaria de FSH. En consecuencia, la FSH es la principal responsable del reclutamiento de una nueva cohorte de folículos antrales durante el ciclo estral (Aerts and Bols, 2010).

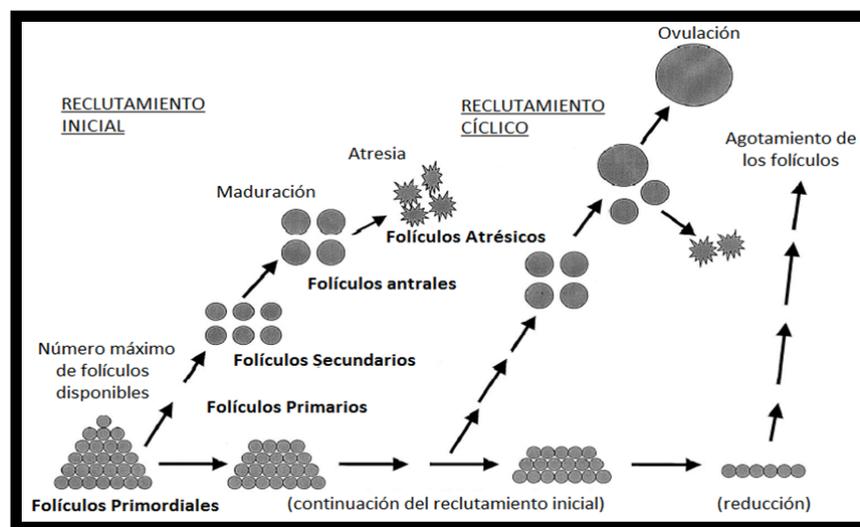


Figura 5: Esquema representativo del reclutamiento folicular. Adaptado de McGee and Hsueh (2000).

II.1.3.2. Selección y dominancia

La selección es el proceso por el cual un folículo es elegido, evita la atresia y tiene posibilidades de llegar a la ovulación. El folículo seleccionado a partir del grupo de folículos que emergieron se denomina folículo dominante, mientras los demás folículos de la onda se conocen como subordinados. La selección folicular ocurre al final de la

fase común de crecimiento (Ginther *et al.*, 2001). El folículo dominante crece a una tasa constante y el resto de los folículos subordinados sufren atresia o temporalmente crecen a una velocidad menor y posteriormente dejan de hacerlo (Beg *et al.*, 2002). A este fenómeno se le ha denominado desviación folicular (Ginther *et al.*, 1997).

En el ganado bovino europeo la desviación de la tasa de crecimiento de los dos folículos de mayor diámetro tiene inicio cuando el diámetro del futuro folículo dominante y el del subordinado son de 8,5 y 7,7 mm respectivamente, 2 a 3 días después de iniciada la oleada (Ginther *et al.*, 2002). En cambio, la desviación folicular en vaquillonas y vacas Nellore ocurre cuando el mayor de los folículos en crecimiento logra un tamaño de 5-6 mm de diámetro (Sartori and Barros, 2011).

II.1.3.3. Atresia folicular

Como consecuencia de que únicamente un pequeño porcentaje de los ovocitos potenciales son liberados por el ovario en cada ovulación, la mayoría de los folículos experimentan 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 del folículo (Hsueh *et al.*, 1994; Quirk *et al.*, 2004). 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 and Irving-Rodgers, 2010).

II.1.3.4. Ovulación y formación del cuerpo lúteo

Aquellos folículos terciarios que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración y han adquirido la habilidad para ovular ante los adecuados niveles de LH se denominan *folículos preovulatorios*. 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 sobresale de la superficie del ovario. Una serie de eventos deben ocurrir para que se produzca la ovulación: la pared folicular se adelgaza, se producen pequeñas hemorragias en la misma, se hace transparente en el lugar de la ruptura folicular (el *estigma*), que finalmente se rompe y el ovocito, junto con las células del cúmulo ovígero, es liberado (Dellmann y Eurell, 1998).

Luego de la ovulación, las capas foliculares se reorganizan para convertirse en el cuerpo hemorrágico en un principio y luego en el cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo es una glándula endocrina transitoria formada por las células foliculares remanentes del folículo que ha sido ovulado. Su principal función es la de secretar progesterona, la cual tiene numerosas funciones, entre ellas, el acondicionamiento del útero para el período de preñez y la regulación de las contracciones del oviducto para el transporte del óvulo hacia el útero (Dellmann and Eurell, 1998).

II.1.4. Interacciones endocrinas y foliculares: Integración de conceptos

Independientemente del patrón de desarrollo folicular del ciclo, la primera onda de desarrollo folicular se detecta el día de la ovulación (día 1). Al aproximarse el estro se registran dos picos de FSH 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). La segunda onda comenzará el día 9 o 10 para ciclos de 2 ondas y el día 8 o 9 en los ciclos de 3 ondas (Ginther *et al.*, 1989). En los ciclos de 3 ondas, la tercera emerge en el día 15 o 16. El cuerpo lúteo comienza la regresión más temprano en los ciclos de 2 ondas (día 16) que en los de 3 (día 19), afectando el intervalo interovulatorio (Ginther *et al.*, 1989). La duración del ciclo estral de la vaca depende de su patrón de desarrollo folicular para ser de 18 a 20 días (2 ondas) o de 21 a 23 días (3 ondas). En ambos casos, el folículo dominante en el momento que ocurre la luteólisis se torna en folículo ovulatorio (Bó and Caccia, 2002).

Durante mucho tiempo la dinámica de las concentraciones de gonadotropinas medidas durante el ciclo estral bovino, exceptuando las descargas preovulatorias de LH y FSH, no facilitaron una comprensión clara del rol de las gonadotropinas sobre la dinámica folicular (Bó and Caccia, 2002). Sin embargo, Adams *et al.* (1992a) demostraron que se producen incrementos de la concentración de FSH antes de la emergencia de cada onda. Esta descarga de FSH es aparentemente responsable del reclutamiento de los folículos y comienza 2 días antes de la emergencia de una onda folicular, para llegar al pico máximo 1 día antes o el día del comienzo de la onda (Adams *et al.*, 1992a). De esta manera, se observan 2 picos de FSH en los ciclos de 2 ondas y 3 picos de FSH en los ciclos de 3 ondas (Bó and Caccia, 2002).

El mecanismo por el cual en cada onda de desarrollo folicular uno de los folículos es seleccionado y se vuelve dominante, provocando la regresión del resto, no está completamente dilucidado. Los niveles de FSH más bajos ocurren alrededor del momento de la desviación folicular (Adams and Pierson, 1995), cuando el folículo dominante alcanzó alrededor de 8,5 mm y el subordinado 7,2 mm (Ginther *et al.*, 1996,

1997). En ese momento los niveles de FSH se encuentran por debajo de los niveles necesarios para el desarrollo de los folículos subordinados, que se atresian, mientras que el folículo dominante adquiere la habilidad de seguir creciendo con niveles bajos de FSH (Ginther, 2000). La razón por la cual esto ocurre puede estar relacionada con la síntesis de receptores de LH en las células de la granulosa del folículo dominante (Ginther *et al.*, 1996). Todos los folículos poseen receptores de LH en las células de la teca y de FSH en las células de la granulosa (Ireland, 1987) pero solo el folículo dominante adquiere receptores de LH en las células de la granulosa (Bó and Caccia, 2002). Los receptores de LH aumentan abruptamente a partir del día 4 de la onda, cuando el folículo dominante tiene más de 8 mm de diámetro (Xu *et al.*, 1995). La LH se unirá a los receptores de las células de la granulosa estimulando una mayor producción de estradiol que le permitirá al folículo seguir creciendo aunque disminuyan los niveles de FSH circulantes (Bó and Caccia, 2002). Por esta razón se dice que el folículo dominante mayor de 8 mm es FSH independiente pero LH dependiente (Ginther *et al.*, 2001).

Los factores de crecimiento producidos localmente, tales como IGFs y miembros de la superfamilia del TGF- β (inhibinas, activinas y BMPs), trabajan en conjunto con las gonadotropinas a lo largo del continuo crecimiento folicular. Estas interacciones entre señales extraováricas y factores intrafoliculares son las que determinan si el folículo continúa su desarrollo o diverge hacia las vías de la atresia, como ocurre en la mayoría de las especies monovulatorias (Webb and Campbell, 2007).

La relación entre los niveles de LH y el crecimiento folicular también puede explicar el fenómeno de regresión del folículo dominante de las ondas foliculares anovulatorias y el comienzo de la próxima onda folicular, también llamado recambio

folicular (Bó and Caccia, 2002). Los niveles de progesterona alteran el desarrollo del folículo dominante en el bovino, ya que no suprimen los pulsos de FSH (Adams *et al.*, 1992b) pero sí afectan adversamente la frecuencia de pulsos de LH (Stock and Fortune, 1993). Por lo tanto, al aumentar los niveles de progesterona debido al crecimiento del CL durante la fase luteal, se altera la secreción pulsátil de LH, lo que ocasiona que el folículo dominante detenga sus funciones metabólicas y comience a regresar (Bó and Caccia, 2002). Este cese de la secreción de estradiol e inhibina se produce antes de que se observe una disminución del diámetro del folículo dominante, pero tiene como consecuencia el aumento de las concentraciones de FSH que va a reclutar los folículos de la siguiente onda folicular. Por el contrario, la disminución de los niveles circulantes de progesterona al ocurrir la luteólisis hacia el final del ciclo permite el incremento de la frecuencia de los pulsos de LH. Este aumento estimula un mayor crecimiento del folículo dominante y un aumento de las concentraciones de estradiol, que induce los signos de celo y el pico preovulatorio de LH (Bó and Caccia, 2002).

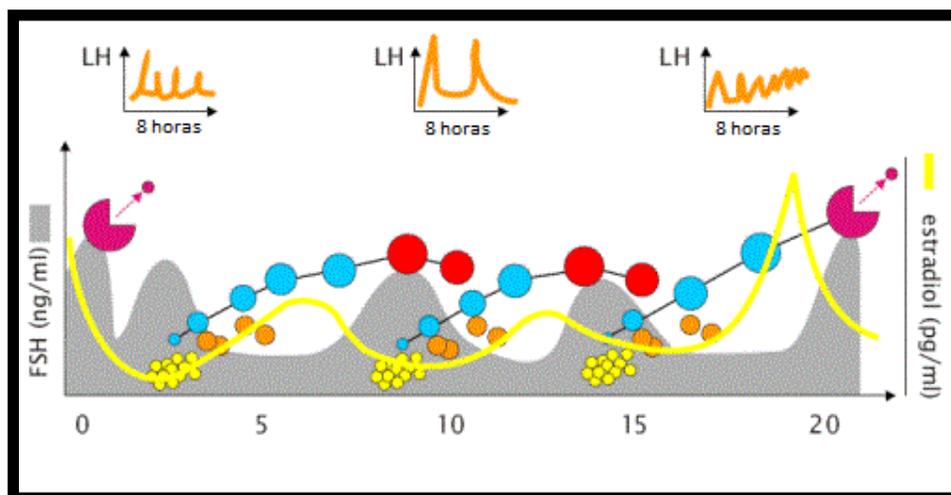


Figura 6: Interacciones endocrinas y foliculares del ciclo estral bovino. Adaptado de Aerts and Bols (2010).

II.2. ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA

La baja performance reproductiva es considerada uno de los factores que causa mayores pérdidas económicas en la producción lechera a lo largo del mundo (Nelson *et al.*, 2010). La enfermedad quística ovárica (de inglés *cystic ovarian disease*: COD) es una causa de infertilidad temporaria y constituye uno de los trastornos reproductivos más comunes en el ganado lechero, con reportes de incidencia que van del 6 al 23 % (Eyestone and Ax, 1984; Laporte *et al.*, 1994; Garverick, 1997; Silvia *et al.*, 2002; Peter, 2004; Nelson *et al.*, 2010). El impacto económico de esta enfermedad está en directa relación con el aumento del intervalo parto-concepción, el incremento de los costos veterinarios y el aumento de la tasa de rechazo (Peter, 2004; Vanholder *et al.*, 2006; Rizzo *et al.*, 2011), estimándose que cada evento de la enfermedad agrega entre 22 y 64 días a este intervalo. Además, provoca una disminución en la tasa de preñez en la primera inseminación y por ende aumenta el número de servicios requeridos para lograr la concepción (Shrestha *et al.*, 2004). El costo aproximado se calcula alrededor de US\$ 137 por vaca distribuidos en disminución de la producción de leche y gastos veterinarios (Silvia *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2010).

Entre los años 1940 y 1950 se publicaron numerosos reportes acerca de la morfología ovárica, las observaciones clínicas y la epidemiología de esta enfermedad (Casida *et al.*, 1944; Garm, 1949; Casida and Chapman, 1951; Wiltbank *et al.*, 1953). La mayoría de esos investigadores especulaban acerca de un “desbalance endocrino” como causa de la formación de quistes foliculares ováricos. Esto llevó a la aparición de gran cantidad de tratamientos basados en la administración de hormonas, incluyendo esteroides (Johnson and Ulberg, 1967), gonadotropinas (Casida *et al.*, 1944; Nakao *et al.*, 1978) y, más recientemente GnRH (Kesler and Garverick, 1982; Nanda *et al.*,

1988). Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos no poseían un sustento teórico adecuado (Silvia *et al.*, 2002).

II.2.1. Definición

Durante los últimos años, la definición de quistes foliculares ováricos ha sido frecuentemente revisada. Silvia *et al.* (2002) los definieron como estructuras foliculares, con un diámetro mínimo de 17 mm, persistiendo por más de 6 días en ausencia de cuerpo lúteo y con una clara interferencia de los ciclos estrales normales. Wiltbank *et al.* (2002) los caracterizaron como estructuras foliculares de 20 mm o más de diámetro, que persisten por al menos 7 días en ausencia de cuerpo lúteo. Más recientemente, los quistes ováricos han sido referidos como folículos como un diámetro de al menos 20 mm, presentes en uno o ambos ovarios, en ausencia de cualquier tejido luteal y afectando la normal ciclicidad ovárica (Vanholder *et al.*, 2006). Sin embargo, Bartolomé *et al.*, (2005), basados en información obtenida a partir de ultrasonografía y concentración de hormonas, definieron esta condición como la presencia de uno o múltiples folículos ováricos de un diámetro de 18 mm o más, en ausencia de cuerpo lúteo y con falta de tonicidad uterina a la palpación. La incorporación del concepto de tonicidad uterina es clave para diferenciar un folículo preovulatorio de un quiste, y se basa en las características del útero durante el proestro, en el cual aumentan los receptores de oxitocina y, por ende, aumenta también la tonicidad en respuesta a las altas concentraciones de estrógenos. En el caso de quistes foliculares, la falla en la ovulación y la persistencia por varios días determinan la pérdida de los receptores de oxitocina y, por consiguiente, la falta de tonicidad. Desde un punto de vista mucho más

práctico, esta definición permite arribar a una noción de persistencia folicular, sin la necesidad de realizar dos controles consecutivos para llegar al diagnóstico de COD.

Estas definiciones clásicas deben ser complementadas con el concepto de que los quistes pueden regresar y ser reemplazados por otros; pueden atresarse o luteinizarse e inclusive puede producirse la ovulación en presencia de estas estructuras por lo cual se establece que esta es una enfermedad altamente dinámica (Hamilton *et al.*, 1995; Rutter and Russo, 2000; Silvia *et al.*, 2002; Bartolomé *et al.*, 2005). La presencia de más de una estructura quística no es rara, en un estudio realizado por Silvia *et al.* (2002), el 47% de las vacas con quistes ováricos tuvieron 2 o más quistes en el momento de la detección, por lo que ellos consideraron que la condición poliquística es más frecuente en las vacas con quistes incluso que la aparición de ovulaciones múltiples en vacas normales.

A pesar de numerosos años de investigación en este tema, no existe todavía una definición comúnmente aceptada, debido probablemente a la heterogeneidad de la presentación de la enfermedad (tipo de quistes, momento de aparición, signos clínicos, etc.). Los puntos en común de todas las definiciones permiten arribar al concepto de que la COD bovina se caracteriza por la presencia de estructuras foliculares de un diámetro mayor al ovulatorio, que permanecen en el tiempo (persistencia) ocasionando trastornos en la funcionalidad ovárica y, por ende, en la fertilidad.

II.2.2. Factores predisponentes en la formación de quistes.

II.2.2.1. Factores Generales

Dentro de este grupo se encuentran factores tales como la herencia, producción de leche, edad, estación del año, momento reproductivo y condición corporal. La **herencia**

aparece como uno de los factores menos relevantes. Se ha visto que la enfermedad presenta mayor ocurrencia en algunas líneas de sangre de ganado vacuno, aunque este fenómeno es poco frecuente. Sin embargo, es posible que la selección de razas con predisposición genética a desarrollar COD, dado que cumplieran con el objeto de aumentar la producción láctea, pueda aumentar la incidencia de esta enfermedad (Hooijer *et al.*, 2001). La tasa de heredabilidad es baja (0.07 a 0.12 %) y no existen evidencias claras de cuáles son los genes 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. El incremento de la producción individual a lo largo de las últimas décadas, ha determinado un aumento de los desequilibrios metabólicos en vacas posparto, los cuales desempeñan un importante papel en la formación de quistes (Zulu *et al.*, 2002; Vanholder *et al.*, 2006). Esto es apoyado por la elevada incidencia de COD en vacas lecheras durante el posparto temprano, período en el cual los animales se encuentran en balance energético negativo (BEN), y por la asociación de COD con un alto nivel de producción de leche (Laporte *et al.*, 1994; Beam and Butler, 1997; Hooijer *et al.*, 2001; López-Gatius *et al.*, 2002; Hooijer *et al.*, 2003). Varios estudios han demostrado que el BEN afecta el desarrollo folicular y la ovulación (Beam and Butler, 1997; 1999; Butler, 2003; Diskin *et al.*, 2003; Lucy, 2003; Roche, 2006; Leroy *et al.*, 2008; Walsh *et al.*, 2011) y también puede formar parte de la etiopatogenia en la formación de quistes (Vanholder *et al.*, 2006).

La tasa de quistes ováricos aumenta con la **edad**, siendo muy raro su hallazgo en vaquillonas, y tiene una distribución variable según la **estación del año** (Garverick, 1997). En cuanto el **momento reproductivo**, la mayor incidencia de la enfermedad en

el puerperio denota el efecto de los disturbios endocrinos, característicos de esa etapa de la vida de la hembra bovina, en el desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, el regreso espontáneo de folículos anovulatorios es un hallazgo frecuentemente encontrado en el posparto temprano, cuando los cambios hormonales son críticos para la reanudación de la normal ciclicidad ovárica (Probo *et al.*, 2011). Considerando el alto porcentaje de regresión espontánea (Kesler and Garverick, 1982; Day, 1991), la detección de folículos anovulatorios en las primeras semanas después del parto debería no ser considerado patológico. Desde el punto de vista práctico, una disfunción ovárica se puede sospechar cuando los folículos anovulatorios se detectan no antes de las 7 semanas después del parto, cuando las funciones reproductivas ya deberían haber sido restauradas (Gier and Marion, 1968; Sheldon and Dobson, 2004; Probo *et al.*, 2011).

Finalmente, la **condición corporal (CC)** de los animales es un factor predisponente importante: animales con CC superior a 4 (escala de 0 a 5) suelen presentar quistes con una frecuencia 2.5 veces superior, respecto a aquellas vacas cuya CC es menor o igual a 3 (Salveti *et al.*, 2007). 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 *et al.*, 2004; Overton and Waldron, 2004).

II.2.2.2. Factores específicos

Alimentación: La alimentación juega un rol destacado debido a su efecto directo sobre el equilibrio metabólico del animal. Durante el período de posparto temprano, la demanda energética para el mantenimiento y la producción excede a la energía aportada por la ingesta, provocando un estado de BEN durante el cual existe una importante

movilización de las reservas corporales (Bauman and Currie, 1980; Hooijer et al, 2005). En relación a esto, parecería que existe un vínculo entre COD y la magnitud y/o duración del BEN posparto (Vanholder *et al.*, 2006). Durante el mismo, las concentraciones periféricas de insulina, IGF-1, glucosa (Beam and Buttler, 1999) y leptina (Block *et al.*, 2001; Liefers *et al.*, 2003) están reducidas, mientras que las concentraciones de metabolitos tales como ácidos grasos no esterificados (AGNE) (Rukkwamsuk *et al.*, 2000) y B-hydroxybutyrato (β -HB) están incrementadas (Leroy *et al.*, 2004).

El sistema IGF, relacionado con el metabolismo general, también juega un rol importante en el crecimiento y desarrollo folicular (Spicer and Echternkamp, 1995). Además de tener un efecto directo, IGF-1 junto con insulina estimulan indirectamente el desarrollo folicular a través de una estimulación de la formación de receptores de LH en las células de la granulosa (Davoren *et al.*, 1986). Por lo tanto, bajas concentraciones sistémicas de IGF-1 en el posparto temprano podrían contribuir a la anovulación y subsecuente desarrollo de quistes foliculares (Zulu *et al.*, 2002). También la insulina por sí misma es conocida como un potente estimulador de la esteroidogénesis *in vitro* (Gutierrez-Aguilar, 1997; Price and Silva, 1999) e *in vivo* (Simpson *et al.*, 1994; Armstrong *et al.*, 2002). Gong (2002) demostró que vacas lecheras alimentadas con una dieta que incrementaba los niveles circulantes de insulina durante los primeros 50 días posparto tenían un anestro posparto más corto, independientemente de los niveles de LH y FSH, sin afectar la producción de leche o el balance energético. Este estudio sugiere que la insulina tendría un efecto directo a nivel ovárico.

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 and 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 amoníaco (Staples *et al.*, 1998) y por otras acciones directas sobre los órganos reproductivos (Ortega *et al.*, 1995, 1997). 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 (Diskin *et al.*, 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. Una insuficiencia de insulina más que una resistencia a la misma ha sido observada en vacas con quistes, indicando una interacción alterada entre glucosa e insulina a nivel pancreático (Opsomer *et al.*, 1999). Esta deficiencia de insulina se debe principalmente a que la glándula mamaria utiliza gran parte de la glucosa circulante para la síntesis de lactosa, descendiendo la glucemia y consecuentemente la secreción de insulina.

Infecciones uterinas: durante el período posparto, las vacas lecheras son susceptibles a una alta variedad de procesos patológicos, incluyendo retención de placenta, endometritis, metritis, hipocalcemia y anestro posparto. Todas estas condiciones han sido correlacionadas positivamente con la COD (Kesler *et al.*, 1980; Garverick, 1997). Es a partir de los trabajos de Bosu and Peter (1987) que se demuestra en forma evidente que las infecciones uterinas posparto causadas por bacterias Gram (-), capaces de sintetizar y liberar endotoxinas, estimulan la liberación de cortisol adrenal

suprimiendo de este modo el pico preovulatorio de LH y consecuentemente conducen a la formación de quistes foliculares. Las endotoxinas y sus mediadores, tales como las interleuquinas, son responsables de la mayoría de los efectos patógenos. Las interleuquinas son capaces de inducir la liberación de hormona liberadora de corticotrofina (CRH) del hipotálamo y consecuentemente la adrenocorticotrofina (ACTH) de la hipófisis, lo cual estimula a la glándula adrenal a incrementar la producción de corticoesteroides, e inhibe la formación de receptores de LH en células de la granulosa. Todas estas acciones resultan en un aumento del cortisol, y la supresión del pico preovulatorio de LH. De este modo el efecto de las endotoxinas y sus mediadores puede ser considerado un ejemplo particular de respuesta al estrés (Nakao and Grünert, 1990).

Estrés: Cualquier factor considerado provocador de estrés estimula al eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, el cual a su vez modula al eje hipotálamo-hipofisario-gonadal modificando la secreción de gonadotropinas. El rol del estrés en la patogénesis de la COD es mediado por los niveles de cortisol liberados de manera endógena, que ejercen su acción inhibitoria sobre la liberación de LH. La capacidad de las corticotropinas en la inducción de la enfermedad, ha sido demostrada experimentalmente por administración de ACTH en vacas (Peter and Liptrap, 1985; Dobson *et al.*, 2000; Ribadu *et al.*, 2000; Ortega *et al.*, 2007a) y en cerdas (Liptrap and McNally, 1976). El pico preovulatorio de LH es especialmente sensible al efecto inhibitorio de la ACTH y los glucocorticoides. La inhibición de la secreción de LH hipofisaria, consecuencia de la acción fisiológica de los glucocorticoides, podría ser causada por la modificación en la retroalimentación de los esteroides gonadales, dado que los corticoides reducen el efecto estimulante de los estrógenos sobre la secreción de

la LH. Se cree que los péptidos opioides endógenos (producidos por la hipófisis y el cerebro) también bloquean la onda preovulatoria de LH inducida por los estrógenos y la liberación hipotalámica de GnRH (Malven, 1986).

II.2.3. Etiología y patogenia

Numerosos investigadores han acordado que los quistes foliculares se desarrollan debido a una disfunción del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Dobson *et al.*, 2000; Ribadu *et al.*, 2000; Peter, 2004; Vanholder *et al.*, 2006). Esta disfunción puede tomarse como un trastorno plurifuncional de la ovulación, que tiene como base la predisposición hereditaria sumada a causas ambientales (estrés, manejo nutricional, enfermedades infecciosas, y manejo en general). A la falla de la funcionalidad hipotálamo-hipofisaria se le suma un componente intraovárico que ocasiona la disfunción de esta glándula.

II.2.3.1. Disfunción hipotálamo-hipofisaria

En esta hipótesis, la causa principal de la formación de quistes estaría relacionada con una liberación aberrante de LH desde la hipófisis, ya sea porque el pico preovulatorio de LH está ausente, la magnitud es insuficiente u ocurre en un momento inadecuado durante la maduración del folículo dominante (Hamilton *et al.*, 1995; Yoshioka *et al.*, 1996; Vanholder *et al.*, 2006). Esta falla en la liberación de LH no parece ser causada por un bajo contenido de GnRH en el hipotálamo, ni tampoco por un reducido número de receptores de GnRH o LH dentro de la hipófisis, sino por una alteración en el mecanismo de retroalimentación positiva de los estrógenos secretados por el folículo preovulatorio, lo cual resultaría en una falla en la liberación de GnRH y por ende de su acción a nivel hipofisario (Vanholder *et al.*, 2006). Las vacas con COD y

con niveles elevados de estrógenos endógenos fallan en generar un pico de LH en respuesta a una dosis de estradiol exógeno, indicando que se ha perdido la capacidad de responder a la retroalimentación positiva del estradiol sobre el eje hipotálamo-hipofisario (Zaied *et al.*, 1981; Refsal *et al.*, 1988; De Silva and Reeves, 1988). En este sentido, si la onda preovulatoria de GnRH/LH ocurre inoportunamente durante el crecimiento folicular, puede ocasionar la pérdida de sensibilidad del hipotálamo al efecto de retroalimentación positiva del estradiol, llevando de esta manera a la anovulación y consecuente formación de quistes (Gümen *et al.*, 2002; Gümen and Wiltbank, 2002).

En un estudio realizado por Hamilton *et al.* (1995) se detectó una concentración promedio mayor tanto de LH como de 17- β estradiol circulantes en las vacas con quistes, si se las comparaba con vacas con ciclos normales o con recuperación espontánea, no registrándose un pico preovulatorio de LH en las hembras con COD. La secreción aumentada de LH en las hembras bovinas con quistes podría estimular un incremento en el 17- β estradiol y este incremento podría causar un aumento en la secreción de LH, creando así un efecto cascada que afectaría la respuesta ovárica a la secreción de LH.

Hatler *et al.* (2003) observaron que al momento del diagnóstico de COD en bovinos, la mayoría de los casos estaban acompañados de concentraciones suprabasales, aunque por debajo de los niveles luteales, de progesterona. Precisamente, el efecto de niveles intermedios de dicha hormona (apenas por encima de los niveles basales pero no suficientes como para inducir la regresión de folículo dominante y el inicio de una nueva onda), 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 crecimiento y 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 (centro cíclico) del hipotálamo. Además, existen elevados niveles de GnRH en el tallo hipofisario-eminencia media (núcleo arcuato y ventro medial del hipotálamo; centro tónico) desde donde se controla la liberación de 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 *et al.*, 2006).

II.2.3.2. Disfunción ovárica/folicular

Numerosos estudios han tratado de dilucidar el mecanismo endocrino que conduce a la formación de quistes ováricos así como caracterizar el crecimiento y la dinámica folicular durante su desarrollo. Sin embargo, la comprensión de los cambios celulares y moleculares que ocurren dentro del folículo ovárico previo al proceso de anovulación es aún escasa (Wiltbank *et al.*, 2002; Salvetti *et al.*, 2007).

Algunos autores han descrito alteraciones en la producción de factores de crecimiento por parte de células de la granulosa (Ortega *et al.*, 2008; Rey *et al.*, 2010), en sus proteínas de unión (Rodríguez *et al.*, 2011) así como también, síntesis aberrante de proteínas en la matriz extracelular (MEC) de los quistes (Salvetti *et al.*, 2004). Sin embargo, sigue siendo necesario aumentar el conocimiento en lo que respecta a la falla ovárica a nivel celular y molecular durante el proceso de formación de quistes, validando o ampliando lo que fue descubierto a través de estudios sobre quistes ya formados. Para ello, los eventos pos-quísticos (dinámica quiste/folículo) de COD inducida experimentalmente (Cook *et al.*, 1990) son similares a los que ocurren en quistes espontáneos (Hamilton *et al.*, 1995), permitiendo estos modelos comprender la naturaleza dinámica de los mismos, las alteraciones endocrinas y su posterior destino (Cook *et al.*, 1990).

Variaciones en la expresión y en el número de receptores de hormonas hipotálamo-hipofisarias así como de hormonas esteroides parecen estar implicados en la anovulación de un folículo dominante. En primer lugar, las alteraciones en la expresión del receptor de LH podría ser uno de los factores involucrados (Vanholder *et al.*, 2006). El pico de LH inicia un complejo proceso de activación de múltiples genes que ocurren en varios pasos, en el que el tiempo es esencial para conducir finalmente a la ovulación del folículo preovulatorio (Robker *et al.*, 2000; Vanholder, *et al.*, 2006). De acuerdo con Kawate *et al.* (1990), el número de receptores de FSH y la LH en las células de la granulosa de los quistes se reduce en comparación con los folículos normales, pero esto se contradice con los datos de Odore *et al.* (1999) y Calder *et al.* (2001). Las discrepancias entre los estudios puede explicarse por diferencias en la metodología

como la demostración del propio receptor o de su ARNm, y la división de los quistes en estrógenos activo y estrógenos inactivo.

De la misma manera, los receptores de estrógenos y de progesterona podrían estar involucrados en los mecanismos que llevan a la anovulación. Un balance inapropiado de los receptores de estrógeno α y β por ejemplo, dadas las diferencias en afinidad por el 17- β 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 (Odoe *et al.*, 1999; Salvetti *et al.*, 2007; Alfaro *et al.*, 2012; Salvetti *et al.*, 2012). Además, puede estar afectada la capacidad esteroidogénica de los folículos dominantes, cuya síntesis y secreción es fundamental para la liberación del pico preovulatorio de LH (Calder *et al.*, 2001). Beam (1995) sugirió que la esteroidogénesis está aumentada durante el desarrollo temprano de quistes, lo cual podría alterar la señal hacia el eje hipotálamo-hipofisario. En este sentido, a través de una intensa retroalimentación positiva, podría verse sobre estimulada 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.

Un evento importante en las células que componen el folículo quístico es la expresión de los genes responsables de la proliferación, apoptosis y diferenciación celular, los cuales probablemente estén involucrados en la anovulación y en el proceso de formación y mantenimiento de los quistes (Peter and Dhanasekaran, 2003; Salvetti *et al.*, 2004; Isobe and Yoshimura, 2007; Ortega *et al.*, 2007a; Salvetti *et al.*, 2009; Salvetti *et al.*, 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 podrían contribuir a la formación y persistencia de dicha estructura anovulatoria (Isobe and Yoshimura, 2000a,b; Salvetti *et al.*, 2010).

El eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, a través del mecanismo de estrés, también puede afectar la función ovárica y contribuir con la formación de quistes (Baravalle *et al.*, 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 sin involucrar la adrenal (Amweg *et al.*, 2011). 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).

II.3. SUPERFAMILIA DE TGF- β

La progresión a través de los sucesivos estadios de desarrollo folicular requiere de una comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa como así también entre estas últimas y las de la teca, y en esta comunicación intervienen los componentes de esta superfamilia (Knight and Glister 2006; Webb *et al.*, 2007).

II.3.1. Ligandos

La superfamilia del TGF- β es un grupo de proteínas estructuralmente conservadas aunque funcionalmente diversas, compuesta por al menos 35 miembros en los vertebrados. Estas proteínas están ampliamente distribuidas y funcionan como ligandos

extracelulares relacionados con numerosos procesos fisiológicos tanto en la vida pre como posnatal (Massague and Wotton, 2000). A partir de sus características estructurales, los miembros de esta superfamilia han sido clasificados a su vez en otras subfamilias:

- Subfamilia TGF- β : comprende TGF- β 1, TGF- β 2, y TGF- β 3
- Subfamilia BMP: con más de 20 miembros.
- Subfamilia GDF (del inglés: *Growth and Differentiation Factor*: Factor de desarrollo y diferenciación) con al menos 9 miembros.
- Subfamilia GDNF (del inglés: *Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor*: factor neurotrófico derivado de las células gliales).
- Miembros adicionales como AMH (del inglés: *Anti-mullerian hormone*: Hormona anti-mulleriana).
- Subfamilia Activina/Inhibina: incluye activinas A, AB, B e inhibinas A y B.

II.3.1.1. Subfamilia del TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3.

La subfamilia TGF- β hace referencia a una serie de polipéptidos homodiméricos multifuncionales de 25-kDa de peso molecular, con múltiples isoformas (Rizzino, 1988; Lyons and Moses, 1990), que actúan como importantes mediadores de numerosos procesos celulares y fisiológicos (Igotz *et al.*, 1987; Roberts and Sporn, 1998). La expresión, localización y regulación de las distintas isoformas de TGF- β en el ovario es extremadamente variable entre especies. Nilsson *et al.* (2003) demostraron mediante inmunohistoquímica y RT-PCR que, en bovinos, TGF- β 1 es producido por las células de la granulosa de folículos preantrales (primordiales, primarios y secundarios), antrales tempranos, y folículos de 1-2 mm de diámetro (tabla 2). Sin embargo no se encontró

expresión proteica en las células de la granulosa de folículos más grandes (3-5 o 5-10 mm) ni en células de la teca. En cambio, TGF- β 2 y TGF- β 3 se expresan en células de la granulosa y teca de todos los estadios foliculares. Con respecto a la expresión de ARNm para las distintas isoformas, los resultados muestran que el ARNm que codifica para TGF- β 3 alcanza mayores niveles que los ARNm de TGF- β 1 y TGF- β 2, tanto en granulosa como en teca. También, se observó que la expresión de ARNm para TGF- β 2 y TGF- β 3 fue mayor en células de la teca que en granulosa. Para TGF- β 1, si bien la proteína no fue detectable por inmunohistoquímica en folículos de 3-5 o 5-10 mm de diámetro, ARNm fue detectado en estos estadios de desarrollo folicular. Tal vez el nivel de TGF- β 1 expresado en los folículos más grandes estaba por debajo del límite de detección para la técnica de inmunohistoquímica utilizada (Nilsson *et al.*, 2003).

En cuanto a las funciones de los TGF- β , diferentes reportes que detallan los efectos de este factor de crecimiento sobre células ováricas cultivadas *in vitro* suelen ser contradictorios y parecen ser que su expresión es altamente dependiente de la especie estudiada, la etapa de diferenciación del folículo, la presencia de otros factores de crecimiento y las condiciones precisas del cultivo celular (Knight and Glister, 2006).

Tabla 2: Localización de las isoformas de TGF- β en el ovario bovino. Adaptado de Nilsson *et al.* (2003).

Tejido	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
Granulosa	Proteína + ARNm: pre-antral, antral hasta: 1-2 mm	Proteína + ARNm: presente en todos los estadios	Proteína + ARNm: presente en todos los estadios
Teca	Proteína + ARNm: no detectable	Proteína + ARNm: presente en todos los estadios	Proteína + ARNm: presente en todos los estadios

II.3.1.2. Subfamilia de inhibina, activina y foliculostatina

Las inhibinas y activinas son glicoproteínas diméricas cuyas subunidades están unidas por un enlace disulfuro. La subunidad β está presente en ambas. Sin embargo, la

molécula de inhibina está formada además por una subunidad α . La subunidad α es única pero de la subunidad β existen dos formas: βA y βB . Es así que existen dos isoformas de inhibina de acuerdo a la subunidad β que posea: la inhibina A ($\alpha\beta A$) y la inhibina B ($\alpha\beta B$). La activina es un dímero compuesto por las mismas subunidades β que la inhibina. Existen tres isoformas de acuerdo a las 2 subunidades β que se unan: la activina A ($\beta A \beta A$), la activina B ($\beta B \beta B$) y la activina AB ($\beta A \beta B$) (Hafez and Hafez, 2000; Bleach *et al.*, 2001; Ethier and Findlay, 2001). Existe muy poca información acerca de la bioactividad y funciones diferenciales de las distintas isoformas de la activina (A, AB y B) y la mayoría de los estudios han sido realizados midiendo la actividad y funciones de la activina A.

Por último, la foliculostatina es una glicoproteína monomérica rica en cisteína que no está relacionada estructuralmente con la superfamilia TGF- β , aunque sí funcionalmente debido a su alta afinidad de unión con la activina. Esto le permite modular (neutralizar) los efectos de ésta última. La foliculostatina también se une a la inhibina, pero su afinidad es mucho menor y no neutraliza sus efectos biológicos (Knight and Glistler, 2001). Se han podido identificar 5 isoformas de foliculostatina las cuales presentan distinta afinidad de unión a la activina (Glistler *et al.*, 2006).

Activina, inhibina y foliculostatina son sintetizadas por las células de la granulosa, pero ejercen no sólo un efecto autocrino sobre ellas mismas sino también paracrino sobre las células de la teca y el ovocito. Estas acciones autocrinas y paracrinas incluyen la modulación del crecimiento folicular, respuesta a las gonadotropinas, esterioideogénesis, maduración del ovocito, ovulación y función del cuerpo lúteo (Knight and Glistler, 2001).

II.3.2. Receptores

La mayoría de los miembros de la superfamilia de TGF- β , realizan sus acciones a través de la unión y formación de complejos hétero-tetraméricos con dos tipos de receptores de membrana designados como tipo I y tipo II. En los mamíferos existen al menos 7 tipos de receptores de tipo I y 5 de tipo II asociados con la traducción de la señal de los ligandos de la superfamilia de TGF- β . La activación del receptor a través de la fosforilación a partir del dominio quinasa intracelular lleva a la fosforilación de moléculas de señal corriente abajo denominadas *Smads*, que modulan la expresión génica a través de interacciones con varios factores de transcripción, coactivadores y correpresores (Glister *et al.*, 2006; Knight and Glister 2006).

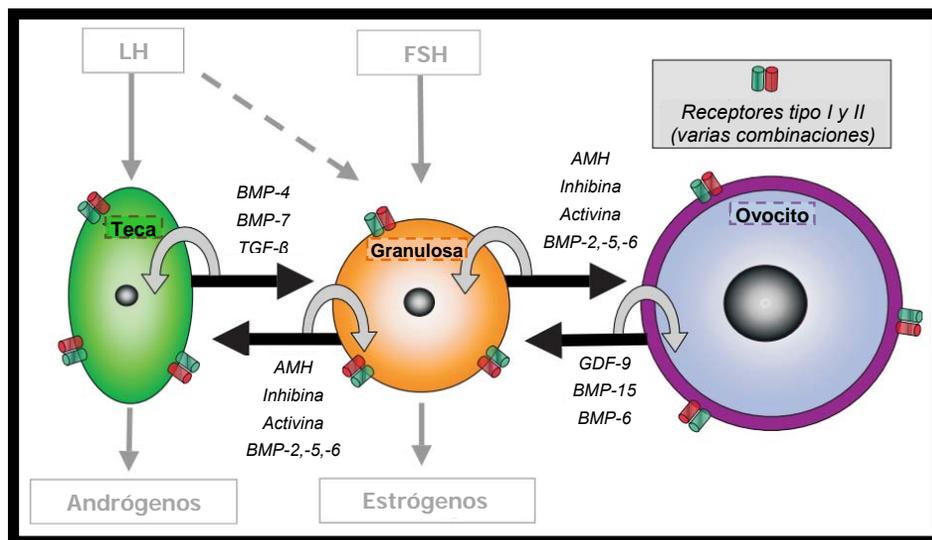


Figura 7: Comunicación bidireccional entre las células de la teca y granulosa y entre éstas y el ovocito. Acciones autocrinas (flechas gruesas grises) y paracrinas (flechas gruesas negras) probables, según la expresión de receptores de tipo I y tipo II en la superficie celular. Adaptado de Knight and Glister (2006).

II.3.3. Roles intraováricos de los miembros de la superfamilia de TGF- β .

Numerosos estudios realizados en diversas especies han demostrado que los miembros de la superfamilia de TGF- β se expresan en los componentes del folículo, tanto en el ovocito como en las células somáticas que lo acompañan (granulosa y teca),

de manera relacionada con el estadio de desarrollo folicular. Existe gran cantidad de evidencia experimental que indica que estas proteínas cumplen funciones en múltiples aspectos del desarrollo folicular, incluyendo el reclutamiento de los folículos primordiales, la proliferación y apoptosis de las células de la granulosa, esteroidogénesis, expresión de receptores para gonadotropinas, maduración del ovocito, ovulación, luteinización y formación del cuerpo lúteo (Nilsson *et al.*, 2003; Kumanov *et al.*, 2005; Knight and Glistler, 2006; Sisco and Pfeffer, 2007). Esta evidencia puede ser agrupada en los correspondientes estadios del desarrollo folicular, como se explica a continuación.

II.3.3.1. Activación de los folículos primordiales en reposo.

Los folículos primordiales permanecen en una fase latente o de reposo hasta que son reclutados para entrar a la fase de crecimiento de folículos primarios (Oktem and Urman, 2010). Durante el estadio de folículo primordial, la apropiada comunicación entre el ovocito y las células foliculares que lo rodean así como también la comunicación entre éstas y las células estromales es fundamental para que los folículos primordiales salgan del estado de reposo en el que se encuentran y comiencen a desarrollarse (figura 8). El proceso se caracteriza por tres eventos principales: cambio de forma de las células de la pre-granulosa de escamosas a cuboides, proliferación del ovocito y alargamiento del mismo (Peña *et al.*, 2007). En este aspecto intervienen diversos factores locales, dentro de los que se pueden mencionar al *ligando kit (KL)* y al *factor inhibidor de la leucemia (LIF)*, los que *in vitro* promueven la transición de folículo primordial a primario, estimulan el desarrollo del ovocito y el reclutamiento y proliferación de las células estromales vecinas para la formación de la teca (Nilsson *et*

al., 2002, Nilsson and Skinner 2003, 2004). Otro factor local que actúa en este estadio es el KGF (factor de crecimiento de queratinocitos), que puede actuar en las células foliculares (pre-granulosa) y de la granulosa regulando hacia arriba la expresión del KL y de este modo amplificando los efectos positivos sobre la proliferación de las células estromales/tecales y el desarrollo del ovocito (Kezele *et al.*, 2005).

Asimismo, estudios realizados en roedores mostraron que las BMP-4 y BMP-7 actúan positivamente sobre las células tecales/intersticiales promoviendo la transición de los folículos primordiales a primarios y la supervivencia folicular (Nilsson and Skinner, 2003). Otros tres factores de esta familia se expresan en los ovocitos de los folículos primordiales (vaca y oveja) y primarios (roedores): GDF-9, BMP-6 y BMP-15 (McGrath *et al.*, 1995; Bodensteiner *et al.*, 1999; Jaatinen *et al.*, 1999; Elvin *et al.*, 2000; McNatty *et al.*, 2001; Knight and Glister, 2003). Receptores de tipo I y II a través de los cuales cumplen su acción estos factores, se expresan en las células foliculares y granulosa haciendo de éstas blancos potenciales de las señales paracrina (Nilsson and Skinner, 2003).

Se cree que la AMH actúa negativamente sobre la iniciación del desarrollo folicular, impidiendo la activación prematura de un gran número de folículos y manteniendo de esa manera el pool de folículos disponibles durante la etapa fértil de la hembra (Durlinger *et al.*, 2002). Si bien esta hormona fue descubierta en otro contexto, al que debe su nombre (secretada por las células de Sertoli para inhibir la formación de los conductos de Müller durante la diferenciación del tracto genital masculino), se sabe hoy que las células de la granulosa también la expresan. La AMH se expresa en las células de la granulosa de los folículos primarios y hasta los estadios antrales tempranos, no habiéndose encontrado expresión en los folículos primordiales. Estos

datos permiten inferir que existe una retroalimentación negativa sobre los folículos primordiales ejercida por la secreción de AMH por parte de los folículos que están en estadios temprano del desarrollo (Durlinger *et al.*, 1999).

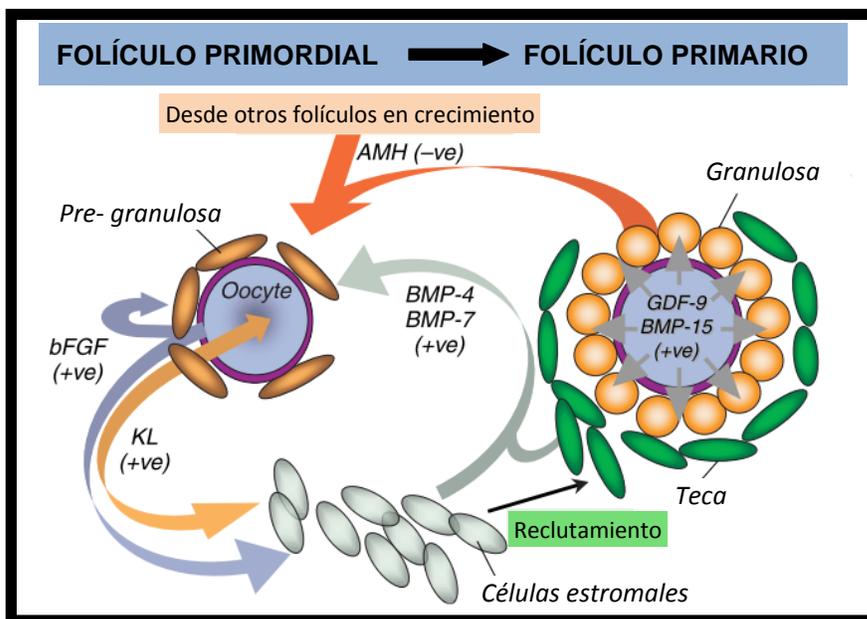


Figura 8. Señalizaciones (+VE, estimulante; -VE, inhibitoria) que participan en la transición de folículo primordial a primario; KL y FGF secretados por las células pre-granulosa y el ovocito, respectivamente, tienen efectos estimulantes en los ovocitos y células de la granulosa; también promueven el reclutamiento de células de la teca desde el estroma/células intersticiales. Células estromales y de la teca secretan BMP-4 y BMP-7, que promueven la activación del folículo y la supervivencia. GDF-9 y/o BMP-15 secretados por el ovocito de los folículos activados promueven la proliferación de células de la granulosa, la expresión de KL y la formación de teca. Las células granulosas de los folículos en crecimiento secretan AMH que parece actuar como un freno para el folículo primordial. Adaptado de Knight and Glister (2006).

II.3.3.2. Progresión de los folículos primarios a estadios antrales tempranos.

El desarrollo de los folículos primarios a estadios preantral y antral temprano involucra el aumento de tamaño del ovocito, la formación de la zona pelúcida, la extensa proliferación de las células de la granulosa hasta formar un tejido estratificado, la formación de la membrana basal, la condensación de las células del estroma hasta formar la capa de células de la teca y el desarrollo de lagunas que contienen líquido

folicular que eventualmente formarán el antro folicular (Knight and Glister, 2006). En estos estadios de desarrollo folicular la vascularización es pobre por lo que los factores paracrinos tienen mayor importancia que los endocrinos. Si bien existe evidencia de que las gonadotropinas influyen en la progresión de los folículos preantrales tempranos, su rol es considerado permisivo, debido a una acción mitogénica indirecta por aumento de la expresión de los factores de crecimiento o sus receptores (Dufour *et al.*, 1979, Cortvrindt *et al.*, 1997; Peña *et al.*, 2007). Es así que los factores locales, incluyendo los de la superfamilia de TGF- β , regulan la transición desde el estadio de folículo primario a secundario y subsecuentemente el desarrollo folicular desde preantral tardío a antral temprano. Dentro de esta superfamilia, los factores implicados como reguladores positivos del desarrollo folicular preantral incluyen: GDF-9 y BMP-15 cuyo origen es el ovocito; activinas de origen en las células de la granulosa y BMP-4 y BMP-7 de origen tecal, así como también TGF- β producido por las células de la teca y de la granulosa (figura 9). En contraste, la evidencia indica que la AMH tiene un rol negativo sobre el desarrollo folicular preantral (Knight and Glister, 2006).

Dentro de los factores producidos por el ovocito, GDF-9 y BMP-15 son necesarios para el correcto desarrollo de los folículos preantrales tempranos. BMP-15 estimula la proliferación de las células de la granulosa indiferenciadas de manera independiente de FSH. Se ha descrito que el GDF-9 es necesario para la progresión a partir de folículos primarios. De hecho, la supresión del gen GDF-9 en ratones conduce a la detención del desarrollo folicular en la etapa de folículo primario. Estos folículos tienen células de la granulosa anormales y no adquieren células de la teca, indicando un efecto paracrino del GDF-9 sobre las células somáticas circundantes (Dong *et al.*, 1996). En

cambio, ratones en los que se suprime la expresión de BMP-15 tienen un normal desarrollo folicular y son fértiles (Galloway *et al.*, 2000)

Las ovejas homocigotas para una mutación inactivadora de BMP-15, o inmunizadas contra GDF-9 o BMP-15, tienen detenido el desarrollo folicular en estadio de folículo primario y, por tanto, no ovulan (Davis *et al.*, 1992; Galloway *et al.*, 2000; Juengel *et al.*, 2002). Sin embargo, las ovejas heterocigotas para la mutación inactivadora del gen BMP-15, en las que supuestamente se produce la mitad de la cantidad normal de BMP-15, ovulan un número mayor de folículos (Davis *et al.*, 1992), ocurriendo lo mismo para las mutaciones heterocigotas de GDF-9. Con esto, se puede concluir que tanto BMP-15 como GDF-9 son necesarios para el desarrollo folicular normal y el control del número de folículos ovulados por ciclo estral en la oveja (McNatty *et al.*, 2005). Los mecanismos involucrados en el aumento del desarrollo folicular y ovulación debido a una supuesta hipo-producción de BMP-15, no se conocen. Una explicación podría ser que el mecanismo de retroalimentación entre el ovario y la hipófisis se vean afectados por la expresión reducida de BMP-15, lo que resultaría en un aumento de la señalización mediada por las gonadotropinas, y, por tanto, un aumento del desarrollo folicular (Galloway *et al.*, 2000).

BMP-4 y BMP-7 se expresan en las células de la teca de folículos en crecimiento de rata, ovino y bovino, implicando un rol funcional positivo sobre la proliferación celular y la progresión a través de los sucesivos estadios de desarrollo folicular temprano. El efecto de BMP-4 es aumentar el número de folículos preantrales en crecimiento en ovarios neonatales de rata en cultivo (Nilsson and Skinner, 2003). BMP-7 estimula la síntesis de ADN (efecto mitótico) en células de la granulosa de rata (Lee *et al.*, 2001) y se sabe que inhibe la apoptosis en muchos tejidos (Dudley *et al.*, 1995; Luo *et al.*,

1995), por lo que se cree que también lo hace en las células de la granulosa, promoviendo por tanto, la supervivencia folicular (Shimasaki *et al.*, 2004).

En cuanto a activinas, la expresión de activina así como los receptores de tipo I y II y la foliculostatina se han detectado en los folículos desde estadios tempranos de desarrollo folicular (primarios/secundarios de acuerdo a la especie) indicando roles autocrinos/paracrinos en la progresión folicular temprana (Rabinovici, 1991; McNatty *et al.*, 2000; Drummond *et al.*, 2002; Pangas *et al.*, 2002). Las subunidades βA y βB de activina y la foliculostatina se expresan en las células de la granulosa mientras que los receptores, tanto los de tipo I como los de tipo II, se expresan en las células de la teca, de la granulosa y el ovocito. Los folículos preantrales de roedor secretan activina A (Smith and Cortvrindt, 1998) y ésta mejora el crecimiento folicular y la proliferación de las células de la granulosa (Li *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2001). En cambio, en mutantes deficientes para el receptor de activina tipo IIB, el desarrollo folicular cesa en estadio antral temprano lo que sugiere que la activina promueve la proliferación/diferenciación de las células de la granulosa (Matzuk *et al.*, 1996).

La expresión del TGF- β ha sido documentada en los folículos preantrales en muchas especies incluyendo roedores, humanos, ovejas y ganado vacuno (Teerds and Dorrington, 1992; Schmid *et al.*, 1994; Roy and Kole, 1998; Nilsson *et al.*, 2003; Juengel *et al.*, 2004; Knight and Glistler, 2006). Existe considerable variación espacio-temporal en el patrón de expresión de las isoformas individuales (TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$ y TGF- $\beta 3$) así como también de los dos tipos de receptores (I y II) entre las células de la teca, de la granulosa y el ovocito haciendo dificultosa la realización de inferencias (Oktem and Urman, 2010). Muchos estudios indican un efecto inhibitor del TGF- $\beta 1$

sobre la supervivencia de los folículos primarios y/o progresión hacia las fases preantral tardío/antral temprano. Sin embargo se necesitan más estudios para confirmar o rebatir esta hipótesis (Fortune, 2003, Juengel and McNatty 2005).

Finalmente, queda por resaltar el rol de AMH en los estadios tempranos de desarrollo folicular. Las células de la granulosa continúan expresando AMH hasta la fase antral temprana (ratón), media (humano) o preovulatoria (oveja), lo que implica una relación funcional continua en el desarrollo folicular. Esta hormona parece tener efectos negativos sobre el desarrollo folicular preantral mas allá de la transición de primordial a primario.

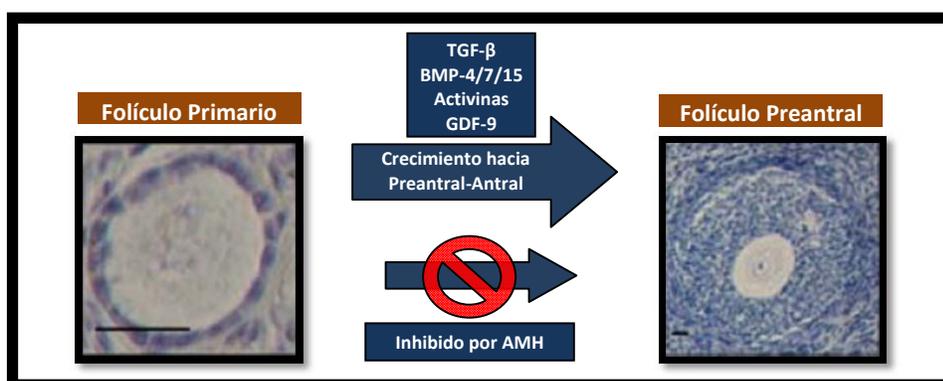


Figura 9. Factores locales involucrados en la transición de folículo primario a folículo preantral/antral. Adaptado de Oktem and Urman (2010).

II.3.3.3. Desarrollo de folículos antrales y mecanismo de selección folicular.

La progresión folicular a través de la fase antral de desarrollo está asociada con una continua proliferación de las células de la granulosa y de la teca interna, un aumento de la vascularización de la teca interna, aumento de tamaño del ovocito y un relativamente rápido aumento de tamaño y de volumen folicular (Knight and Glister, 2006). Como se mencionó anteriormente, la FSH puede influir en el desarrollo folicular en los estadios preantrales tempranos o medios, sin embargo la evolución más allá de la fase antral

pequeño se transforma en dependiente de FSH de manera crítica. En esta etapa del desarrollo folicular, diversos factores locales que integran la superfamilia del TGF- β , tales como TGF- β , AMH y activina-inhibina cumplen un rol autocrino/paracrino en la modulación de la función folicular dependiente de FSH. La exposición diferencial a estos factores podría ser uno de los motivos por los cuales ciertos folículos son más sensibles a la FSH y se transforman en folículos dominantes, continuando su desarrollo a folículo preovulatorio (Knight and Glister, 2006).

TGF- β : Las tres isoformas parecen inducir efectos similares, aunque con diferentes potencias de acuerdo al tipo celular estudiado. Mientras que el TGF- β se considera generalmente un inhibidor de la proliferación celular, múltiples acciones se han reportado en cultivos de células foliculares *in vitro*, los que incluye tanto la supresión como la estimulación de la proliferación de la granulosa y teca según la especie, etapa de la diferenciación folicular y la presencia de otros factores de crecimiento como co-tratamientos (Skinner *et al.*, 1987; Roberts and Skinner, 1991; Lerner *et al.*, 1995). Por ejemplo, TGF- β inhibe la proliferación de células de la granulosa de bovino obtenidas de folículos antrales grandes (Skinner *et al.*, 1987), mientras que aumenta la proliferación de células de la granulosa inmaduras de folículos menos diferenciados de ratas (Dorrington *et al.*, 1988) y folículos preantrales de hámster (Roy, 1993). Como ocurre con la activina A, el TGF- β puede estimular la expresión del receptor de FSH y amplificar la actividad aromatasas inducida por la FSH, la producción de inhibina y de progesterona e inducir la expresión del receptor para LH. Se ha demostrado que el TGF- β puede suprimir la expresión tecal de la enzima Cyp17 y la producción de andrógenos de manera similar a la activina A (Fortune, 2003; Juengel and McNatty 2005; Knight and Glister, 2006).

AMH: reduce la respuesta a FSH de los folículos preantrales y antrales pequeños y de este modo podría tener un rol negativo en el reclutamiento cíclico de los folículos y en el proceso de selección del folículo dominante (Durlinger *et al.*, 2002; Visser and Themmen, 2005). La AMH circulante ha sido correlacionada con el número de folículos antrales detectados por ultrasonografía transvaginal en mujeres (De Vet *et al.*, 2002; Van Rooij *et al.*, 2002) y por inferencia, ha sido relacionado con el tamaño de la reserva folicular. Los niveles séricos de AMH en mujeres con ciclos normales disminuyen con la edad y son indetectables en las mujeres pos-menopáusicas. De este modo, la AMH puede ser utilizada en humanos para determinar la reserva folicular presente en los ovarios (Visser and Themmen, 2005) así como para predecir la respuesta a protocolos de fertilización *in vitro* (Oktem and Urman, 2010).

En vacas sometidas a protocolos de superovulación para transferencia de embriones, se encontró una correlación positiva entre AMH en plasma y la capacidad de producir embriones (Monniaux *et al.*, 2010), resaltando su utilidad como factor predictivo de la respuesta a la superovulación.

Inhibina, activina y foliculostatina: Sus acciones pueden ser clasificadas en autocrina/paracrina en los ovarios y en endocrina sobre el eje hipotálamo-hipofisario-ovárico. En este último aspecto, las 3 moléculas fueron implicadas en la modulación de la secreción de FSH hipofisaria: inhibina y foliculostatina suprimen la secreción, mientras que activina la promueve. Sin embargo, y a pesar de la importante evidencia acerca del rol de la inhibina sobre la secreción de FSH (Knight, 1996; Mather *et al.*, 1997; De Krester *et al.*, 2000), es muy poco probable que la activina de origen ovárico ejerza un efecto endocrino sobre la pituitaria. Además, la activina (al igual que la

foliculostatina) puede ser producida por distintos tejidos, entre ellos la hipófisis anterior (Besecke *et al.*, 1997), demostrando que el efecto sobre la hipófisis puede ser autocrino.

Activina, foliculostatina e inhibina sintetizadas por las células de la granulosa, ejercen un rol autocrino/paracrino para modular el crecimiento folicular, la respuesta a las gonadotropinas, esteroideogénesis, maduración del ovocito y función del cuerpo lúteo (Knight and Glister, 2001). Aunque las células de la granulosa tienen la capacidad de sintetizar inhibinas y activinas desde estadios tempranos del desarrollo folicular (McNatty *et al.*, 2000; Montgomery *et al.*, 2001), existe evidencia que indica que los folículos pequeños producen relativamente más activina que inhibina, mientras que los grandes folículos seleccionados secretan proporcionalmente mayores cantidades de inhibina (Schwall *et al.*, 1990; Yamoto *et al.*, 1992; Glister *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente, la activina estimula la proliferación celular en cultivos de células de la granulosa tanto de folículos pequeños como de grandes (Li *et al.*, 1995; Miro and Hillier, 1996). En adición, ratones mutantes que tienen inhibida la expresión de la subunidad α de inhibina, lo cual conduce a una sobreproducción de activina, tienen una proliferación descontrolada de células de la granulosa y desarrollan tumores ováricos (Matzuk *et al.*, 1992).

La capacidad de responder a la FSH por parte de las células de la granulosa es considerada un evento clave en la vida de un folículo. El descubrimiento de que la activina puede promover la expresión de receptores de FSH sobre células de la granulosa indiferenciadas de ratas (Hasegawa *et al.*, 1988; Xiao *et al.*, 1992), es particularmente significativo desde el hecho que puede explicar como un folículo antral temprano puede pasar de ser gonadotropina-independiente a un estado de desarrollo gonadotropina-dependiente. Debido a la habilidad de la foliculostatina de unirse a la

activina y neutralizar sus efectos, la acción propuesta para la activina de promover los receptores de FSH en pequeños folículos puede operar más eficientemente en ausencia de foliculostatina. Evidencias de que células de la granulosa indiferenciadas expresan relativamente poca foliculostatina en comparación con células de folículos en un estado de desarrollo avanzado (Shimasaki *et al.*, 1989; Nakatani *et al.*, 1991), respaldan este concepto.

Una vez que las células de la granulosa han adquirido receptores de FSH, su proliferación y diferenciación sería impulsada principalmente por FSH (y LH en la fase preovulatoria, cuando existen receptores de LH en granulosa) pero modulada por factores extrínsecos y factores de producción local (Greenwald and Roy, 1994; Webb *et al.*, 1999).

En cuanto a la esteriodogénesis, estudios *in vitro* en células de la granulosa de rata y bovino muestran que la activina puede aumentar la actividad de la aromatas (Cyp19) y la producción de estradiol, mientras que inhibe de la secreción de progesterona (Miro *et al.*, 1991; Shukovski *et al.*, 1991). Estos hallazgos indican que la activina intrafolicular puede tener un papel en el retraso del inicio de la atresia y la luteinización. En cambio, la foliculostatina inhibe el efecto de activina, con un rol importante en la promoción de la atresia folicular o luteinización, dependiendo de la etapa de desarrollo alcanzado.

Un rasgo característico de un folículo dominante es su capacidad para sintetizar y secretar cantidades mucho mayores de estrógenos que sus subordinados, lo que requiere una actividad de Cyp19 alta en células de la granulosa y un suministro adecuado de sustrato para dicha enzima (andrógenos). En la mayoría de las especies, las células de la granulosa carecen de Cyp17 y por tanto son incapaces de sintetizar sus propios

andrógenos, que son sintetizados por las células de la teca. Estudios *in vitro* desarrollados en células de la teca de humanos (Hillier, 1991), ratas (Hsueh *et al.*, 1987) y bovinos (Wrathall and Knight, 1995) han mostrado que la inhibina A puede aumentar la producción de andrógenos inducida por LH. Esta acción de la inhibina podría ser un importante mecanismo intrafolicular de retroalimentación positiva para asegurar que el folículo preovulatorio tenga sustrato suficiente para mantener el aumento de la síntesis de estrógenos (Knight and Glister, 2001). En cambio, cuando células de la teca son tratadas con activina, se reduce la producción de andrógenos inducida por LH, oponiéndose a la acción de la inhibina (Hillier, 1991; Wrathall and Knight, 1995). Hillier (1991) propuso que en los folículos inmaduros que sintetizan muy pocos estrógenos, la síntesis de andrógenos tecales también es baja debido a un exceso relativo de activina sobre inhibina y foliculostatina. Sin embargo, cuando un folículo dominante se aproxima al estado preovulatorio, aumenta la expresión de la inhibina y foliculostatina en células de la granulosa, posiblemente acompañado por la disminución de la expresión de la activina, aumentando la secreción de andrógenos tecales y asegurando de este modo que las células de la granulosa reciban un suministro adecuado de sustrato para la Cyp19 y que coincida con la creciente demanda para la síntesis de estradiol.

Las activinas podrían tener también un rol importante en el desarrollo del ovocito dentro del folículo antral. Las células de la granulosa que forman el cúmulo ovígeno alrededor del ovocito expresan subunidades de inhibina/activina (α , βA y βB) y foliculostatina (Roberts *et al.*, 1993; Sidis *et al.*, 1998), y el ovocito expresa receptores de tipo I y II para activina (Cameron *et al.*, 1994; Sidis *et al.*, 1998). En roedores y

humanos la activina A acelera la maduración del ovocito y en bovinos mejora la competencia del ovocito en el desarrollo (Silva and Knight, 1998).

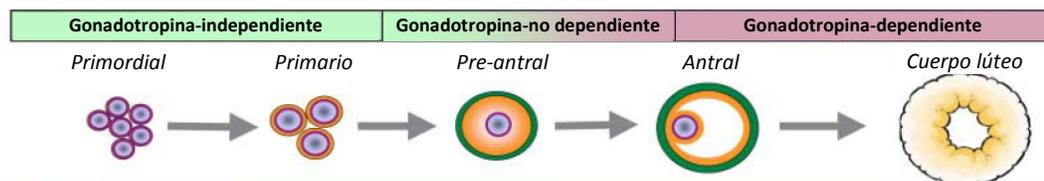
II.3.3.4. Ovulación y formación del cuerpo lúteo.

No existe evidencia de que los elementos de la familia del TGF- β estén involucrados en el proceso ovulatorio en sí mismo. Sin embargo, la falla en la ovulación en respuesta a una perturbación de los miembros de TGF- β y/o sus receptores puede ser visto como una consecuencia de la incapacidad de los folículos de desarrollarse exitosamente hacia la fase preovulatoria (Knight and Glister, 2006).

Luego de la ovulación, la expresión de subunidades de inhibina/activina está disminuida en la mayoría de las especies excepto en los primates (Knight and Glister 2006). Esto hace suponer un rol de la inhibina en la formación del CL y en la producción de progesterona en humanos. En adición, TGF- β podría también contribuir a la formación de CL. TGF- β 1 y TGF- β 2 son expresados en células lúteas de ratones (Ghiglieri *et al.*, 1995). En roedores, es posible que los TGF- β s desempeñen el rol de mediadores de las acciones luteotrópicas de la prolactina, con la subsecuente inhibición de la apoptosis de las células lúteas.

Es ampliamente reconocido que el proceso de luteinización se encuentra bajo el control de factores inhibidores de la luteinización derivados del ovocito; éstos actúan para prevenir la luteinización y suprimir la síntesis de progesterona hasta el momento en que ocurre la ovulación y el ovocito es liberado. Los factores BMP-6, BMP-15 y GDF-9 derivados del ovocito, tienen la habilidad de actuar como inhibidores de la actividad luteinizante en cultivos de células de la granulosa, inhibiendo por ejemplo la producción de progesterona, aumentando la secreción de estradiol y aumentar la proliferación de

células granulosa (Shimasaki *et al.*, 1999; Otsuka *et al.*, 2001 a,b; Glister *et al.*, 2004). Es altamente probable que la pérdida de estos factores durante la ovulación tenga un efecto significativo sobre las células restantes de folículo promoviendo la luteinización (Knight and Glister, 2006).



LIGANDO	PRIMORDIAL	PRIMARIO A PRE-ANTRAL	ANTRAL	CUERPO LÚTEO
AMH (CG desde folículo primario a antral temprano)	Desde CG of folículos preantrales en crecim: ↓ Reclutam de fol primordiales	↓ Mitosis CG y la respuesta a la FSH en la progresión folicular??	¿?	¿?
BMP-4 BMP-7 (ovocito desde primordial/pri mario)	Desde teca/estroma: ↑ Activación de fol primordiales	↑ prolif CG, crec de fol preantrales y supervivencia folicular	↑ Prod de E2 basal o induc por FSH, inhib, prod de activ y ↑ prolif CG; ↓ Prod P4 por CG; ↓ Prod de andrógenos basal e inducida por LH en TC	↓ luteinización/atrasia de CG; Podría ↓ la ovulación
GDF-9 (ovocito desde primordial/pri mario)	¿? Posible rol en ↑ de la formación de fol primordiales	↑ progresión folicular desde más allá de estadio primario (esencial)	↑ prolif de CG y ↓ de P4; ↑ expansión del cúmulo; podría regular la resp de CG a FSH e influir en la tasa de ovulación (oveja)	¿?
BMP-15 (ovocito desde primordial/pri mario)	¿?	↑ progresión folicular desde más allá de estadio primario (esencial en ovejas pero no en roedores)	↑ prolif CG y ↓ de P4; podría regular la resp de CG a FSH e influir en la tasa de ovulación (oveja)	¿?
TGF-β (TC, CG, ovocito)	¿?	¿? Información conflictiva	↓ Prod andrógenos basal e inducida por LH en TC; información conflictiva para CG	¿? Media acción luteotrópica de la PRL (rata); ↑ la expr de activ/inhib βB en cél lúteas (humano)
ACTIVINA (CG desde preantral tardío)	¿?	↑ proliferación de CG, ↑ FSHr y expresión de aromatasa inducida por FSH; ↓ producción de andrógenos inducidos por LH en TC	↑ proliferación de CG, ↑ FSHr y expresión de aromatasa inducida por FSH; ↓ Prod andrógenos inducida por LH en TC; ↑ maduración del ovocito	↓ luteinización/atrasia de CG; ↓ Prod P4 luteal
INHIBINA (CG desde folículos antrales)	¿?	¿?	↑ Prod andrógenos induc por LH en TC; podría ↓ el crecim de folículos subordinados	Podría ↑ Prod P4 luteal (sólo en primates y humanos)

Figura 10. Resumen de las posibles funciones de los miembros de la superfamilia TGF-β en los diferentes estadios de desarrollo folicular. Adaptado de Knight and Glister (2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS



III- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. PROCEDIMIENTOS REALIZADOS CON ANIMALES

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

III.1.1. Diagnóstico y obtención de muestras provenientes de casos de COD espontánea identificados “a campo”

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

A partir del diagnóstico de COD y dependiendo del tipo de animal, se tomaron dos tipos de muestras: ovarios enteros (en vacas con indicación de rechazo por motivos No Reproductivos -descarte por enfermedades de la ubre, podales, etc.-) o líquido folicular (LF; en vacas que continuaban en el tambo). La obtención de ovarios enteros se efectuó mediante ovariectomía bilateral transvaginal, mientras que la obtención de LF se realizó por aspiración folicular guiada por ecografía, utilizando la técnica descrita por

Schernthaner *et al.* (1999) y las adaptaciones de Seneda *et al.* (2003), como se detalla más adelante.

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

III.1.1.1. Aspiración folicular guiada por ecografía:

Para la realización de la aspiración de LF se adaptó la técnica descrita por Seneda *et al.* (2003) que ha sido ampliamente utilizada para la obtención de muestras para estudios moleculares (figura 11). Con este fin, se utilizó un sistema de ultrasonido digital Chison 8300 vet equipado con un transductor microconvexo de 5,0 MHz montado en una sonda transvaginal para aspiración folicular (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil). La misma posee una guía para la colocación de una aguja calibre 20G con bisel ecogénico que se conecta por medio de una tubuladura de teflón a tubos contenedores cónicos estériles de 50 ml. Para la aspiración se empleó una bomba de vacío (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil) a una presión de aspiración de 500 mm Hg. El dispositivo de aspiración fue introducido vía vaginal hasta contactar con el fondo de la misma y el ovario localizado por tacto rectal, fue acercado y fijado al transductor de la sonda. Luego se realizó la introducción de la aguja a través de la pared vaginal y posteriormente a través de la pared folicular para la toma de muestra. Inmediatamente de recolectada la muestra de LF, se procedió a su conservación a temperatura de refrigeración (4-6°C) y traslado al laboratorio para su procesamiento.



Figura 11. Técnica de aspiración folicular guiada por ecografía.

III.1.1.2. Ovariectomía bilateral mediante abordaje transvaginal:

Una vez detectada la enfermedad quística ovárica, en vacas con indicación de rechazo, se procedió a la obtención de muestras de ovarios enteros mediante ovariectomía bilateral de acuerdo a lo descrito por Garnero y Perussia (2002). Esta técnica se realizó a través de abordaje transvaginal con el animal en pie (figura 12) debido a que, al tratarse de hembras pluríparas, el tamaño de los genitales externos (vulva y vagina) era lo suficientemente espacioso como para permitir un cómodo acceso del cirujano, evitando de esta manera cicatrices indeseadas en zonas de valor comercial (flanco izquierdo).

En primer lugar se sedó al animal con 150 mg totales de clorhidrato de ketamina (Ketamina 10%, Alfazan®) y se efectuó anestesia epidural baja con 100 mg totales de clorhidrato de lidocaína (Lidocaína 2%, Vetue®). En segundo lugar, se realizó la limpieza y desinfección del área perineal y de la cavidad vaginal con una solución de cloroxilenol al 5 %. Luego se procedió a realizar una pequeña incisión en el fondo de la vagina (parte dorsal o techo de la misma) utilizando un bisturí de hoja oculta, perforando ésta y el peritoneo con la ayuda de un tensor de vagina. El siguiente paso consistió en introducir una mano dentro de la cavidad pélvica., localizar el útero y retraerlo, junto con los ovarios, dentro de la vagina (Garnero and Perusia, 2002). Se procedió a la sección y extracción de ambos ovarios, ligando previamente por

transfixión los vasos sanguíneos que lo irrigan. Para evitar rupturas de las estructuras foliculares, previo a la ovariectomía se realizó la extracción del LF mediante el sistema de aspiración folicular anteriormente descrito. Finalmente los animales fueron tratados con antibióticos (Penicilina-Estreptomicina 20.000 UI/kg/día, durante 5 días; Penicilina-estrepto®, Laboratorio Río de Janeiro), coagulantes (Ciclonamina 6mg/kg + Vitamina K 0,02 mg/kg; Coagulante Chinfield®, Laboratorio Chinfield), antiinflamatorios (Flunixin meglumina 2,2mg/kg/día, durante 3 días; Algimine 5%®, Zoovet) y antiparasitarios externos (Fenitrotión 6,63 %, aplicado en forma de aerosol para cubrir la herida y 4 cm alrededor de la misma; Curavet plata aerosol®, Zoovet).



Figura 12. Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje transvaginal.

III.1.2. Inducción experimental de COD

III.1.2.1. Animales:

Se utilizaron 10 vaquillonas de la raza Holando Argentino puros por cruce, de entre 18 y 24 meses de edad, con un peso promedio de 400 kg, examinadas por tacto rectal y ultrasonografía antes del comienzo de la experiencia para comprobar la normalidad en su tracto reproductor y la normalidad y regularidad de sus ciclos estrales. Los animales

fueron alojados en corrales descubiertos; la alimentación se basó en alimento balanceado comercial, heno de alfalfa y agua *ad libitum*.

Todas las vaquillonas fueron sometidas a la sincronización de sus ciclos estrales mediante el protocolo Ovsynch (Pursley *et al.*, 1995) de la siguiente manera: se administraron 100 µg de un análogo sintético de GnRH (2.5 ml IM de buserelina acetato, Receptal ®, Intervet, Argentina) el día -9, el día -2 se administraron 150 µg de Prostaglandina (PG) (D+Cloprostenol, Ciclar, Zoovet®) y el día 0 se realizó la última administración de 100 µg de GnRH. La ovulación fue confirmada mediante ultrasonografía (Sirois and Fortune, 1998) luego de la última inyección de GnRH y fue designada como día 1 del ciclo estral (figura 13). Se optó por utilizar a la ovulación como evento clave para ubicar el día exacto del ciclo estral en que se encontraban los animales debido a que este protocolo de sincronización fue diseñado para sincronizar eficientemente la ovulación pero no los celos (Pursley *et al.*, 1995), definiendo este evento como día 1 de ciclo de acuerdo con lo publicado por numerosos autores (Hafez and Hafez, 2000; Forde *et al.*, 2011; Sartori and Barros, 2011). Durante este período, los animales no recibieron ningún otro tratamiento.

III.1.2.2. Grupos experimentales:

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

Grupo I (n=5): luego de la sincronización de celos, estas vaquillonas fueron tratadas con 100 UI de ACTH (1mg/ml de Tetracosactido [corticotropina], Synacthen depot, laboratorio Novartis), cada 12 horas por un período de 7 días seguidos a partir del día 15 del ciclo estral. El comienzo del tratamiento (día 15 del ciclo estral normal) se realizó en el momento del ciclo en el que la onda preovulatoria de LH comienza a ser

sensible a la inhibición por la ACTH exógena (Liptrap and McNally, 1976; Dobson *et al.*, 2000; Ortega *et al.*, 2008).

Grupo II (n=5): luego de la sincronización de la ovulación, este grupo de hembras fue mantenido en condiciones ambientales idénticas al grupo I y sin tratamiento; como grupo control.

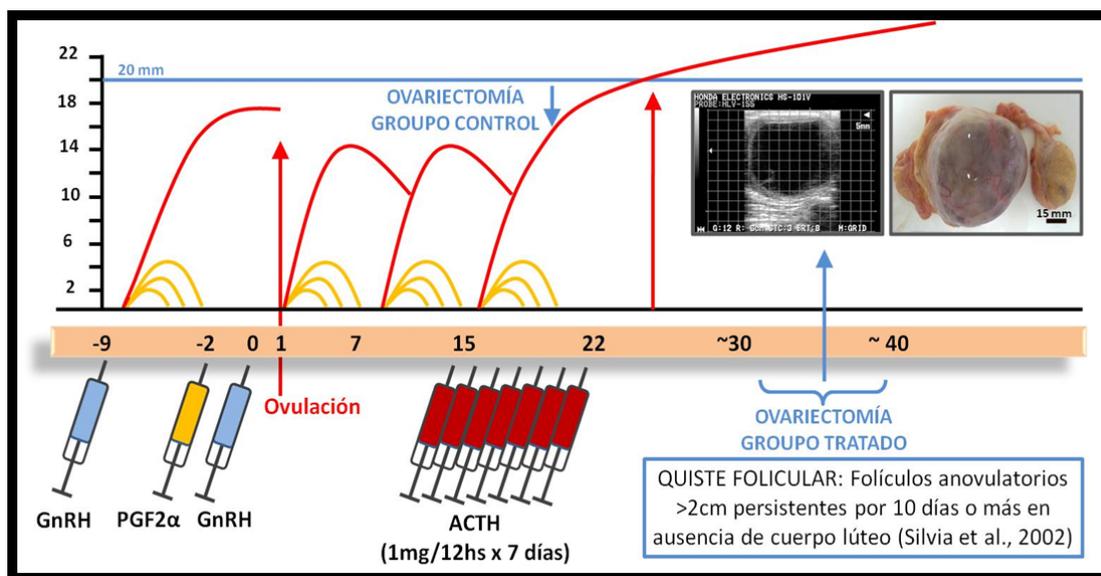


Figura 13. Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes foliculares mediante ACTH.

III.1.2.3. Monitoreo de los cambios ováricos:

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

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

III.1.2.4. Toma de las muestras:

La extracción de las muestras se realizó mediante ovariectomía bilateral a través de abordaje por flanco izquierdo. Se optó por esta técnica debido a que, al tratarse de vaquillonas, el tamaño de sus órganos genitales externos no permite un cómodo acceso al cirujano y por lo tanto, se ve imposibilitada la aplicación de la técnica de abordaje transvaginal. Previamente a la ovariectomía se obtuvieron diariamente muestras de sangre, desde el inicio del tratamiento con ACTH hasta el día de la ovariectomía.

Se realizó el abordaje por el flanco izquierdo con el animal en pie (figura 14), el cual se preparó quirúrgicamente. En primer lugar se realizó la sedación mediante la aplicación por vía subcutánea (SC) de 5 ml de una formulación que combina 5 mg/ml de Clorpromazina y 2 mg/ml de Difenhidramina (Stresin LA®, Laboratorio Rio de Janeiro) y luego se realizó anestesia local infiltrativa según la técnica de Magda modificada, utilizando 160 ml de clorhidrato de lidocaína al 2% (Lidocaína 2%, Vetue®). Mediante esta técnica se depositó una banda de anestésico por encima de cada apófisis transversa de las vértebras lumbares y otra por debajo, con la finalidad de bloquear los nervios torácico 13 y lumbares 1, 2, 3 y 4. Se procedió realizar una incisión desde dorso-caudal hacia ventro-craneal de la piel del flanco y los planos musculares que se encuentran debajo de la misma, de una longitud suficiente para permitir un buen acceso a cavidad abdominal de las manos del cirujano. Una vez localizados, ambos

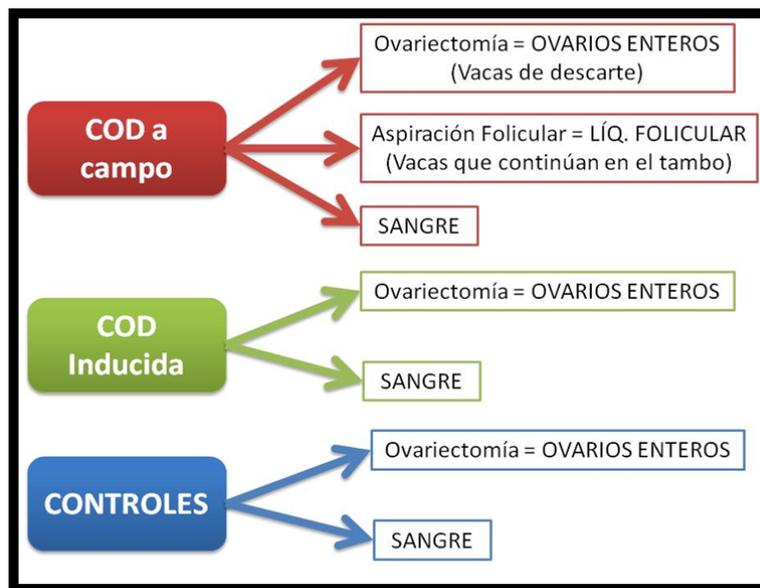


Figura 15. Esquema de muestras obtenidas de acuerdo al grupo de animales.

A nivel de laboratorio, fueron 4 los tipos de muestras que se extrajeron a partir del material proveniente del campo y del modelo experimental, y sobre las cuales se realizaron posteriormente todas las determinaciones:

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

b) Muestras de pared folicular, tanto de quistes espontáneos como de folículos sanos (en los animales control), incluyendo: folículos pequeños menores a 5 mm de diámetro; folículos medianos entre 5 y 10 mm de diámetro; y folículos grandes mayores a 10 mm (Parrott and Skinner, 1998). Todas estas muestras fueron conservadas a -80°C hasta su procesamiento (extracción de proteínas para la técnica de Western Blot).

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

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

III.2.1. Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas

Luego de la fijación las muestras fueron lavadas en buffer fosfato salino (PBS) y procesadas siguiendo protocolos histológicos de rutina para efectuar la inclusión en parafina (Salveti *et al.*, 2010).

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

III.2.2. Procesamiento de las muestras para *Western Blot*

Cabe resaltar que en este trabajo sólo se corroboró por *Western Blot* la especificidad de los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica por lo que sólo se evaluaron 2 muestras por cada categoría de folículos en animales sanos y en

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

III.3. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES EN SUERO Y LÍQUIDO FOLICULAR

Las concentraciones de estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en suero y líquido folicular de animales control y de aquellos con COD inducida y espontánea fueron evaluadas por un laboratorio externo mediante kits de ELISA (Estradiol EIA, DSL-10-4300; Progesterone EIA, DSL-10-3900; Testosterone EIA, DSL-10-4000; Cortisol DSL-1-200; Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 7 pg/ml para estradiol, 0,13 ng/ml de progesterona, 0,04 ng/ml para la testosterona, y 0,10 mg/dl para el cortisol.

III.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MIEMBROS DE TGF- β

III.4.1. Inmunohistoquímica:

Mediante esta técnica se logró la identificación *in situ* de las proteínas TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, activina, inhibina y foliculostatina, en tejido ovárico proveniente de animales con COD espontánea así como del modelo de inducción experimental y en los controles, utilizando anticuerpos específicos disponibles comercialmente, detallados en la Tabla 3.

Anticuerpos	Clon	Proveedor comercial	Dilución	Recuperación Antigénica
<i>Primarios</i>				
TGF-β1	Policlonal	Santa Cruz	1:25	Si
TGF-β2	Policlonal	Santa Cruz	1:200	Si
TGF-β3	Policlonal	Santa Cruz	1:200	No
Activina (βA)	Monoclonal	Abcam	1:50	Si
Inhibina (α)	Monoclonal	Serotec	1:75	Si
Foliculostatina	Policlonal	Abcam	1:100	No
<i>Secundarios</i>				
IgG anti-rabbit Biotinilado	Policlonal	Leth AM-B1	1:100	-
IgG anti-mouse Biotinilado	Policlonal	Leth AR-B1	1:100	-

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

Las inmunodetecciones se realizaron sobre cortes de 4 μ m de espesor, siguiendo el protocolo descrito previamente por Ortega *et al.* (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- Se realizaron 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 toda la noche a 4°C (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- Se realizaron 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- Se realizaron dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- 13- Incubación con complejo extravidina-peroxidasa lista para usar (Sigma), durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 14- Se realizaron 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- Se realizaron dos lavados con agua destilada, de 5 minutos cada uno. Luego se realizó la coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur), deshidratación y montaje con Bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur) y cubreobjetos apropiados.

En aquellos ensayos donde se empleó anticuerpo primario anti TGF- β 3 y anti-foliculostatina se realizó una modificación a la técnica de rutina, omitiendo la recuperación antigénica. En el caso de inhibina, se utilizó un anticuerpo primario que se une a la fracción α de dicho dímero, mientras que para activina se recurrió a un anticuerpo que se une a la fracción β A. La inmunomarcación fue visualizada en citoplasma para todas las isoformas de TGF- β y también para activina, inhibina y foliculostatina. La marcación obtenida en cada caso, se cuantificó en las capas de células de la granulosa y de la teca interna.

Se digitalizaron imágenes de cada una de las capas de la pared folicular de folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos en todos los grupos experimentales y los folículos quísticos en los grupos COD inducida y espontánea.

III.4.2. Western Blot

Esta técnica fue utilizada para la determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados. Se realizaron electroforesis en geles discontinuos de poli(acrilamida-bis(acrilamida), 29:1) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). El tamaño del poro para el gel de resolución se correspondió con una concentración de acrilamida del 12%. Se utilizaron homogeneizados de pared

folicular de folículos antrales pequeños, grandes y quísticos (Parrott and Skinner, 1998). Se prepararon las muestras diluyendo 1:2 con buffer de muestra en condiciones reductoras para SDS-PAGE, y posteriormente se incubaron en baño termostático a 95°C por 5 minutos. Se utilizó una cuba vertical y el buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1 % de SDS, pH 8,3. Según los valores obtenidos de la cuantificación 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 en la Tabla 4.

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

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

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

Anticuerpos	Clon	Proveedor comercial	Dilución
<i>Primarios</i>			
TGF-β1	Policlonal	Santa Cruz	1:50
TGF-β2	Policlonal	Santa Cruz	1:200
TGF-β3	Policlonal	Santa Cruz	1:200
Activina	Monoclonal	Abcam	1:50
Inhibina	Monoclonal	Serotec	1:75
Foliculostatina	Policlonal	Abcam	1:50
<i>Secundarios</i>			
IgG anti-rabbit peroxidasa	Policlonal	LETH	1:1000
IgG anti-mouse peroxidasa	Policlonal	LETH	1:1000

Tabla 5. Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de western blot.

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

1. Se enjuagó la membrana de nitrocelulosa con agua destilada y luego con buffer tris salino-Tween (TBS-T) hasta la desaparición del colorante Rojo Ponceau.
2. Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con TBS-T leche 5 %, 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.
3. Se realizaron los siguientes lavados a temperatura ambiente con TBS-T
 - Dos lavados rápidos
 - Un lavado de 15 minutos
 - Dos lavados de 5 minutos
4. Se procedió a 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. Se realizaron los siguientes lavados a temperatura ambiente con TBS-T
 - Dos lavados rápidos

- Un lavado de 15 minutos
 - Dos lavados de 5 minutos
6. Se procedió a incubar con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Para la dilución se utilizó buffer de bloqueo y se procedió como en el paso 4.
 7. Se realizaron los siguientes lavados a temperatura ambiente con TBS-T.
 - Dos lavados rápidos
 - Un lavado de 15 minutos
 - Cuatro lavados de 5 minutos
 8. Se preparó el reactivo quimioluminiscente (Amersham), se colocó la membrana en un recipiente con el reactivo e incubó 5 minutos.
 9. Se escurrió la membrana y colocó entre dos hojas de papel celofán.
 10. Se reveló la membrana en cuarto oscuro con los reactivos de revelado y fijado Kodak; y placas radiográficas Amersham.
 11. Se realizó un lavado con agua destilada.
 12. Finalmente, se secó de la placa a temperatura ambiente.

III.4.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Los niveles de inhibina B en suero y LF fueron cuantificados mediante un kit de ELISA comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*Inhibin-B Gen II; Beckman Coulter*). Previo a la realización del ensayo, todas las muestras de LF provenientes de animales con COD espontánea y de animales control, tanto de folículos antrales como de quistes, se diluyeron 1:10 en suero fetal bovino. Las muestras de LF, de suero (sin diluir) así como los patrones fueron colocados en los pocillos de la placa, a continuación se colocó buffer de ensayo específico del kit y se incubó todo a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego se lavaron las muestras, se colocó el

anticuerpo conjugado con biotina y se incubó durante 1 hora. Finalmente, luego de los lavados correspondientes, se colocó estreptoavidina conjugada con la enzima peroxidasa y se realizó una incubación durante 30 minutos. La reacción fue evidenciada mediante el revelado con una solución de TMB como cromógeno, el cual fue incubado durante 15 minutos. La reacción se detuvo con H_2SO_4 y se realizó la lectura a 450 nm con un lector de ELISA (Multiskan Lab Systems, Inc.). El límite de detección del kit es de 2 pg/ml; y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 8 y 4% respectivamente.

III.4.4. 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 *et al.*, 2000; Salvetti *et al.*, 2004; Ortega *et al.*, 2007b).

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.

III.5. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

Antes de iniciar el análisis estadístico se comprobó la normalidad de la población de datos evaluados.

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 15.0.1 para Windows. La concentración sérica de esteroides en animales control y tratados con ACTH durante el protocolo experimental fue estudiada mediante análisis multivariante de varianza (MANOVA) para determinar los efectos del tiempo y del tratamiento y la interacción tiempo por tratamiento. Luego se analizó la diferencia entre controles y tratados en cada día mediante t-Student.

Los niveles de hormonas esteroides en suero y líquido folicular de animales control, tratados con ACTH y con COD espontánea, fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó Duncan. El nivel de significancia utilizado para ANOVA fue $p < 0,05$.

Para evaluar la expresión proteica mediante inmunohistoquímica, se realizó un análisis de la varianza de los datos aplicando pruebas paramétricas para varios grupos (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó Duncan. Se analizaron por separado las estructuras foliculares análogas (foliculos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos). También se compararon los quistes (inducidos o espontáneos) con los foliculos terciarios y atrésicos del grupo control. El nivel de significancia utilizado para ANOVA fue $p < 0,05$. Los valores se expresaron como el promedio \pm el desvío estándar (DE).

Finalmente, la evaluación de inhibina en líquido folicular y suero mediante ELISA se realizó utilizando prueba t-Student para comparar los valores de animales en proestro y animales con COD. Para todos los análisis, $p < 0,05$ fue considerado significativo.

IV. RESULTADOS



III- RESULTADOS

IV.1. RESULTADOS DE PROCEDIMIENTOS REALIZADOS CON ANIMALES**IV.1.1. Diagnóstico y obtención de muestras provenientes de casos de COD espontánea identificados “a campo”**

Se logró trabajar en tres establecimientos lecheros comerciales del Departamento Las Colonias, Provincia de Santa Fe, los cuales se detallan a continuación:

- Establecimiento “El Carmen”: ubicado en la zona rural de Empalme San Carlos, más precisamente a 31°34’ de latitud Sur y 60°49’ de longitud Oeste. Cuenta con un promedio anual de 5500 litros por día con 220 vacas en ordeño.
- Establecimiento “Santa Ana”: ubicado en Pujato Norte, más precisamente a 31°30’ de latitud sur y 60°57’ de longitud oeste. Cuenta con un promedio anual de 5500 litros por día con 250 vacas en ordeño.
- Establecimiento “La Cabañita”: ubicado en la localidad de Hipatia, más precisamente a 31° 07’ de latitud Sur y 61°03’ de longitud Oeste. Cuenta con un promedio anual de 24000 litros por día con 985 animales en ordeño.

Durante el período comprendido entre el 11 de febrero de 2010 al 08 de marzo de 2012 se identificaron 78 casos de quistes foliculares ováricos, de los cuales se obtuvieron 68 muestras de líquido folicular mediante aspiración guiada por ecografía y 10 muestras de ovarios mediante ovariectomía bilateral (figura 16). También se tomaron muestras de sangre a todas las vacas consideradas como “CASO” (con COD espontánea) así como de sus respectivos “CONTROLES”. Fueron considerados controles aquellas vacas que, comparadas con el caso, tenían el mismo número de lactancias, la misma edad, se encontraban en el mismo momento de la lactancia (días en lactancia) y en el mismo lote, es decir, bajo las mismas condiciones ambientales y de

alimentación. Además, se recabó una gran cantidad de información a través de una completa anamnesis, que incluyó: edad, número de lactancias, padre, madre, producción de leche, fecha del último parto, producción de la lactancia anterior, fecha del último celo, condición corporal, patologías, fecha de diagnóstico del quiste, época del año, intervalo parto-diagnóstico, hallazgos a la ecografía, tratamiento, respuesta al tratamiento y relación energía/proteína de la dieta. Todos estos datos, junto a los obtenidos a partir de las numerosas determinaciones analizadas en las muestras de sangre, están siendo procesados como parte una tesis doctoral en curso.

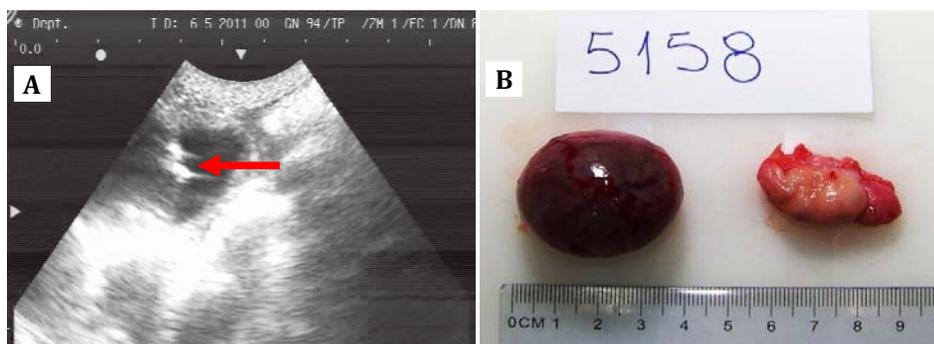


Figura 16. (A) Imagen ecográfica de un quiste espontáneo en el momento de la aspiración folicular guiada por ecografía (la flecha roja indica la aguja dentro del folículo). (B) Ovarios de una vaca con COD espontánea obtenidos mediante ovariectomía bilateral.

En cuanto al diagnóstico ecográfico y la morfología folicular (figura 17), los quistes espontáneos presentaron un diámetro promedio de $35,1 \pm 6,0$ mm, con una morfología compatible a la descrita en la bibliografía (Silvia *et al.*, 2002; Wiltbank *et al.*, 2002; Bartolomé *et al.*, 2005; Vanholder *et al.*, 2006). En este último aspecto, todas las vacas diagnosticadas con COD a campo presentaban folículos únicos o múltiples, pared folicular menor a 3 mm, ausencia de cuerpo lúteo y falta de tono uterino. Microscópicamente también fueron observados folículos en varios estadios de desarrollo incluyendo folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos y, en todos los casos, ausencia de tejido luteal activo. Las capas granulosa y teca presentaron células aparentemente sanas, sin procesos degenerativos. La persistencia de los folículos

quísticos en estas vacas fue imposible de determinar de manera exacta, pero se estima en más de 10 días debido a la falta de tono uterino a la palpación rectal (Bartolomé *et al.*, 2005). A nivel microscópico, este hecho quedó reflejado en la capa de células de la granulosa, donde algunos quistes presentaron ausencia total o parcial de dicha capa debido al envejecimiento folicular como consecuencia de una persistencia muy prolongada. Cabe aclarar que las evaluaciones histológicas e inmunohistoquímicas se realizaron solamente en los folículos quísticos que presentaban células de la granulosa.

IV.1.2. Inducción de la enfermedad quística ovárica

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

El éxito de la inducción de COD fue confirmado mediante observación de la morfología ovárica y cuantificación de los niveles hormonales. Todos los animales tratados con ACTH respondieron a dicho tratamiento con la formación de 1 quiste folicular. El día inicial de la detección del quiste fue en promedio $26,1 \pm 3,2$ y el diámetro promedio al momento de la ovariectomía fue de $25,2 \pm 1,9$ mm. Estos folículos quísticos se mostraron a la ecografía como estructuras ováricas uniformemente anecogénicas, con una pared ≤ 3 mm en ausencia de un cuerpo lúteo. Además, mediante palpación rectal pudo corroborarse la falta de tono uterino. Microscópicamente fue evidenciada la presencia de estructuras foliculares en crecimiento, folículos en diferentes estadios de atresia y la ausencia en todos los casos de tejido luteal (figura 17).

El monitoreo ecográfico diario durante un ciclo estral completo en animales control reveló una dinámica folicular normal y permitió la toma de muestras de sangre para las distintas determinaciones hormonales. Cuando se realizó la sincronización de celos de

estos animales (como parte del protocolo ya descrito), el folículo ovulatorio fue detectado el día 15 y su diámetro promedio fue de $11,8 \pm 1,7$ mm al momento de la ovariectomía (día 18 aproximadamente). Histológicamente, los ovarios exhibieron folículos en varios estadios de desarrollo incluyendo primarios, secundarios y terciarios, así como folículos atrésicos y un cuerpo lúteo en regresión.

La comparación del tamaño folicular entre folículos preovulatorios (grupo control), quistes inducidos mediante ACTH (grupo COD inducida) y quistes espontáneos (grupo COD espontánea) permitió establecer la existencia de diferencias significativas en dicho parámetro, siendo los quistes espontáneos los que presentaron el mayor tamaño al momento de la ovariectomía o aspiración folicular, seguidos por los quistes inducidos con ACTH y finalmente, por los folículos preovulatorios (figura 17).

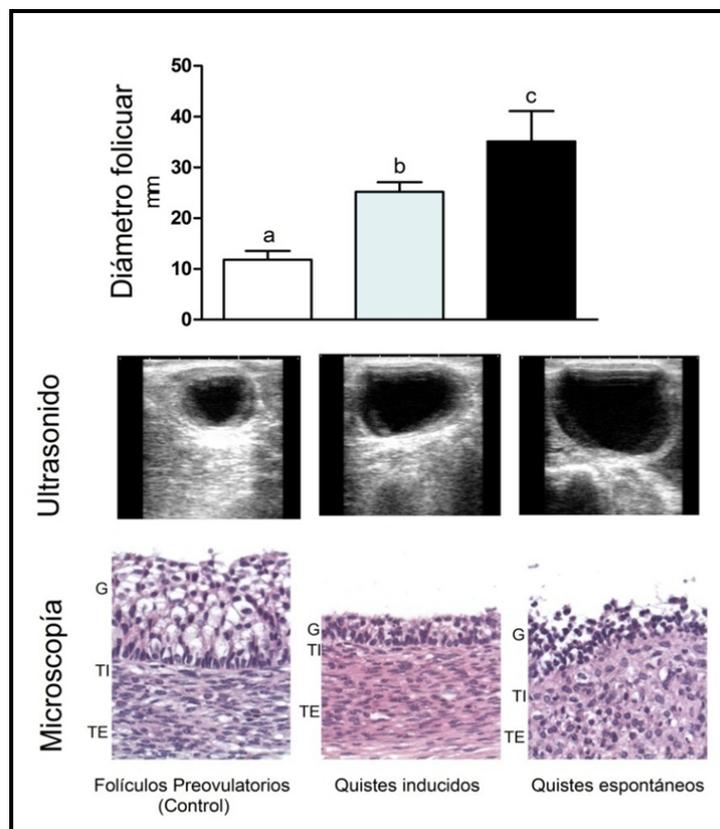


Figura 17: Características morfológicas de los folículos preovulatorios y quísticos al momento de la extracción mediante ovariectomía. Se observa el diámetro folicular promedio, imágenes de ultrasonido y características histológicas. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$). G: granulosa; TI: teca interna, TE: teca externa.

IV.1.3. Efecto de la ACTH sobre los niveles de hormonas esteroides

Las muestras de sangre que fueron tomadas diariamente en animales control durante un ciclo estral completo previo al tratamiento y en animales tratados con ACTH durante el tratamiento y hasta una semana después de la finalización del mismo, revelaron un efecto significativo del tratamiento y del tiempo en todos los niveles y para todas las hormonas y una interacción tiempo por tratamiento para estradiol, progesterona y cortisol (figura 18).

Las concentraciones de estradiol fueron significativamente mayores durante el tratamiento en animales tratados con ACTH (día 15 a 18). En el comienzo del subsecuente ciclo estral (días 23 a 28), las concentraciones de dicha hormona en animales control disminuyó, mientras que en los tratados continuó aumentado significativamente. En animales tratados, los niveles de progesterona se incrementaron significativamente al final del tratamiento (días 17 a 20), mientras que en los controles la progesterona aumentó a partir del día 22, probablemente debido a la formación de un nuevo cuerpo lúteo luego de la ovulación. La testosterona mostró un perfil similar en ambos grupos hasta el día 27, momento en el cual los animales del grupo control presentaron un incremento significativo en su concentración. Por último, los niveles de cortisol fueron significativamente mayores durante el tratamiento con ACTH en el grupo tratado (días 15 a 21), disminuyendo a valores similares a los del grupo control a partir del día 23.

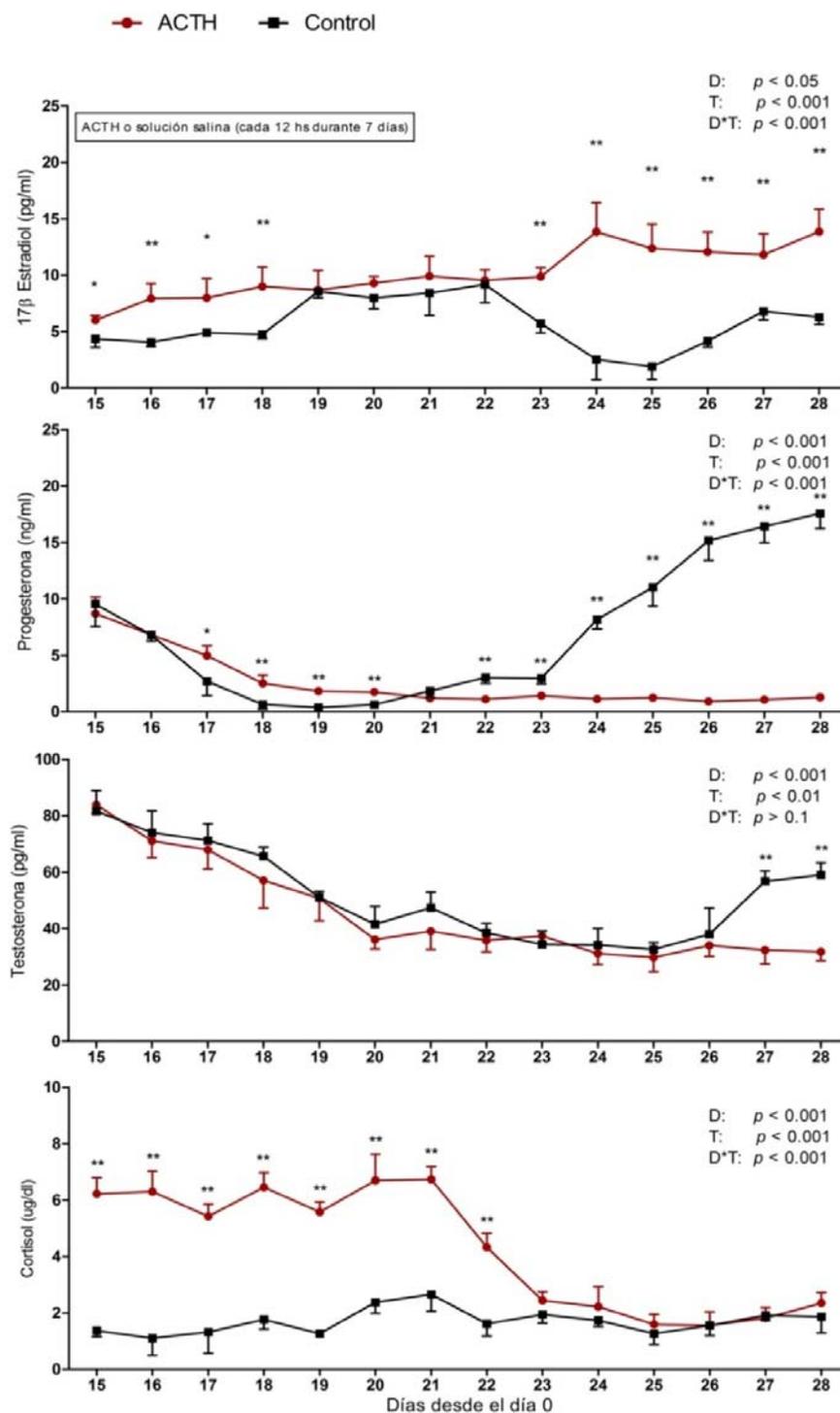


Figura 18. Concentraciones séricas de 17β-estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en animales de los grupos control y tratados con ACTH durante el protocolo experimental. Los resultados expresan la media \pm DEM. Los datos se analizaron de acuerdo al tiempo transcurrido después del día de la ovulación (día 1) en el ciclo anterior a la sincronización (grupo control) y durante la aplicación de ACTH (grupo tratado). D: efecto de días del experimento; T: efecto del tratamiento; D*T: efecto de interacción entre días y tratamiento. Los valores con superíndices indican diferencias (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$) entre los grupos tratado y control para cada tiempo evaluado.

IV.1.4. Concentración de hormonas esteroides en suero y líquido folicular

Los niveles de 17β -estradiol, progesterona, testosterona y cortisol, en suero y líquido folicular obtenidos al momento de la ovariectomía de los animales del grupo control, tratados con ACTH y de animales con quistes espontáneos, fueron cuantificados y los resultados se muestran en la figura 19. Los animales del grupo control evidenciaron una concentración significativamente mayor de progesterona en suero, aunque en concentraciones subluteales ($<1\text{ng/ml}$). No existieron diferencias significativas en las concentraciones de estradiol y cortisol, mientras que los niveles de progesterona mostraron una tendencia a aumentar ($p=0,06$) en suero de animales con quistes espontáneos en comparación con animales del grupo tratado.

En líquido folicular, las concentraciones de estradiol fueron similares en todos los grupos, con una tendencia a disminuir en quistes inducidos con ACTH en relación a los folículos preovulatorios ($p=0,055$). Los niveles de progesterona fueron significativamente menores en los quistes espontáneos e inducidos con respecto a los folículos controles. En cuanto a la testosterona, se evidenció una mayor concentración en quistes espontáneos en relación a folículos preovulatorios. Por último, los niveles de cortisol fueron mayores en ambos tipos de folículos quísticos respecto a los folículos controles, evidenciándose diferencia significativa entre los quistes espontáneos e inducidos, con una mayor concentración de cortisol en estos últimos.

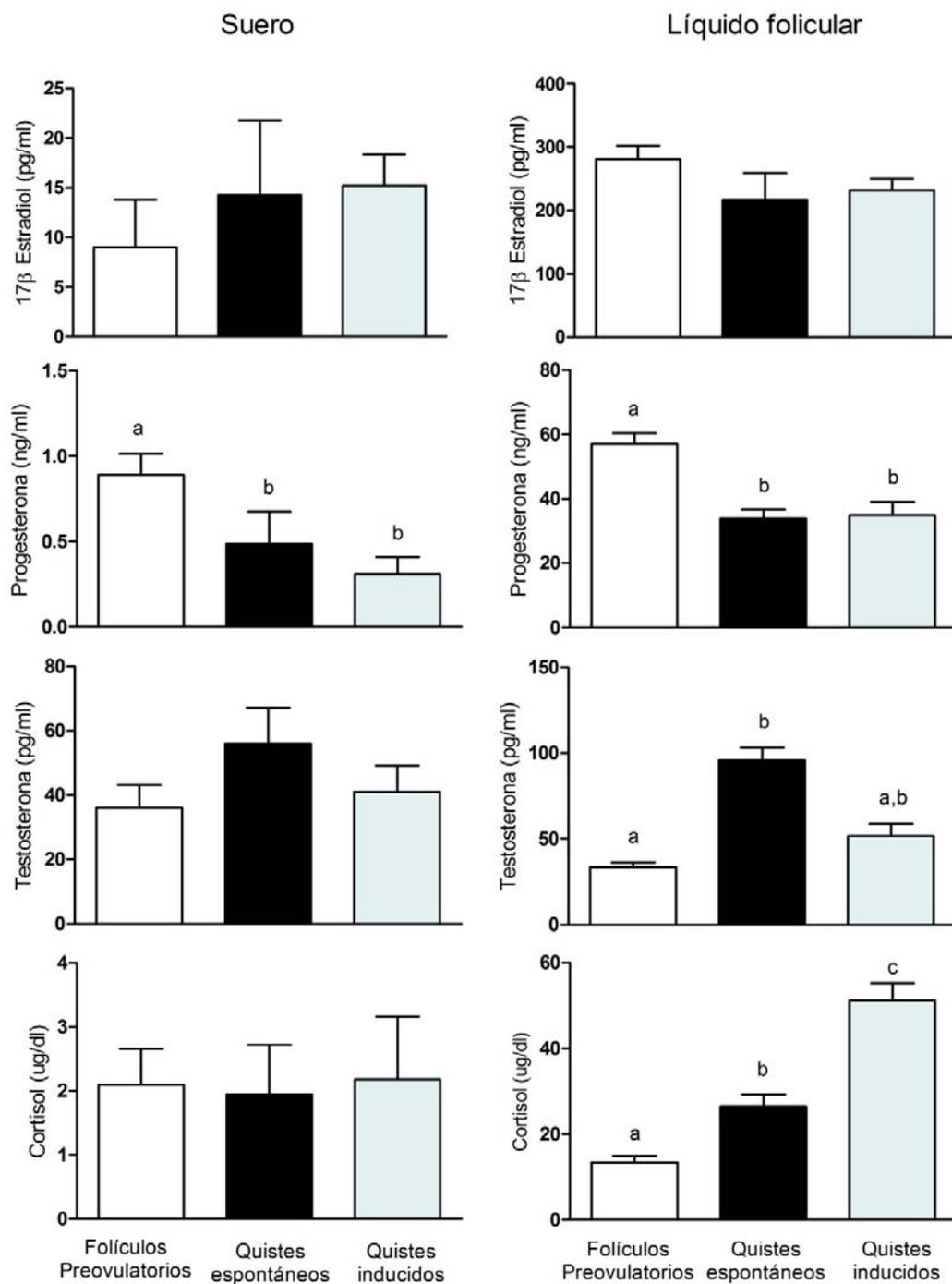


Figura 19: Concentración de 17β-estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en suero y líquido folicular obtenido al momento de la ovariectomía de animales control, tratados con ACTH y animales COD espontánea. Las barras representan la media \pm DE para cada hormona en suero o líquido folicular. Barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

IV.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE LA SUBFAMILIA TGF- β MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA.

La detección por inmunohistoquímica de las diferentes isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) fue llevada a cabo en ovarios de vacas con quistes espontáneos (obtenidos a campo) e inducidos (mediante ACTH), conjuntamente con ovarios de vacas control obtenidos a partir del modelo experimental. Mediante estos ensayos se evaluó la expresión de dichas proteínas a lo largo de los distintos estadios del desarrollo folicular ovárico y en las estructuras quísticas. Se analizaron las siguientes estructuras: folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos en todos los grupos y además los folículos quísticos en los animales con COD inducida y espontánea.

IV.2.1 Determinación de la especificidad de los Anticuerpos utilizados

Mediante *immunoblot* se corroboró que los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica detectaran la proteína de manera específica y sin reacciones cruzadas. Las proteínas de la familia TGF- β se expresaron de manera específica con los anticuerpos utilizados como se muestra en la figura correspondiente de cada isoforma.

IV.2.2. TGF- β 1

El TGF- β 1 fue detectado en el citoplasma de todas las células ováricas estudiadas. Las células de la granulosa mostraron mayor expresión de dicha proteína en comparación con las células de la teca (figura 20).

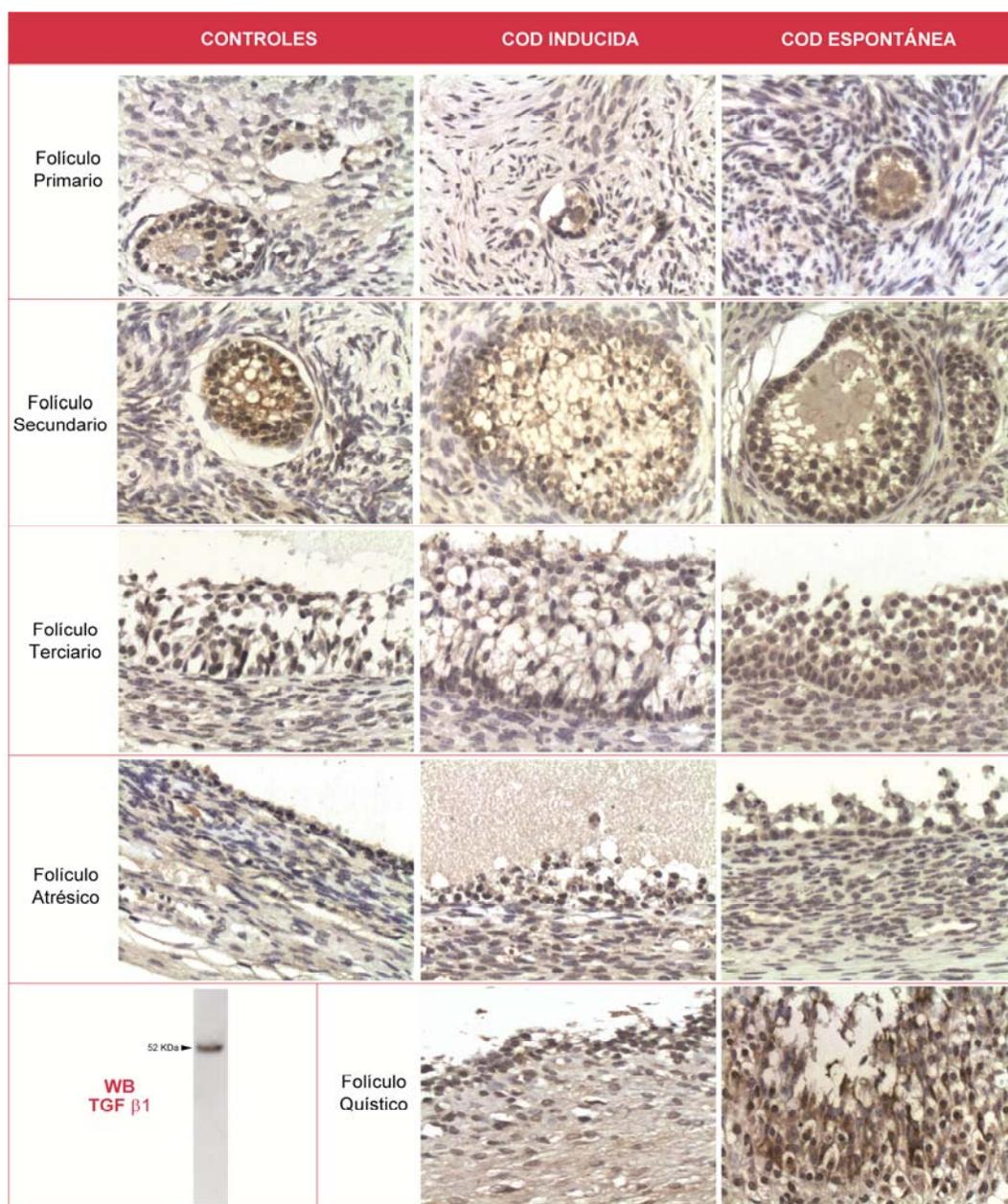


Figura 20. Estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para TGF-β1 en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea (X40). WB indica la especificidad del anticuerpo utilizado y el peso molecular correspondiente a TGF-β1 (52 KDa) mediante la técnica de WB.

La figura 21 muestra el porcentaje de área inmunomarcada para TGF-β1 en la granulosa para cada categoría folicular en los grupos estudiados. Los quistes espontáneos mostraron la mayor expresión de TGF-β1, mientras que los folículos atrésicos fueron los que menos marcación evidenciaron. Sin embargo, no se encontraron

diferencias significativas entre las categorías evaluadas ($p < 0,05$). Cuando se compararon los quistes con los folículos terciarios y atrésicos de grupo control, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los quistes espontáneos y ambas estructuras foliculares normales.

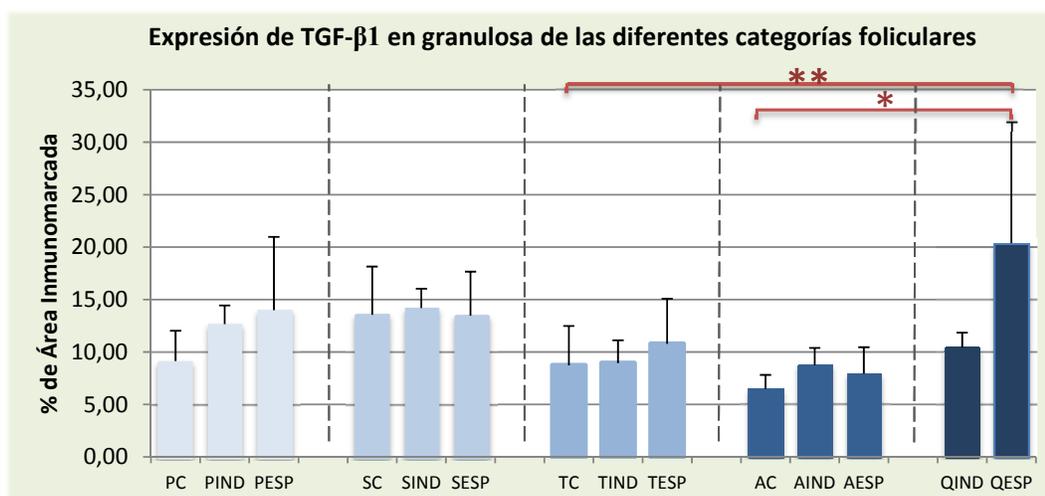


Figura 21: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF-β1 en células de la granulosa de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los quistes espontáneos y los folículos terciarios (**) o atrésicos (*) del grupo control ($p < 0,05$).

Con respecto a las células de la teca interna (figura 22), sólo se observaron diferencias entre las estructuras quísticas, mostrando los quistes espontáneos mayor inmunomarcación que los quistes inducidos con ACTH ($p < 0,05$). Cuando se compararon los quistes con los folículos terciarios y atrésicos del grupo control, los quistes espontáneos mostraron mayor expresión que ambos tipos de folículos del grupo control ($p < 0,05$).

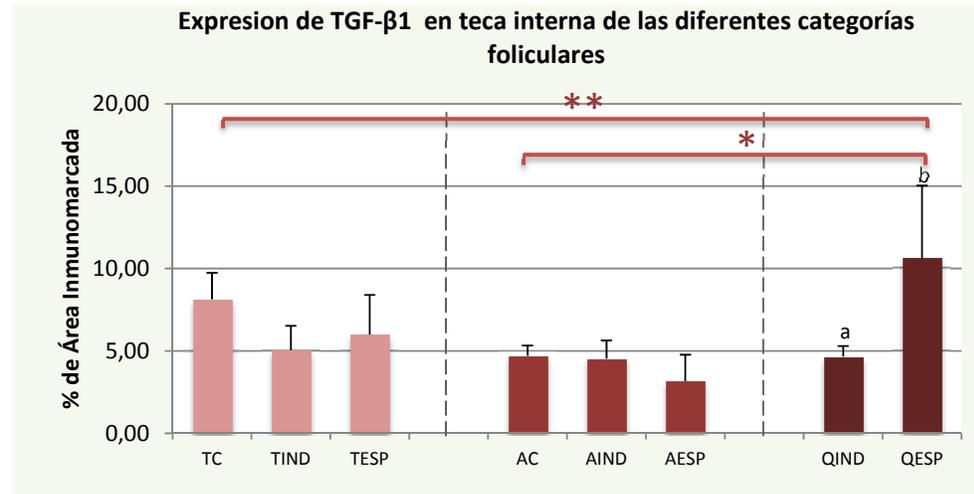


Figura 22: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF-β1 en células de la teca interna de varios tipos foliculares (T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los quistes espontáneos y los folículos terciarios (**) o atrésicos (*) del grupo control ($p < 0,05$).

Además se realizó la comparación de las diferentes estructuras foliculares dentro de cada grupo para evaluar las diferencias a lo largo de la foliculogénesis. En primer lugar se analizó el grupo control (figura 23), donde se pudo observar la menor marcación para TGF-β1 en la teca interna de los folículos atrésicos y la mayor en las células de la granulosa de los folículos secundarios ($p < 0,05$). Las células de la granulosa de los folículos primarios y terciarios mostraron porcentajes de marcación intermedia, sin diferenciarse de los dos tipos de estructuras previamente mencionadas.

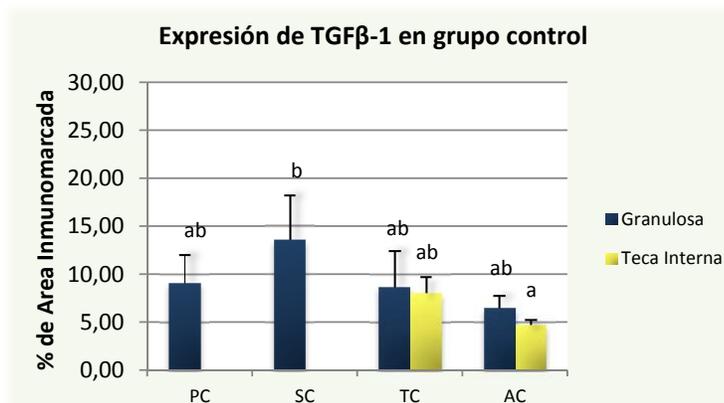


Figura 23: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF-β1 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo control (C). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el caso del grupo con COD inducida mediante ACTH (figura 24), el menor porcentaje de marcación fue observado en la teca interna de folículos atrésicos y terciarios, seguidos por la granulosa de folículos terciarios, atrésicos y quísticos, y finalmente por los folículos primarios y secundarios, quienes mostraron el mayor porcentaje de área inmunomarcada ($p < 0,05$).

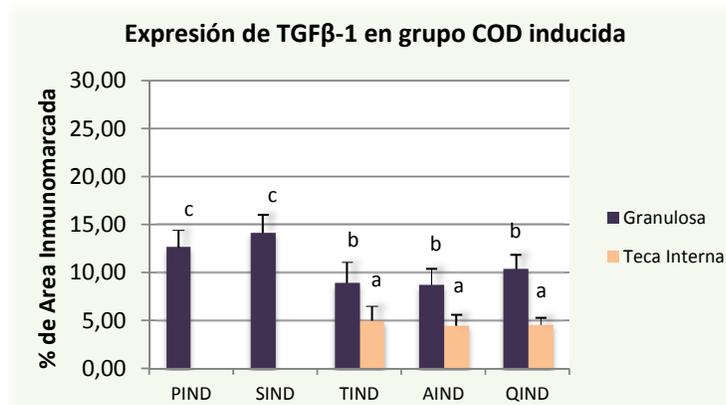


Figura 24: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 1 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD inducida (IND). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por último, el análisis de la expresión de TGF- β 1 en el grupo con COD espontánea (figura 25) mostró que este factor de crecimiento se encuentra presente en menor proporción en la teca de folículos terciarios y atrésicos y en la granulosa de estos últimos, mientras que la granulosa de los quistes expresó la mayor marcación ($p < 0,05$).

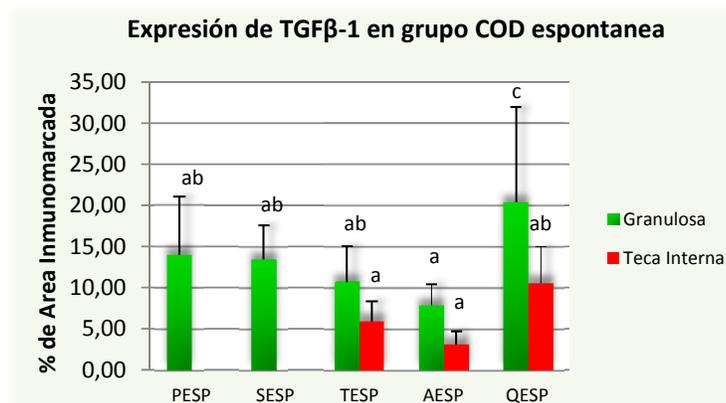


Figura 25: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 1 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD espontánea (ESP). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.2.3. TGF- β 2

La inmunodetección de TGF- β 2 permitió corroborar su expresión citoplasmática en células de la granulosa y de la teca interna de las estructuras foliculares estudiadas (figura 26).

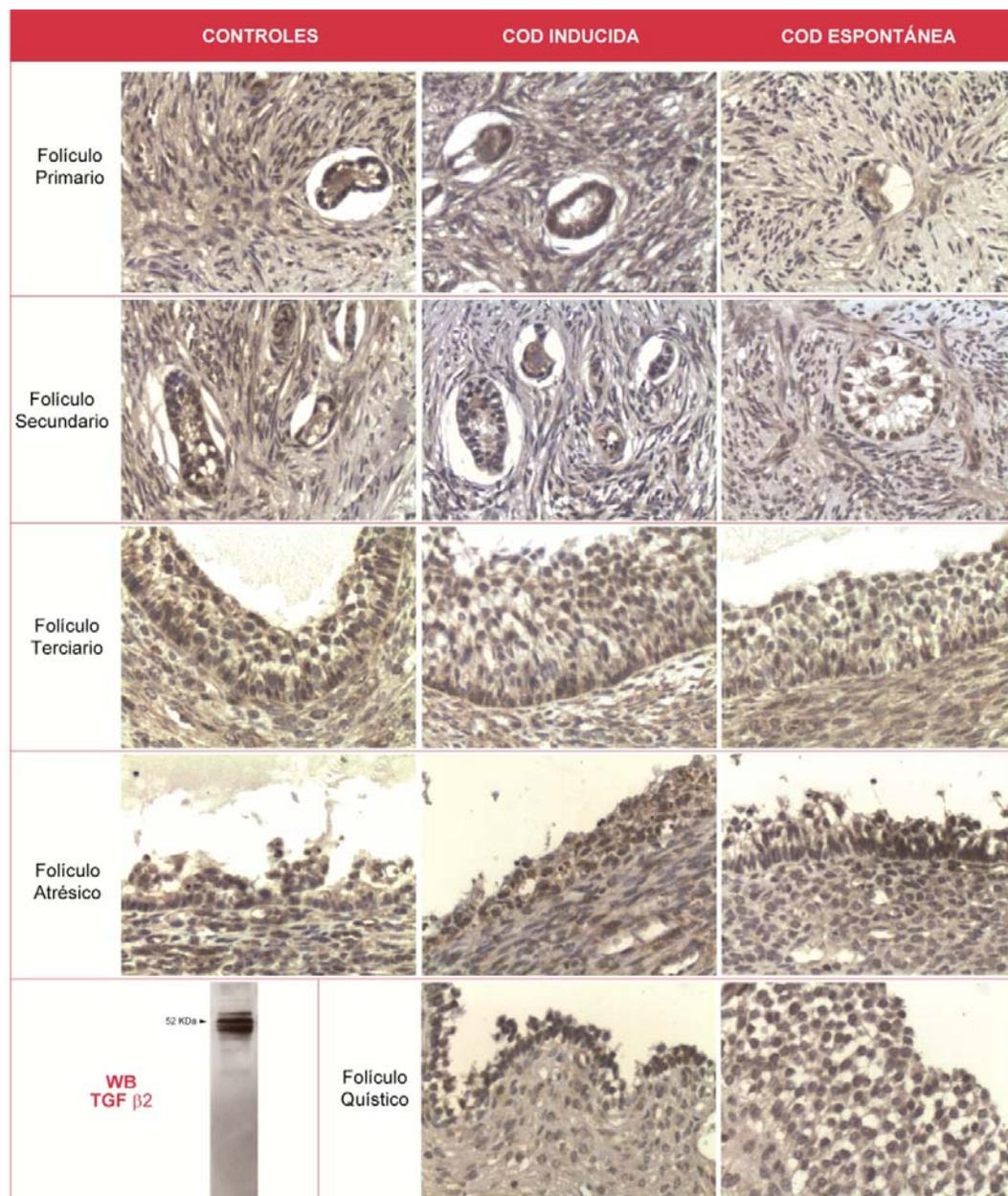


Figura 26. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para TGF- β 2 en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea (X40). WB indica la especificidad del anticuerpo utilizado y el peso molecular correspondiente a TGF- β 2 (52 KDa) mediante la técnica de WB.

Como observa en la figura 27, el porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 2 en las células de la granulosa no reveló diferencias significativas dentro las categorías foliculares evaluadas (folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos), aunque se observó una mayor expresión en los quistes espontáneos cuando se compararon con los folículos terciarios y atrésicos del grupo control ($p < 0,05$). En el caso de la teca interna (figura 28), no se hallaron diferencias significativas entre las categorías foliculares estudiadas ($p < 0,05$).

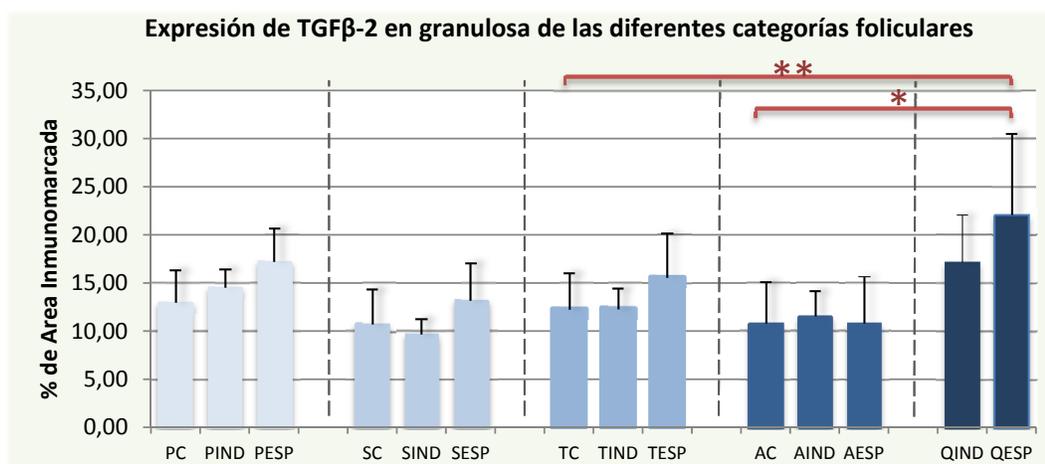


Figura 27: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 2 en células de la granulosa de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los quistes espontáneos y los folículos terciarios (**) o atrésicos (*) del grupo control ($p < 0,05$).

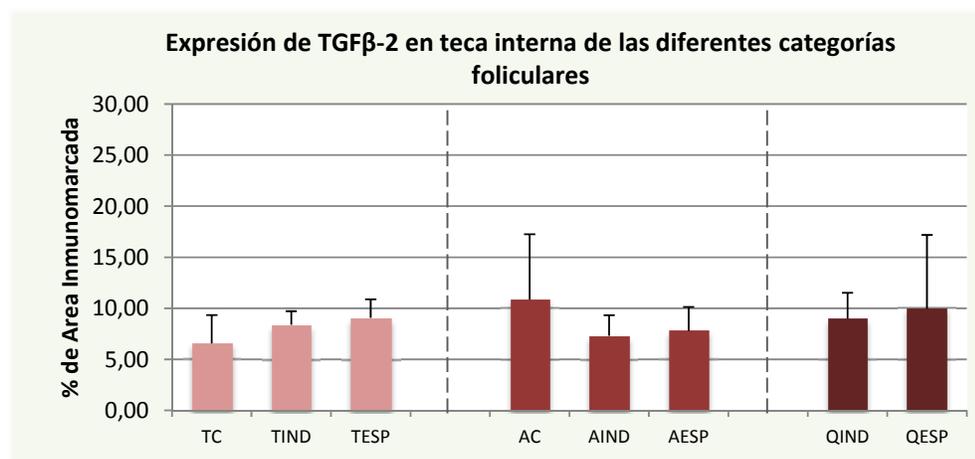


Figura 28: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 2 en células de la teca interna de varios tipos foliculares (T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP).

La comparación de las diferentes estructuras foliculares dentro de cada grupo para evaluar las diferencias a lo largo de la foliculogénesis nos permitió observar, en el grupo control (figura 29), que la menor marcación estuvo en la teca interna de los folículos terciarios en comparación con todas las estructuras estudiadas ($p < 0,05$), mientras que no existieron diferencias significativas en el resto ($p < 0,05$).

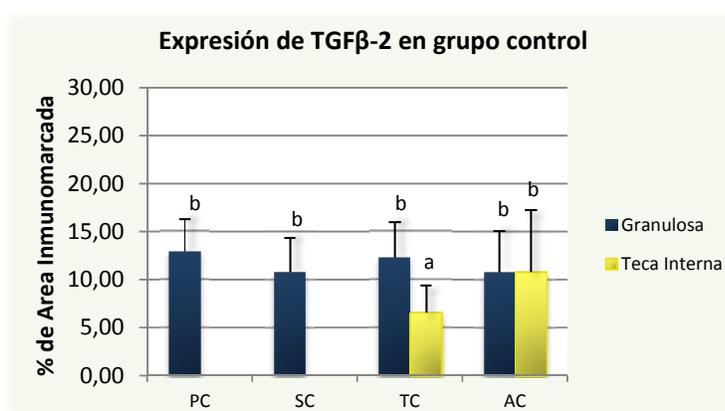


Figura 29: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 2 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo control (C). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Para el grupo de animales con COD inducida (figura 30), los mayores porcentajes de marcación se observaron en la granulosa de los folículos quísticos y primarios (sin diferencias entre ellos), y el menor en la teca interna de los folículos atrésicos ($p < 0,05$).

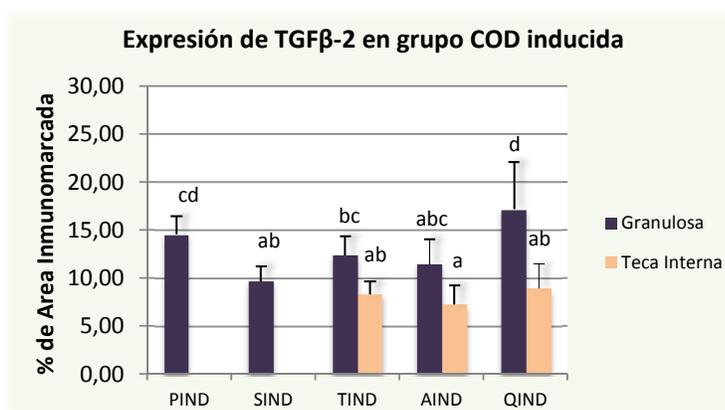


Figura 30: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 2 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD inducida (IND). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Finalmente, para aquellos animales con COD diagnosticada a campo (figura 31), sólo se encontraron diferencias significativas en la expresión de TGF- β 2 entre las células de la granulosa de los quistes y la teca interna de las estructuras que poseen esta capa de células, no hallándose diferencias con la granulosa de todas las demás estructuras ($p < 0,05$).

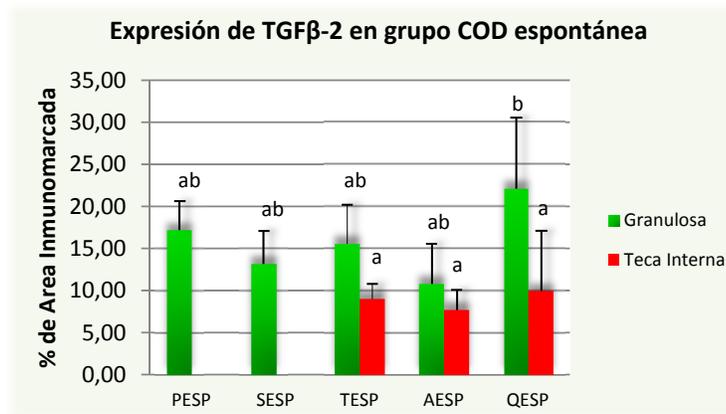


Figura 31: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 2 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD espontánea (ESP). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.2.4. TGF- β 3

El TGF- β 3 demostró inmunomarcación citoplasmática en todos los estadios de desarrollo folicular, tanto las células de la granulosa como las de la teca interna (figura 32).

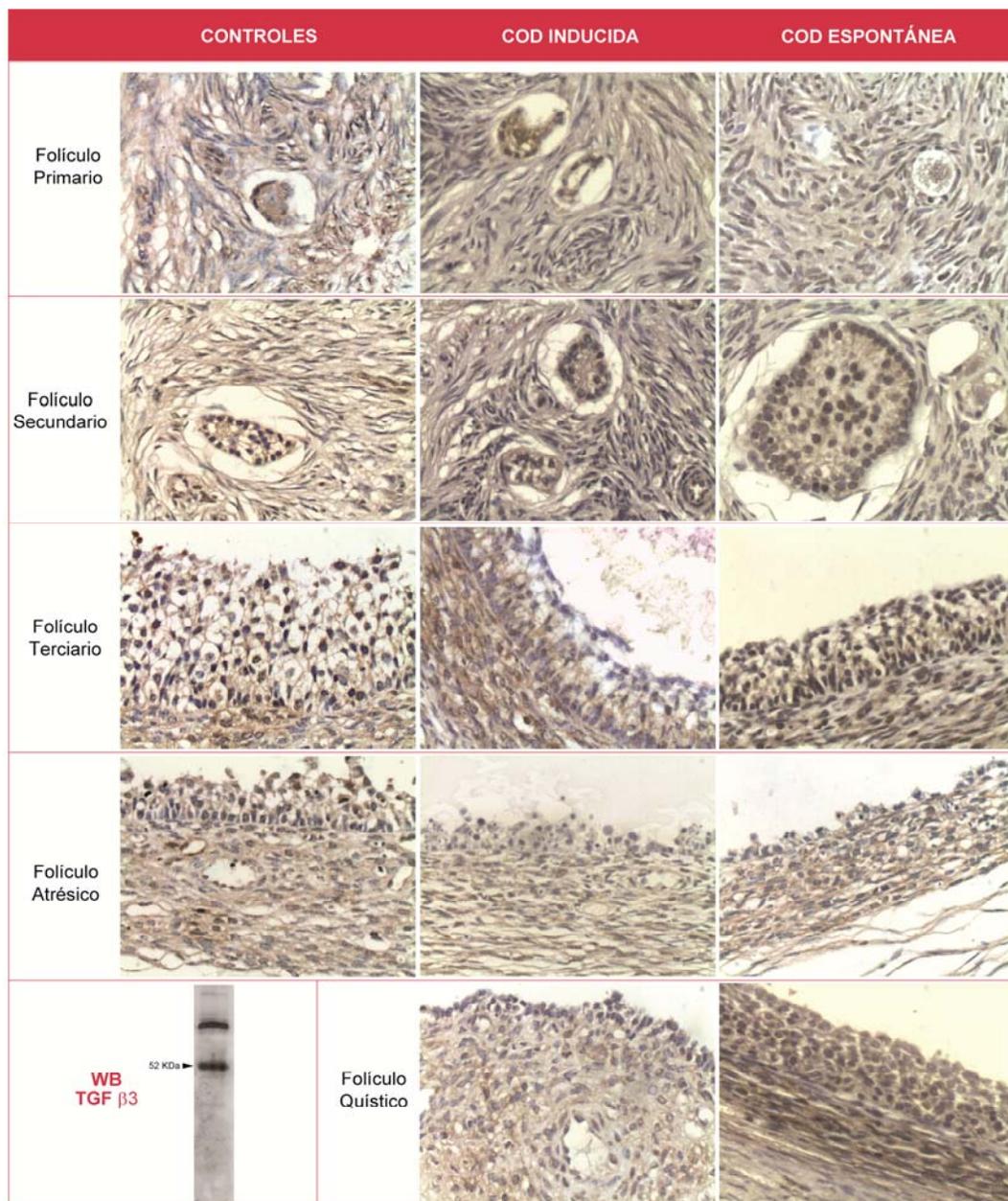


Figura 32. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para TGF- β 3 en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea (X40). WB indica la especificidad del anticuerpo utilizado y el peso molecular correspondiente a TGF- β 3 (52 KDa) mediante la técnica de WB.

No se observaron diferencias significativas en la expresión de TGF- β 3 en las células de la granulosa para los folículos secundarios y terciarios entre los grupos estudiados, ($p < 0,05$; figura 33). En cambio, dentro de los folículos primarios, la mayor inmunomarcación fue observada en los grupos control e inducido, en relación al grupo

con COD espontánea ($p < 0,05$). En los folículos atrésicos, la mayor expresión fue evidenciada en el grupo control y la menor en el grupo inducido con ACTH con diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$), y finalmente dentro de los folículos quísticos, los pertenecientes al grupo con COD espontánea mostraron significativamente mayor expresión de TGF- β 3 que el grupo con COD inducida ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas de expresión cuando se compararon los quistes con las estructuras antrales de ovarios sanos (terciarios y atrésicos control).

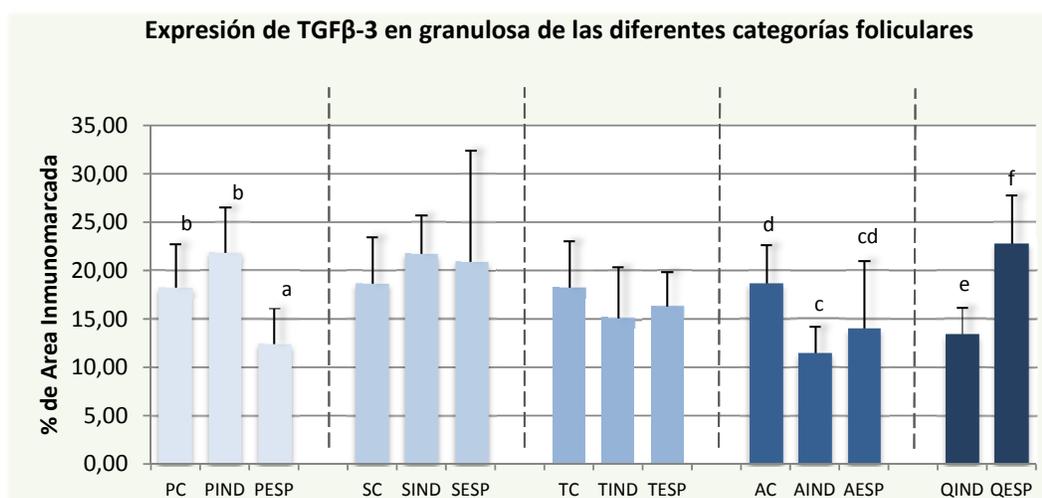


Figura 33: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- β 3 en células de la granulosa de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos dentro de un mismo tipo de estructura folicular ($p < 0,05$).

A su vez, en células de la teca interna (figura 34), los folículos terciarios fueron los únicos que mostraron diferencias significativas, siendo mayores los niveles de TGF- β 3 en el grupo con COD inducida con respecto al grupo con COD espontánea ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas para un valor de $p < 0,05$ cuando se contrastaron los quistes con los folículos terciarios y atrésicos del grupo control.

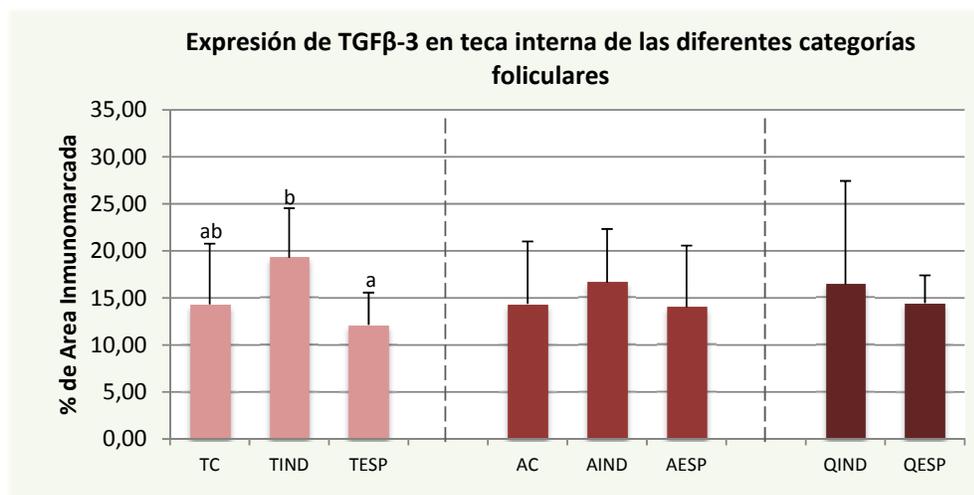


Figura 34: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF-β3 en células de la teca interna de varios tipos foliculares (T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos dentro de un mismo tipo de estructura folicular.

Se realizó la comparación de las diferentes estructuras foliculares dentro de cada grupo para evaluar las diferencias a lo largo de la foliculogénesis. En este caso, no se encontraron diferencias significativas entre las diversas categorías foliculares para cada grupo ($p < 0,05$; control, COD inducida y COD espontánea; figuras 35, 36 y 37).

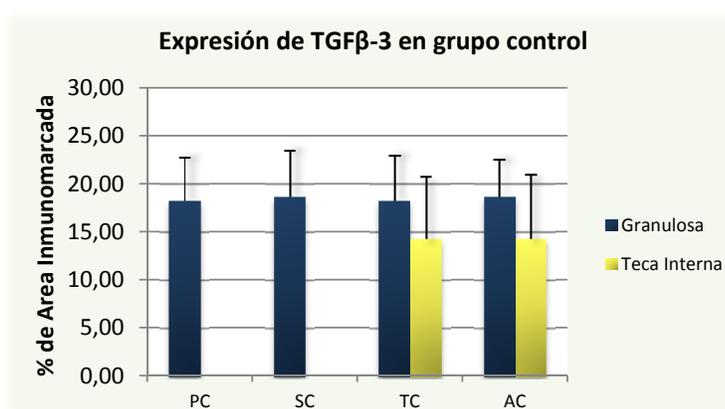


Figura 35: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF-β3 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo control (C).

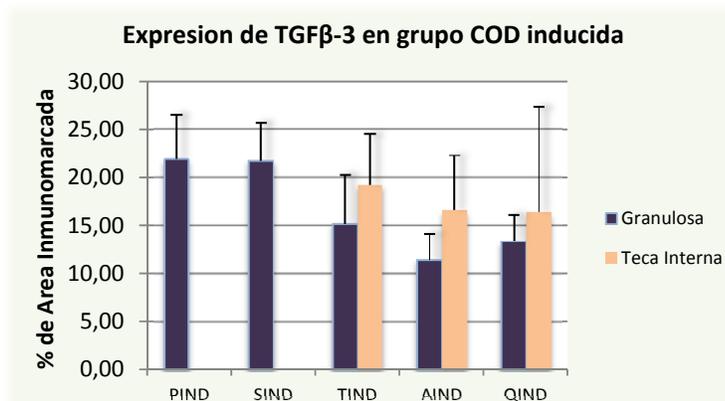


Figura 36: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF-β3 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD inducida (IND).

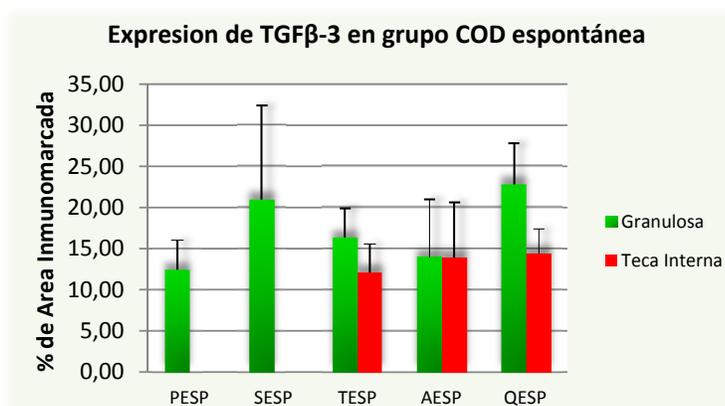


Figura 37: Porcentaje de área inmunomarcada para TGF-β3 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD espontánea (ESP).

IV.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE ACTIVINA, INHIBINA Y FOLICULOSTATINA MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA.

La inmunodetección de estas proteínas fue llevada a cabo de manera similar a lo realizado para las isoformas de TGF-β. A pesar de que la foliculostatina no forma parte de la superfamilia TGF-β, fue analizada debido a su función como proteína de unión de la activina.

IV.3.1. Determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados

De la misma manera que para la subfamilia TGF-β, se corroboró para activina, inhibina y foliculostatina mediante inmunoblot que los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica detectarían la proteína de manera específica (como se mostró en la figura correspondiente a cada proteína).

IV.3.2. Activina

La inmunomarcación de activina se observó en el citoplasma de todas las células foliculares y estromales evaluadas (figura 38).

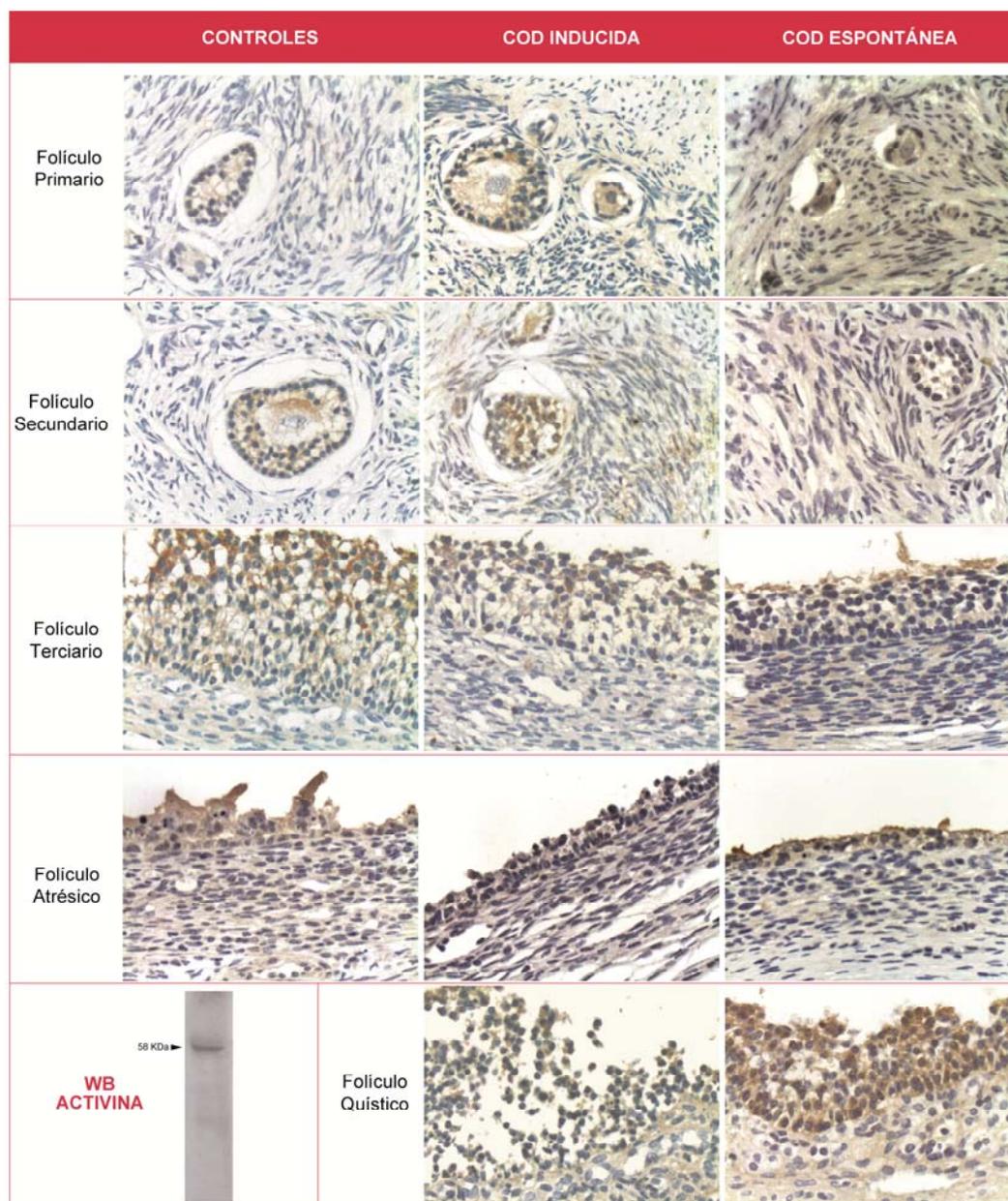


Figura 38. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para activina en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea (X40). WB indica la especificidad del anticuerpo utilizado y el peso molecular correspondiente a activina (58 KDa) mediante la técnica de WB.

En la figura 39, que muestra los porcentajes de área inmunomarcada para activina en células de la granulosa, se analizaron por separado las estructuras análogas (folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos) de los tres grupos estudiados (control, COD inducida, COD espontánea). También se compararon los quistes (inducidos o espontáneos) contra los folículos terciarios y atrésicos del grupo control.

Para el caso de los folículos primarios, el menor porcentaje de área inmunomarcada fue encontrado en los ovarios con quistes espontáneos, mientras que el mayor se observó en ovarios con quistes inducidos, existiendo diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$). Los folículos secundarios mostraron un patrón de expresión de activina similar a los primarios, observándose el menor porcentaje de marcación en ovarios con COD espontánea y el mayor en ovarios con COD inducida. Con respecto a los folículos terciarios y atrésicos, no existieron diferencias de marcación entre grupos, como sí fue observada en los folículos quísticos, en donde los quistes espontáneos mostraron significativamente mayor expresión que los quistes inducidos ($p < 0,05$).

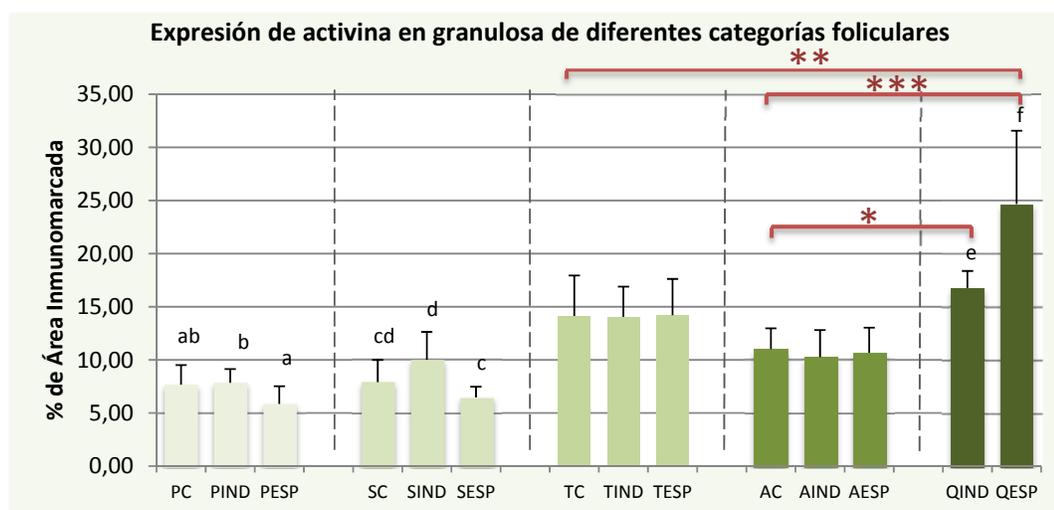


Figura 39: Porcentaje de área inmunomarcada para activina en células de la granulosa de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos dentro de un mismo tipo de estructura folicular. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los quistes inducidos y los atrésicos (*) del grupo control ($p < 0,05$) o los folículos quísticos espontáneos y los folículos terciarios (**) o atrésicos (***) del grupo control ($p < 0,05$).

Cuando se compararon los quistes con las estructuras antrales de animales sanos, se pudo determinar una mayor expresión ($p<0,05$) en los quistes inducidos respecto a los folículos atrésicos control, así como entre los quistes espontáneos y los folículos atrésicos y terciarios control ($p<0,05$).

Con respecto a la expresión de activina en la teca interna de las diferentes estructuras foliculares (figura 40), se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) solamente en los folículos atrésicos, donde el mayor porcentaje de expresión se encontró en los ovarios con COD espontánea y el menor en animales control. En este caso, no existieron diferencias cuando se compararon quistes con folículos antrales (terciarios y atrésicos) del grupo control.

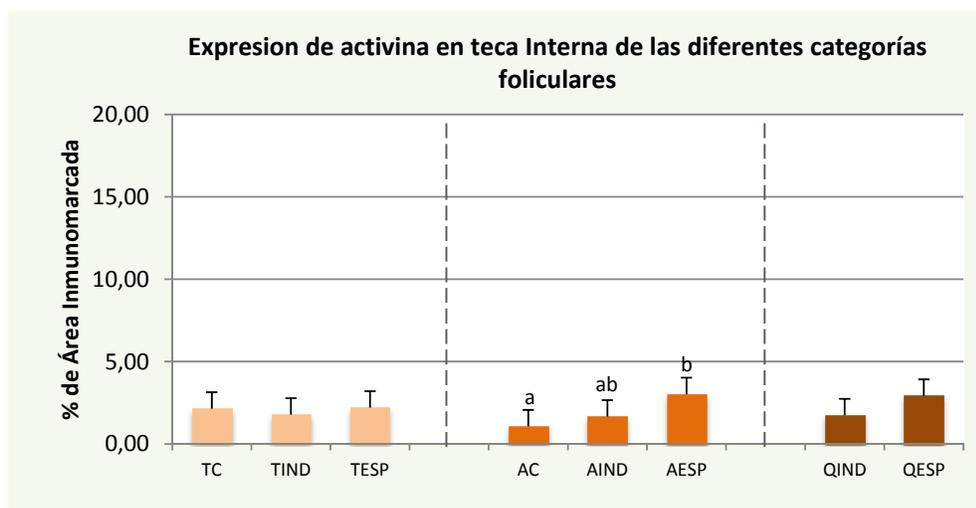


Figura 40: Porcentaje de área inmunomarcada para activina en células de la teca interna de varios tipos foliculares (T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre grupos dentro de un mismo tipo de estructura folicular.

Además, se realizó la comparación de las diferentes estructuras foliculares dentro de cada grupo para evaluar las diferencias a lo largo de la foliculogénesis en granulosa y teca interna. Los resultados se muestran en las figuras 41, 42 y 43.

Como se puede observar en las tres figuras, la teca interna de todas las estructuras foliculares estudiadas expresó el menor porcentaje de marcación en los 3 grupos, existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ésta capa y las células de la granulosa en todos los grupos.

Con respecto a la granulosa del grupo control (figura 41), el menor porcentaje de área inmunomarcada se presentó en folículos preantrales (primarios y secundarios), existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre éstos y los folículos terciarios, los que presentaron el mayor porcentaje de marcación.

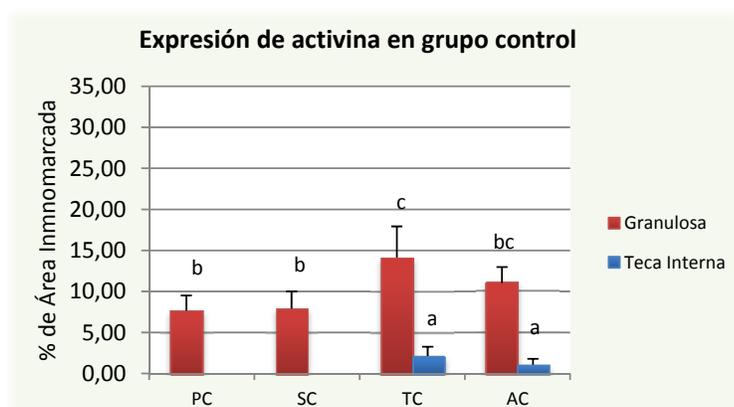


Figura 41: Porcentaje de área inmunomarcada para activina de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo control (C). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo COD inducida (figura 42), al igual que el grupo control y con COD espontánea, la menor expresión de activina dentro de la capa de células de la granulosa fue observada en los folículos preantrales. Sin embargo, en este caso los folículos terciarios y quísticos mostraron la mayor expresión de dicha proteína ($p < 0,05$), mientras que los atrésicos no se diferenciaron de los preantrales.

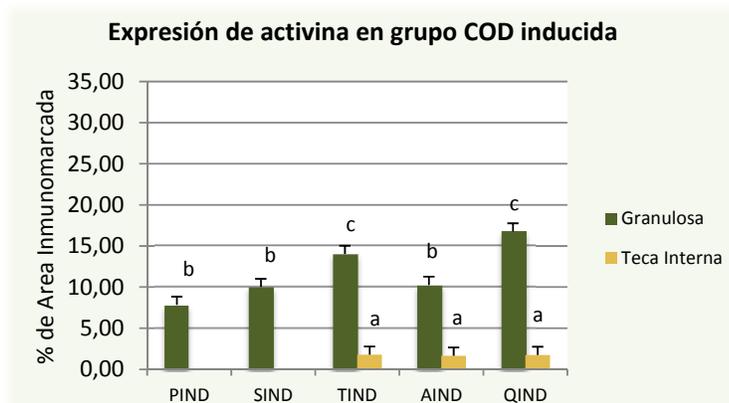


Figura 42: Porcentaje de área inmunomarcada para activina de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD inducida (IND). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por último, en las células de la granulosa del grupo con COD espontánea (figura 43), la mayor marcación fue observada en los folículos quísticos, con diferencias significativas ($p < 0,05$) sobre todas las demás estructuras. La menor expresión estuvo en los folículos primarios y secundarios con mayor expresión en los folículos terciarios ($p < 0,05$), presentando los atrésicos una expresión intermedia entre esas estructuras sin diferencias significativas con ninguna.

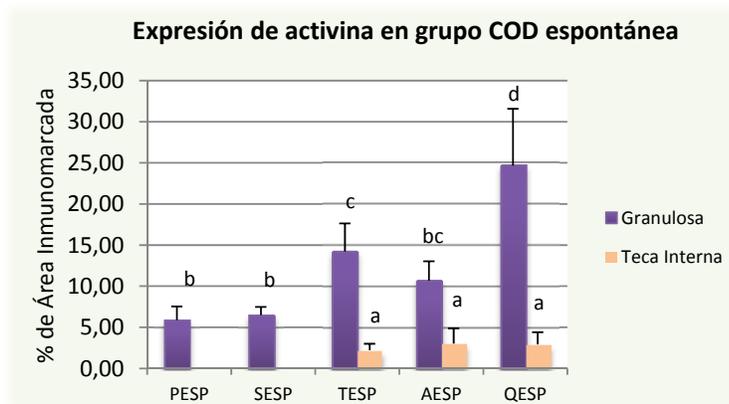


Figura 43: Porcentaje de área inmunomarcada para activina de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD espontánea (ESP). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.3.3. Foliculostatina

Se evidenció marcación para foliculostatina en el citoplasma tanto de células de la granulosa como de células de la teca interna para todos los estadios foliculares estudiados, observándose mayor intensidad en la marcación de las primeras (figura 44).

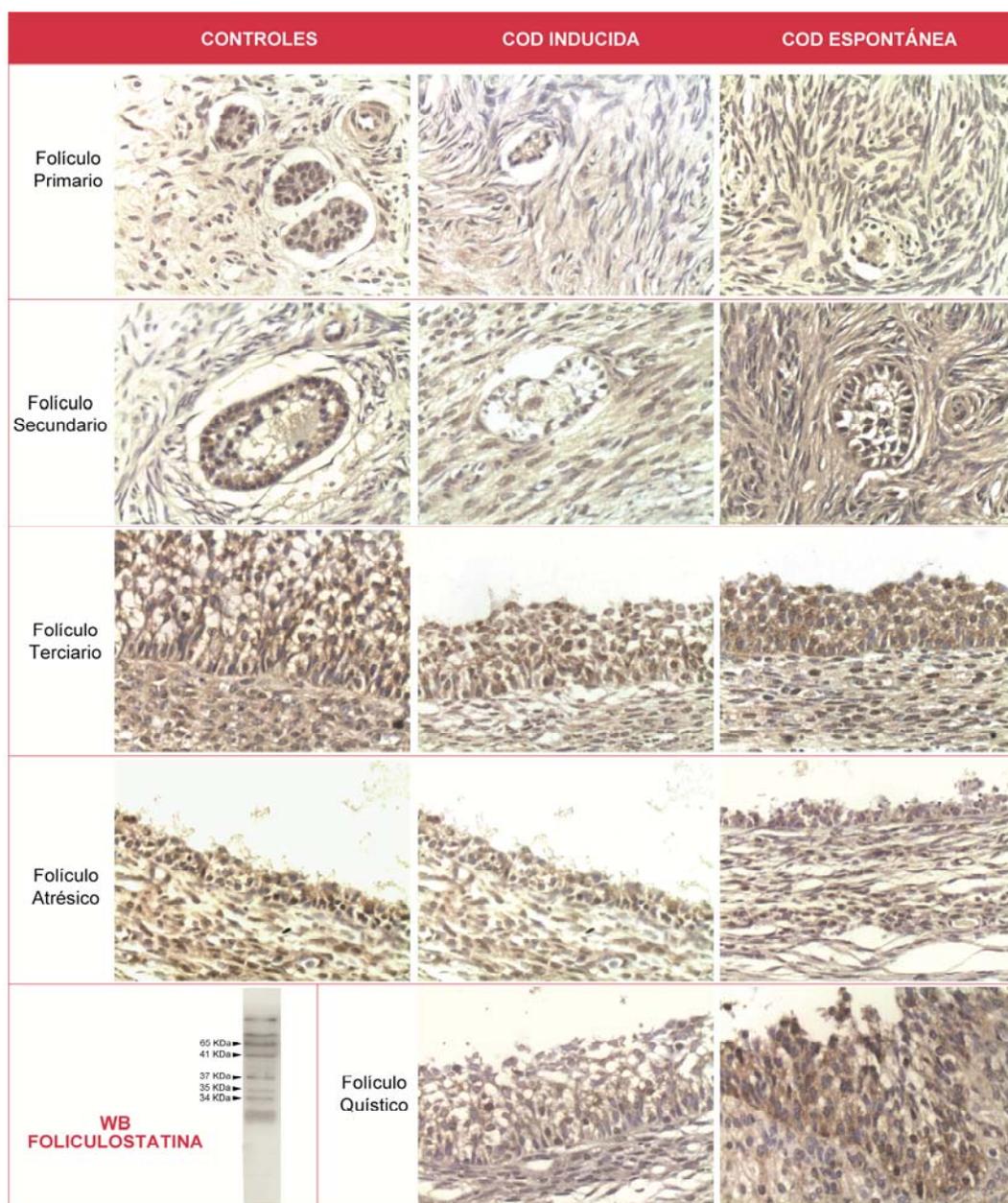


Figura 44. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para foliculostatina en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea (X40). WB indica la especificidad del anticuerpo utilizado mediante la técnica de WB. Se evidenciaron las 5 isoformas que han sido descritas en la bibliografía para foliculostatina correspondientes a 31kDa; 35kDa; 37kDa; 41kDa y 65kDa.

Con respecto a la expresión de foliculostatina en las células de la granulosa (figura 45) se observa que, dentro de los folículos primarios, la menor expresión se obtuvo en el grupo control, seguido por el grupo con COD inducida y finalmente por el grupo con COD espontánea (con mayor expresión), mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$)

entre el primer y el último grupo. En cuanto a los folículos secundarios, el menor porcentaje de área inmunomarcada fue detectado en el grupo con COD inducida y el mayor en el grupo con COD espontánea, existiendo diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$). Dentro de los folículos terciarios, los que se diferenciaron del resto fueron los del grupo con COD espontánea, mostrando significativamente la mayor expresión ($p < 0,05$). El mismo patrón de expresión de foliculostatina se presentó en los folículos atrésicos, donde los folículos del grupo con COD espontánea obtuvieron los mayores valores. Finalmente, los folículos quísticos también mostraron diferencias entre ellos, observándose mayores porcentajes de inmunomarcación en quistes a campo ($p < 0,05$).

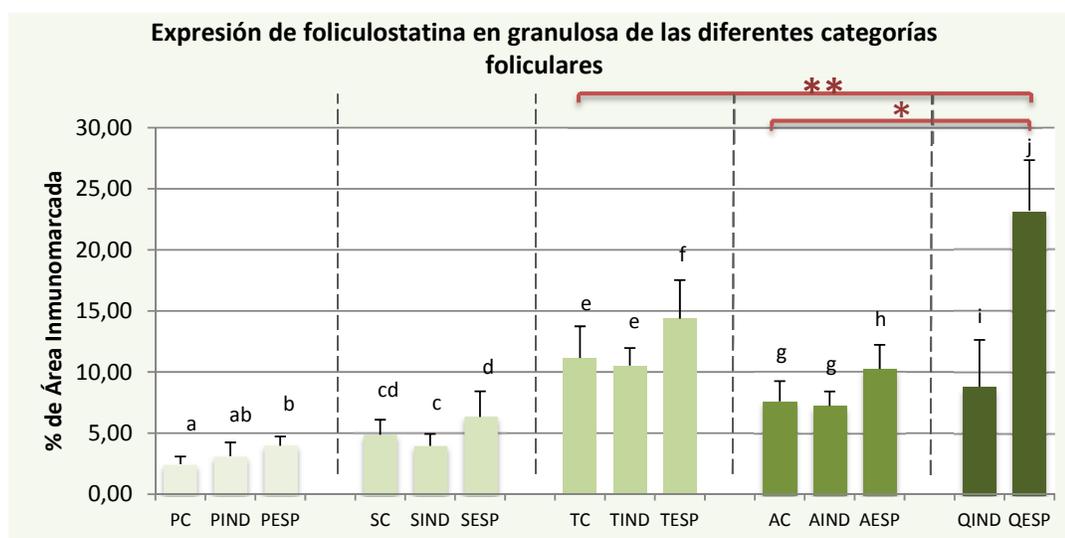


Figura 45: Porcentaje de área inmunomarcada para foliculostatina en células de la granulosa de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos dentro de un mismo tipo de estructura folicular. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los quistes espontáneos y los folículos terciarios (**) o atrésicos (*) del grupo control ($p < 0,05$).

Cabe resaltar que dentro de todas las categorías foliculares estudiadas (primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos), la mayor expresión de foliculostatina fue encontrada en todos los casos en los folículos pertenecientes al grupo con COD espontánea. Por último, cuando se compararon los quistes con las estructuras antrales de animales sanos (terciarios y atrésicos del grupo control), se pudo determinar una mayor

expresión ($p < 0,05$) en los quistes a campo respecto a los folículos atrésicos y terciarios control, no existiendo diferencias entre los quistes inducidos y dichas estructuras.

Para la teca interna (figura 46) no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos dentro de cada estadio de desarrollo folicular ni tampoco cuando se compararon los folículos quísticos versus terciarios y atrésicos del grupo control.

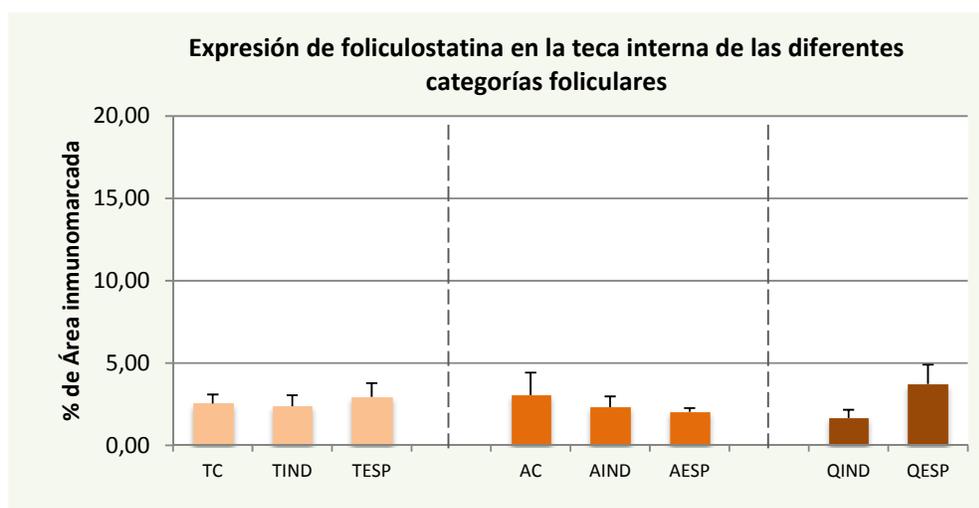


Figura 46: Porcentaje de área inmunomarcada para foliculostatina en células de la teca interna de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP).

Finalmente, se procedió a comparar el porcentaje de área inmunomarcada en granulosa y teca interna de las diferentes estructuras foliculares dentro del grupo control (figura 47), del grupo con COD inducida (figura 48) y del grupo con COD espontánea (figura 49). En los tres casos, se puede observar el mismo patrón de expresión de foliculostatina en células de la granulosa, mostrando un notable incremento en el porcentaje de área inmunomarcada a medida que los folículos van creciendo y avanzando al siguiente estadio de desarrollo folicular (primario – secundario – terciario) para luego descender a valores intermedios (menores que los terciarios pero mayores a los preantrales) cuando se atresian ($p < 0,05$). Las células de la teca interna de todas las estructuras foliculares expresaron la menor marcación, muy parecida a la expresión de

la granulosa de los folículos primarios ($p < 0,05$). Por último, con respecto a los folículos quísticos, los quistes inducidos tuvieron una marcación para foliculostatina menor a los folículos terciarios pero mayor a los atrésicos de su mismo grupo ($p < 0,05$), mientras que los quistes espontáneos tuvieron una marcación muy superior a todas las demás estructuras dentro de su grupo ($p < 0,05$).

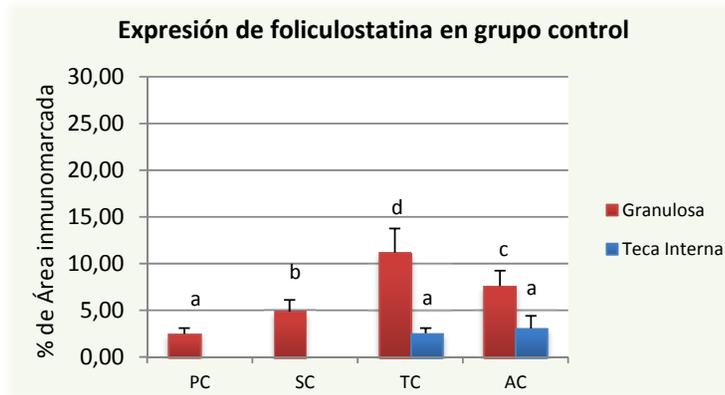


Figura 47: Porcentaje de área inmunomarcada para foliculostatina de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo control (C). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

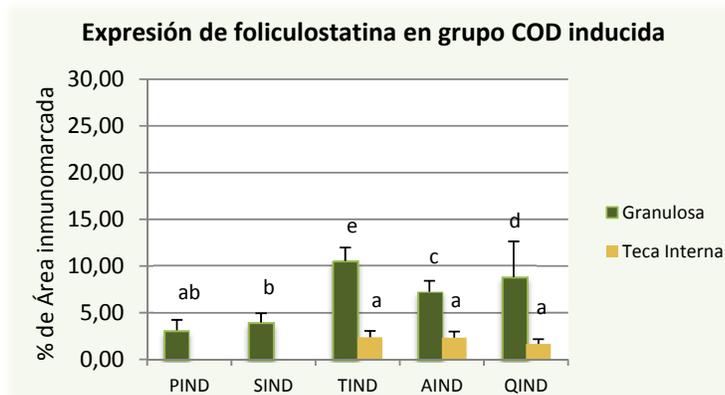


Figura 48: Porcentaje de área inmunomarcada para foliculostatina de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD inducida (IND). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

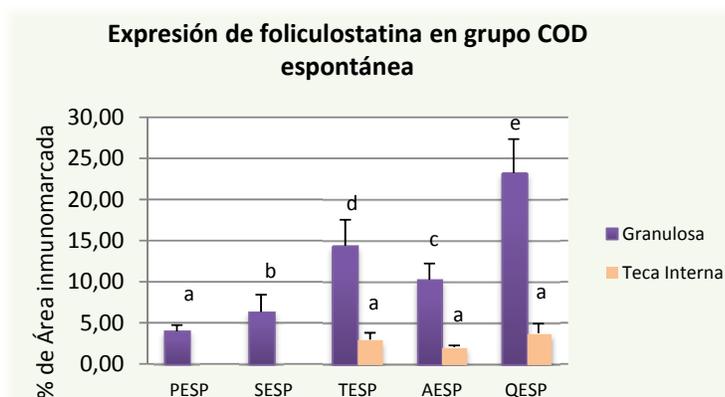


Figura 49: Porcentaje de área inmunomarcada para foliculostatina de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD espontánea (ESP). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.3.4. Inhibina

Solo las células de la granulosa de los folículos terciarios de mayor tamaño y de los quísticos presentaron marcación positiva para inhibina (figuras 50 y 51). Los folículos primarios, secundarios, terciarios pequeños y atresicos no expresaron inmunomarcación para dicha proteína.

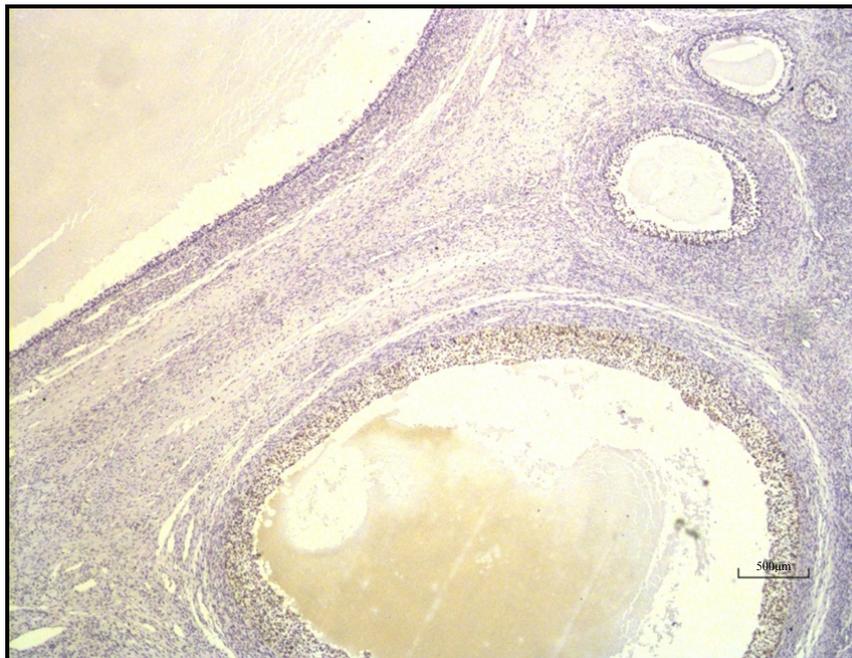


Figura 50. Vista panorámica de un corte histológico de ovario del grupo control inmunomarcado para Inhibina (X4). Nótese la presencia de marcación positiva sólo en un folículo terciario y la ausencia de la misma en folículos atresicos, secundarios o terciarios pequeños.

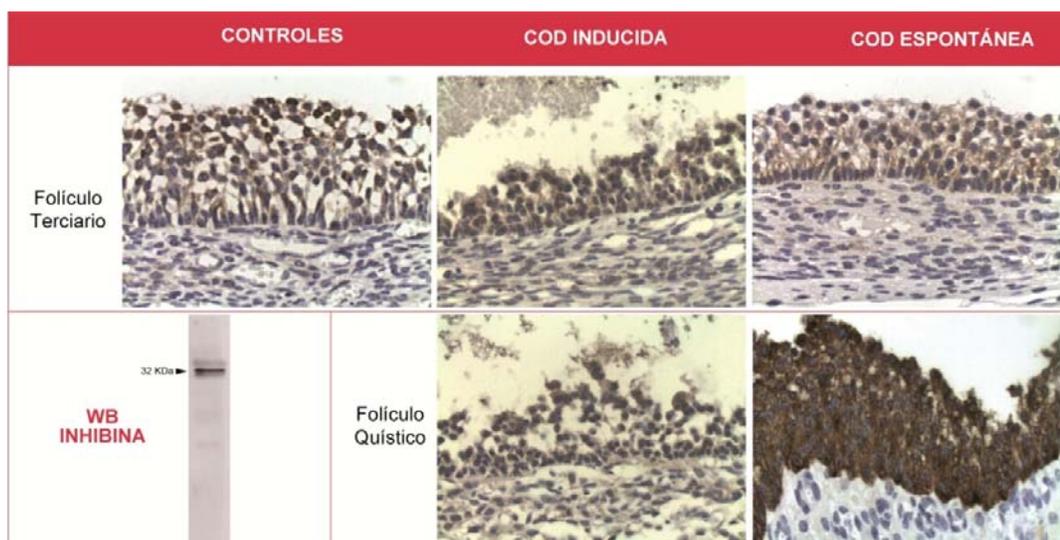


Figura 51. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para Inhibina en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea (X40). WB indica la especificidad del anticuerpo utilizado y el peso molecular correspondiente a inhibina (32 KDa) mediante la técnica de WB.

Como se puede observar en la figura 52, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos de folículos terciarios estudiados, ni entre éstos y los quistes inducidos. Sin embargo, los quistes espontáneos mostraron significativamente la mayor expresión de inhibina cuando se los comparó con el resto de las estructuras analizadas, denotando el mismo patrón de comportamiento presentado en granulosa para activina y foliculostatina.

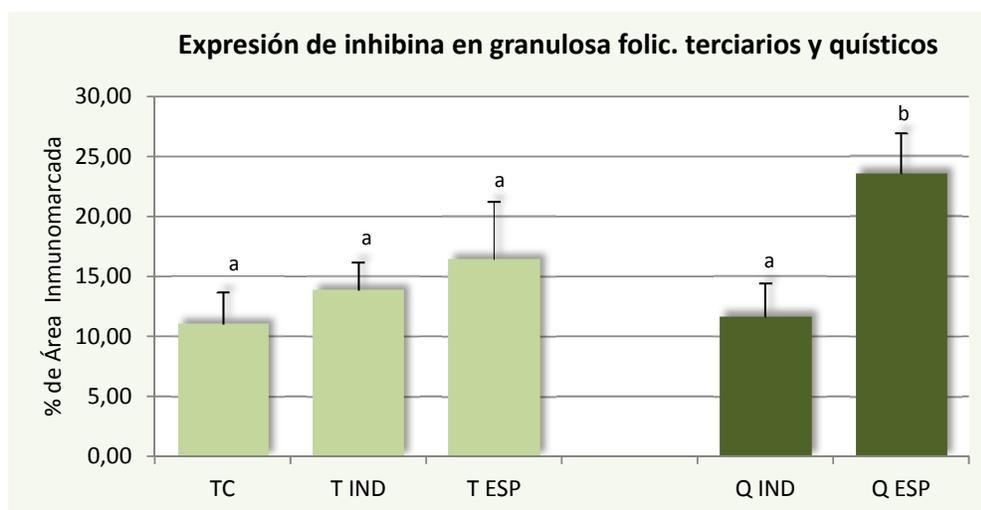


Figura 52: Porcentaje de área inmunomarcada para Inhibina en células de la granulosa de varios tipos foliculares (T: Terciarios y Q: Quísticos) de los grupos control (C), COD inducida (IND) y COD espontánea (ESP). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.4. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE INHIBINA EN LÍQUIDO FOLICULAR Y SUERO.

El análisis de la concentración folicular y sérica de inhibina se realizó mediante la técnica de ELISA en muestras de los grupos control y COD espontánea. Como se puede observar en la figura 53, no se hallaron diferencias en la concentración de inhibina en suero entre animales control y con COD, pero sí se encontraron a nivel folicular, en donde los folículos preovulatorios presentaron una mayor concentración que los quistes.

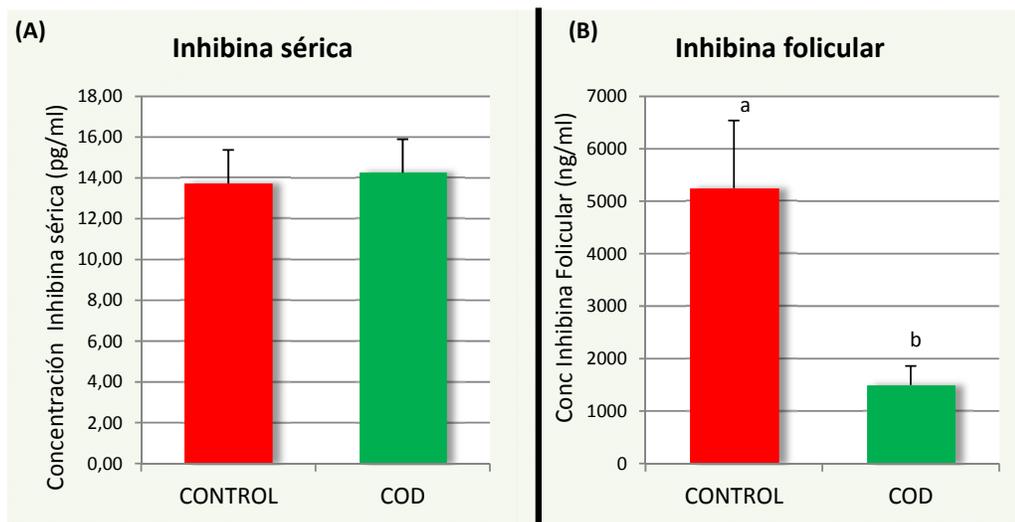


Figura 53: Concentración de inhibina en suero(A) y líquido folicular (B) de animales control (proestro) y con COD espontánea. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

V. DISCUSIÓN



V- DISCUSIÓN

V.1. INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD QUIÍSTICA OVÁRICA Y RELACIONES CON LOS HALLAZGOS EN LA ENFERMEDAD QUE SE PRESENTA DE MANERA ESPONTÁNEA EN BOVINOS.

Ha sido claramente documentado que la mayor dificultad a la hora de estudiar la COD en bovinos es que la formación de quistes sólo puede ser abordada luego de que el folículo haya atravesado numerosos cambios morfológicos y fisiológicos desconocidos (Roth *et al.*, 2012). En el presente estudio se caracterizó el ambiente endocrino y la dinámica folicular que precede y luego continúa durante el desarrollo de los quistes ováricos inducidos mediante la administración de ACTH. Aunque este modelo experimental ya ha sido utilizado previamente (Dobson *et al.*, 2000), no existía información disponible acerca de los niveles de esteroides intrafoliculares y la caracterización morfológica de los quistes.

El tratamiento con ACTH determinó cambios en las concentraciones de esteroides en suero. Los niveles de estradiol, progesterona y cortisol aumentaron durante el tratamiento con ACTH mientras que la testosterona no mostró cambios. Después del tratamiento, el estradiol permaneció significativamente elevado, entretanto la progesterona no incrementó sus valores como lo hizo en animales control, los cuales desarrollaron un cuerpo lúteo luego de la ovulación. Esto reflejaría la persistencia folicular que ocurre en la COD sin luteinización de las células que componen el folículo. Estos datos son compatibles con los descriptos por Dobson *et al.* (2000), quienes mostraron que los niveles de estrógenos permanecen elevados hasta el día 30 aproximadamente, proponiendo que dicha hormona junto a la inhibina (pero no la

ACTH, cortisol o progesterona) ejercen un fuerte efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH (Baird *et al.*, 1991), lo que impide que se inicie una nueva onda de crecimiento folicular. Sin embargo, estos autores no analizaron los niveles de testosterona. Dicha hormona aumentó en el grupo control hacia el final del muestreo (días 26 a 28), lo que presumiblemente se deba a uno o varios de los folículos de la primera onda de crecimiento folicular post-ovulación, que para esos días (alrededor del día 6-7 del nuevo ciclo estral a partir de la ovulación), suelen ser de un tamaño mayor a 10 mm (Bo and Caccia, 2002), con capacidad de producir una importante cantidad de andrógenos en la teca que luego serán aromatizados en la granulosa.

Al final del experimento, más precisamente al momento de la ovariectomía, se encontró una clara asociación entre los niveles en suero y líquido folicular de estradiol y progesterona, tanto en folículos control como en quistes inducidos y espontáneos. La mayor concentración de progesterona en animales del grupo control puede deberse a que el momento de castración para esos animales fue el día 18 del ciclo estral (inicio del proestro), momento en que la progesterona recién comienza a descender (Bo and Caccia, 2002; Forde *et al.*, 2011). En cambio, a pesar de que no se encontraran cambios séricos al momento de la ovariectomía, el cortisol mostró diferencias significativas a nivel folicular, con mayores valores en los folículos quísticos, lo que permite sospechar la existencia de un mecanismo de regulación intrafolicular. Las concentraciones de cortisol en líquido folicular fueron aún mayores en animales tratados con ACTH, confirmando trabajos previos de nuestro laboratorio que indican una acción directa sobre la pared folicular (Amweg *et al.*, 2011). En este sentido, no han sido descritas alteraciones en la función adrenal ni en el cortisol sérico entre vacas cíclicas normales y vacas con COD (Silvia *et al.*, 2005). En este trabajo, sólo se encontraron diferencias

significativas en los niveles de cortisol sérico durante el tratamiento, pero no al momento de la formación del quiste. Por lo que podríamos sugerir que no existe evidencia que indique una alteración en la función adrenal en vacas con la enfermedad. Debido a que los glucocorticoides sólo serían sintetizados en la corteza adrenal y viajan sistémicamente por todo el organismo, la presencia de una ruta enzimática local es crucial para modular las concentraciones de la forma activa de dicha hormona (Krozowski *et al.*, 1999; Tetsuka *et al.*, 2003).

En cuanto a las implicancias de estos hallazgos en la patogenia de la COD a nivel del ovario, hemos demostrado que los quistes ováricos están expuestos a altas concentraciones de cortisol y que además, de acuerdo con otros estudios (Amweg *et al.*, 2011), tienen la capacidad de aumentar aún más estas concentraciones a nivel folicular en respuesta a estímulos específicos. En trabajos previos de otros autores así como de nuestro laboratorio, se han observado alteraciones significativas en la tasa de apoptosis folicular en vacas con COD espontánea e inducida, y estos hallazgos apoyan la idea de que la persistencia folicular es un componente importante de la patogénesis COD (Isobe and Yoshimura, 2007; Salvetti *et al.*, 2010). Un retraso en la regresión del folículo luego de la falla en la ovulación es una causa alternativa de formación de quistes, debido a que usualmente debería producirse la atresia y regresión de aquellos folículos que no están destinados a ovular. Además, se ha descrito en quistes foliculares de bovinos y ratas, cambios importantes en la diferenciación celular, la mayoría relacionados con la sobreexpresión de los componentes del citoesqueleto (Salvetti *et al.*, 2004; Ortega *et al.*, 2007b). En este contexto, la capacidad de los glucocorticoides para inhibir la apoptosis de células de la granulosa (Sasson *et al.*, 2001) también puede ser importante en la limitación de atresia de folículos antrales persistentes (y pueden incluso

prevenir la degeneración apoptótica de quistes ováricos) (Amsterdam *et al.*, 2002; Sunak *et al.*, 2007, Komiyama *et al.*, 2008).

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

V.2. EXPRESIÓN DE TGF- β EN LA FOLICULOGÉNESIS NORMAL Y EN ANIMALES CON COD ESPONTÁNEA E INDUCIDA.

La expresión, localización y regulación de las distintas isoformas de TGF- β en el ovario es extremadamente variable entre especies (Juengel *et al.*, 2004). Como fuera mencionado anteriormente, Nilsson *et al.* (2003) demostraron mediante inmunohistoquímica y RT-PCR que, en bovinos, TGF- β 1 es producido por las células de la granulosa de folículos preantrales (primarios y secundarios), antrales tempranos, y folículos de 1-2 mm de diámetro. A pesar de que estos autores no encontraron expresión proteica en las células de la granulosa de folículos más grandes (3-5 o 5-10 mm) ni en

células de la teca por inmunohistoquímica, el ARNm fue detectado en todos los estadios de desarrollo folicular.

En el presente estudio, a diferencia de lo señalado por Nilsson *et al.* (2003), se encontró inmunomarcación para TGF- β 1 en todas las categorías foliculares, con una menor expresión en la teca interna y en grandes folículos antrales (excepto en quistes espontáneos). Esto podría deberse a diferencias técnicas, lo cual nos permitió observar expresión proteica de TGF- β 1 que estaba manifiesta por la presencia de ARNm en el trabajo de Nilsson *et al.* (2003) y que se encontraba en dicho trabajo por debajo del límite de detección para la técnica de inmunohistoquímica utilizada por ellos.

Otro factor a tener en cuenta con respecto a TGF- β 1 y también a TGF- β 2 es que no se encontraron diferencias significativas en estructuras foliculares idénticas cuando se las comparó entre grupos. Es decir que folículos en diferentes estadios de desarrollo (primarios, secundarios, terciarios o atrésicos), no ven alterada la expresión de dicha proteína por la presencia de un quiste, y que por lo tanto pueden crecer de manera similar a lo que ocurre en ovarios de vacas sanas. Es importante resaltar que los quistes espontáneos, y no así los inducidos, tuvieron un alto porcentaje de área inmunomarcada en granulosa (TGF- β 1 y TGF- β 2) y en teca interna (TGF- β 1), mucho mayor a los folículos antrales terciarios o atrésicos del grupo control. La explicación de por qué los quistes inducidos no difieren de las estructuras normales antes mencionadas puede deberse a la menor persistencia en el tiempo, que lo hacen más parecidos histológica y fisiológicamente a los folículos preovulatorios.

El hecho de que las diferentes isoformas de TGF- β sean consideradas globalmente como inhibidores de la proliferación celular (Knight and Glister, 2006) y que los quistes espontáneos manifiesten un alto valor de expresión de dichas proteínas, demuestra que

estos factores pueden ser importantes mediadores de la permanencia estática de los quistes en el ovario. Esta información aporta una posible respuesta a los datos publicados por Salvetti *et al.* (2010), quienes encontraron que los quistes ováricos persisten en el tiempo sin proliferar ni atresarse. Los quistes inducidos, al tener sólo 10 días de persistencia, podrían estar todavía en una fase de crecimiento activo (lo cual justifica el menor tamaño promedio que tienen estas estructuras respecto a los quistes espontáneos) y por lo tanto no expresar tan altos niveles de TGF- β .

En cuanto a TGF- β 3, el patrón de inmunomarcación para esta isoforma fue completamente diferente a las otras dos. En este caso, los valores de expresión en células de la teca interna fueron tan altos como los de la granulosa y tampoco se encontraron diferencias significativas entre las distintas estructuras foliculares. Estos datos concuerdan parcialmente con los publicados por Nilsson *et al.* (2003), quienes encontraron marcación positiva para TGF- β 3 en todas las categorías foliculares estudiadas, y una alta expresión del mismo y de su ARNm en las células de la teca.

A pesar de toda la información aportada por los datos obtenidos, se debe ser muy cauteloso a la hora de hacer inferencias acerca de las funciones de TGF- β , ya que poco se sabe acerca de cómo las diferentes isoformas de TGF- β afectan la foliculogénesis (Trombly *et al.*, 2009). Los modelos *in vivo* para estudiar las acciones de TGF- β han fallado debido a que la generación de ratones genéticamente modificados mediante el bloqueo de genes (ratones *knock-out*) que codifican la síntesis de TGF- β 2, TGF- β 3, o del receptor de TGF- β tipo II resultó en altísima letalidad tanto embrionaria, como perinatal (Pangas and Matzuk, 2004). La posibilidad de generar en un futuro ratones *knock-out* específicos de tejido para TGF- β 2 y TGF- β 3 arrojaría luz sobre el

funcionamiento de estas proteínas durante todas las etapas de la foliculogénesis (Trombly *et al.*, 2009).

V.3. EXPRESIÓN DE ACTIVINA, INHIBINA Y FOLICULOSTATINA EN LA FOLICULOGÉNESIS NORMAL Y EN ANIMALES CON COD ESPONTÁNEA E INDUCIDA.

Ha sido ampliamente documentado que las moléculas de activina, inhibina y foliculostatina son sintetizadas en las células del ovario y cumplen importantes roles autocrinos y paracrinos en la regulación del ciclo estral de los animales domésticos (Smith and Cortvrindt, 1998; Liu *et al.*, 1999; McNatty *et al.*, 2000; Knight and Glistler, 2001; Zhao *et al.*, 2001; Drummond *et al.*, 2002; Pangas *et al.*, 2002; Glistler *et al.*, 2006; Knight and Glistler, 2006). En el caso particular de los bovinos, estas tres proteínas son sintetizadas por las células de la granulosa, pero ejercen no sólo un efecto autocrino sino también paracrino sobre las células de la teca y el ovocito (Knight and Glistler, 2001).

Los datos obtenidos sobre la expresión de activina y foliculostatina en este experimento demuestran que es posible encontrar marcación positiva mediante inmunohistoquímica tanto en granulosa como en teca interna. Sin embargo, la marcación en las células de la teca interna es muy inferior a la de la granulosa, tanto como para inferir que esa débil expresión pueda deberse al pasaje de dichas proteínas para cumplir con su rol paracrino. Es decir que, como fue descrito por Knight and Glistler (2003), activina y foliculostatina serían sintetizadas en el citoplasma de las células de la granulosa en diferentes magnitudes dependiendo del estadio de desarrollo folicular, y cumplirían con su función paracrina nivel de la teca. Muy diferente ha sido

el caso de la inhibina, que sólo fue detectada por esta técnica en las células de la granulosa de los folículos antrales con mayor desarrollo dentro del ovario.

Con respecto al estadio de desarrollo folicular, tanto la activina, sus receptores (tipo I y II) y la foliculostatina, han sido detectados en los folículos desde estadios preantrales (primarios y secundarios), indicando roles locales en la progresión folicular temprana (Rabinovici, 1991; McNatty *et al.*, 2000; Drummond *et al.*, 2002; Pangas *et al.*, 2002). Sin embargo, sus funciones en esta etapa parecen ser más bien permisivas que fundamentales, ya que ratones mutantes deficientes del receptor de activina tipo IIB detienen el desarrollo folicular en estadio antral temprano, sugiriendo que a partir de esta etapa el aporte de estas proteínas pasa a ser imprescindible (Matzuk *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos en este estudio para activina demuestran que el patrón de expresión de dicha molécula se comportó de manera similar en todos los grupos (control, COD inducida y COD espontánea), aumentado desde folículos preantrales a terciarios, para luego descender en los folículos atrésicos. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Knight and Glister (2003) e indican que el porcentaje de área inmunomarcada fue directamente proporcional al tamaño folicular. La información suministrada en este trabajo confirma la importancia de la activina en estadios foliculares avanzados, donde a medida que los folículos van creciendo, va aumentando su expresión en las células de la granulosa y por lo tanto sus acciones locales. Es importante aclarar que los folículos atrésicos, expresan menores cantidades de activina en sus células de la granulosa que los folículos terciarios, aseverando los conocimientos acerca de las funciones de esta proteína en cuanto a la estimulación de la diferenciación y la proliferación celular.

El patrón de marcación para foliculostatina fue similar al de activina, aumentado desde estadios foliculares tempranos (foliculos primarios y secundarios) hacia estadios foliculares más avanzados. En el caso de los foliculos quísticos, la expresión de ambas proteínas (activina y foliculostatina) también se comportó de manera similar, donde los quistes espontáneos tuvieron una marcación muy superior a la de los quistes inducidos. Sin embargo, la inmunodetección de ambas proteínas fue diferente cuando se evaluó a cada grupo en particular. Para el caso del grupo con COD inducida, los foliculos quísticos tuvieron una marcación de activina similar a los foliculos terciarios y una marcación de foliculostatina menor que estos últimos, mientras que para el grupo con COD espontánea, tanto activina como foliculostatina tuvieron porcentajes de expresión superiores en foliculos quísticos que en terciarios. Si se consideran las acciones que estas moléculas tienen sobre la función de las células encargadas de la síntesis de esteroides ováricos, estas diferencias podrían explicar algunos de los cambios observados en los niveles de hormonas de los distintos grupos.

La capacidad de activina e inhibina (y también de la foliculostatina como proteína de unión de la activina), de modular las repuestas a la FSH y LH hipofisarias, y por ende la esteroideogénesis ovárica, ha sido ampliamente documentada (Hasegawa *et al.*, 1988; Greenwald and Roy, 1994; Webb *et al.*, 1999; Knight and Glister, 2006). La activina puede aumentar la actividad de la aromatasas (Cyp19) y la producción de estradiol, mientras que inhibe la secreción de progesterona (Hutchinson *et al.*, 1987; Miro *et al.*, 1991; Shukovski *et al.*, 1991). Como se mostró anteriormente, los quistes, tanto espontáneos como inducidos evidenciaron una menor concentración de progesterona tanto sérica como folicular cuando se los comparó con foliculos preovulatorios de animales control. Estas diferencias en el caso de los quistes

espontáneos podrían estar mediadas por la acción de la activina sobre las células granulosas considerando que esta proteína se expresa mucho más en estas estructuras en relación a los folículos terciarios. Para el caso de los quistes inducidos, donde como ya se ha sido mencionado, los niveles de activina fueron similares entre quistes y folículos terciarios, las diferencias podrían deberse a los relativamente bajos niveles de foliculostatina que expresan los quistes inducidos con respecto a los folículos terciarios, lo que determinaría que a pesar de tener la misma proporción de activina total, la cantidad de activina libre (sin estar unida a la foliculostatina) sería mayor y, por lo tanto, la actividad dicha hormona también sería mayor.

De acuerdo con lo fundamentado anteriormente para las concentraciones de progesterona sérica y folicular y su relación con los niveles de activina/foliculostatina, lo mismo se podría pensar para el caso del estradiol. En este sentido, Knight and Glister (2003), al igual que otros autores (Hasegawa *et al.*, 1988; Xiao *et al.*, 1992; Knight and Glister 2001), han descrito que la activina aumenta los receptores de FSH y con ello la sensibilidad de las células de la granulosa a dicha hormona hipofisaria, lo que trae aparejado un aumento en la actividad de la enzima P450 aromatasa y en la producción de estradiol. En nuestros estudios, la concentración de 17β estradiol en líquido folicular mostró una tendencia a disminuir ($p=0,06$) en los quistes con respecto a los folículos terciarios. Sin embargo, la alta expresión de activina en quistes espontáneos y la baja expresión de foliculostatina en quistes inducidos (como fuera ya descrito) harían suponer que las concentraciones de estrógenos deberían ser mayores en quistes que en folículos preovulatorios. Estas discordancias, podrían deberse a la pérdida de células de la granulosa que sufren los quistes con el paso del tiempo (persistencia folicular), las cuales son responsables de la producción de 17β -estradiol folicular. El mayor tamaño

folicular (y por lo tanto mayor volumen) que evidenciaron los quistes, podría brindar una explicación al hecho de que dicha hormona en suero no mostrara diferencias significativas entre grupos (a pesar de la tendencia a disminuir en el líquido folicular de los quistes), especulando con que la cantidad total absoluta de esta hormona dentro de los folículos podría ser similar. No obstante, se debe tener en cuenta que la producción de hormonas esteroideas en el ovario (ya sea estrógenos o progesterona) depende de numerosos factores, tales como los niveles de gonadotropinas y de sus receptores, la actividad enzimática de las células que intervienen y de factores locales como el IGF y sus proteínas de unión (Hafez and Hafez, 2000; Ortega *et al.*, 2008; Zurvarra *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2011; Alfaro *et al.*, 2012; Salvetti *et al.*, 2012), por lo que activina, inhibina y foliculostatina podrían contribuir simplemente como una parte más en todo este complejo sistema de regulación.

Con respecto a la inhibina, esta hormona a diferencia de la activina ha sido descrita por numerosos autores como una molécula no sólo con acciones paracrin/autocrinas sino también endocrinas, inhibiendo la secreción de FSH a nivel de hipófisis (Knight, 1996; Mather *et al.*, 1997; de Krester *et al.*, 2000; Hafez and Hafez, 2000). Las concentraciones séricas de inhibina B evaluadas en este trabajo mediante la técnica de ELISA permitieron demostrar que no existen diferencias significativas en los niveles sanguíneos de dicha hormona entre folículos preovulatorios y folículos quísticos. Esto significa que, al igual que ocurre en vacas en proestro, existe una fuerte inhibición de la secreción de FSH en vacas con COD, mediada no sólo por los estrógenos sino también por la inhibina. La escasez de FSH podría contribuir a la persistencia de los quistes al impedir el recambio folicular y a alterar la ciclicidad normal por falta de un patrón de liberación regular de esta hormona que es la

responsable de la existencia de ondas foliculares en el bovino. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la definición de COD establece que los quistes ováricos son estructuras dinámicas y, por lo tanto, pueden regresar y ser reemplazados por otros, pueden atresarse o inclusive luteinizarse (Hamilton *et al.*, 1995; Rutter and Russo, 2000; Silvia *et al.*, 2002; Bartolomé *et al.*, 2005). Esto podría explicarse a partir de lo observado a nivel histológico, donde los quistes con mayor persistencia tienden a perder sus células de la granulosa debido al envejecimiento y, por ende, su capacidad para producir hormonas disminuye. Es decir que, con el paso del tiempo, disminuye la capacidad del quiste de producir estradiol e inhibina, lo que determina que finalice el bloqueo ejercido por estas hormonas sobre la hipófisis y que se reinicie una nueva onda de crecimiento folicular. La capacidad o incapacidad de estos nuevos folículos de ovular va a depender de que hayan desaparecido las causas iniciales que llevaron a la falla en la ovulación y a la formación del quiste.

Con respecto a la concentración de inhibina intrafolicular, a diferencia de lo encontrado en suero, los quistes ováricos presentaron niveles significativamente más bajos que los folículos preovulatorios. Esto podría deberse a que, como fuera explicado para la producción de 17- β estradiol, la persistencia folicular de los quistes lleva a la pérdida de células de la granulosa, las cuales son las responsables de la producción de inhibina. Sin embargo, el contraste entre inhibina en sangre e inhibina folicular podría deberse a la gran diferencia de tamaño existente entre los quistes espontáneos y los folículos preovulatorios, donde el tamaño promedio de los primeros triplica el tamaño de los últimos (35,1 mm en folículos quísticos contra 11,8 mm en folículos control). Según esta deducción, a pesar de que los folículos preovulatorios poseen una concentración mayor de inhibina, la cantidad total de dicha hormona en el folículo sería

similar a la del quiste, ya que a pesar de tener menos células de la granulosa por unidad de superficie, la pared del quiste es tan grande que alcanzaría para producir la misma cantidad (por supuesto que más diluida por el mayor volumen).

La mayor inmunomarcación de inhibina en folículos quísticos en comparación con los folículos terciarios del grupo control, sin que la concentración intrafolicular de dicha hormona indique lo mismo, no sólo podría ser explicada por un efecto de dilución y pérdida de células, si no por aspectos metodológicos. En este caso, se debe tener en cuenta que en la técnica de inmunohistoquímica, el anticuerpo primario anti-inhibina utilizado detecta la subunidad α , la cual es común a la inhibina A ($\alpha\beta$ A) y la inhibina B ($\alpha\beta$ B), a diferencia de las mediciones realizadas por ELISA en suero y líquido folicular donde se detectó solamente la inhibina B. Por lo tanto, el folículo quístico podría estar produciendo importantes cantidades de inhibina A y ser esta última proteína la responsable de la mayor inmunoexpresión.

Finalmente, en cuanto a las acciones de inhibina como modulador de la secreción de hormonas esteroides, ha sido ampliamente descrita la capacidad de dicha hormona de aumentar la producción de andrógenos en las células teca inducida por LH (Hsueh *et al.*, 1987; Hillier, 1991; Wrathall and Knight, 1995). Los resultados obtenidos en la presente tesis revelan cómo los niveles de testosterona son mayores en el líquido folicular de los quistes espontáneos en comparación con los folículos preovulatorios, lo cual podría estar relacionado con la mayor expresión de inhibina total encontrada en estas estructuras. Además, como fue mencionado anteriormente, los quistes espontáneos analizados en este estudio presentaban un mayor tiempo de persistencia estimado que los inducidos con ACTH, con claras manifestaciones histológicas de desprendimiento y pérdida de células de la granulosa en algunos casos, lo que podría traer aparejado una

menor capacidad de aromatización de los andrógenos producidos en la teca y por lo tanto una elevación de los niveles de estos últimos. Otra explicación posible para los altos valores de testosterona en folículos quísticos podría enfocarse en la frecuencia de pulsos de LH, los cuales dependen de la concentración de progesterona en sangre (Hatler *et al.*, 2003, 2008). Cuanto menores sean los niveles de progesterona en sangre, mayor va a ser la frecuencia de pulsos de LH, lo que determina una producción superior de andrógenos tecales. Este podría ser el mecanismo que opera en el caso de los quistes, en los cuales la concentración de progesterona sérica es menor que en animales control. Una combinación de todos los factores anteriormente descritos (baja progesterona, aumento de pulsos de LH, falta de aromatización en quistes con más persistencia y modulación de la inhibina en la producción de esteroides tecales) podrían argumentar de manera más consistente los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de testosterona.

VI. CONCLUSIONES



VI- CONCLUSIONES

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

1- La cuantificación de los niveles séricos e intrafolículos de hormonas esteroides permitió comprender la dinámica hormonal durante el desarrollo y formación de los quistes ováricos, así como establecer diferencias entre animales sanos (control), y aquellos con quistes inducidos con ACTH (quistes jóvenes) y con quistes espontáneos (quistes con mayor persistencia).

2- Los quistes ováricos parecen estar expuestos a altas concentraciones locales de glucocorticoides activos, lo que sugiere un papel local para el cortisol en la patogénesis de COD y en los mecanismos de regulación de la función ovárica.

3- Los niveles proteicos de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 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 no se diferenciaron de los encontrados en ovarios con enfermedad quística ovárica tanto inducida como espontánea.

4- Las diferentes isoformas de TGF- β , implicadas globalmente como inhibidores de los mecanismos de proliferación celular, estuvieron sobreexpresadas en estructuras quísticas espontáneas. La baja proliferación demostrada en los folículos quísticos previamente por nosotros y por otros autores permiten sospechar un importante rol de estos factores de crecimiento como mediadores de la persistencia folicular, permitiendo

que los quistes permanezcan en el tiempo impidiendo la reanudación de los ciclos estrales normales.

5- Tanto activina como foliculostatina estuvieron presentes en todos los estadios de desarrollo folicular, indicando una relación directamente proporcional entre la expresión de estas proteínas con el desarrollo folicular. Por otra parte, la inhibina sólo fue encontrada en aquellos folículos antrales de mayor tamaño y en los folículos quísticos.

6- Las acciones de activina/foliculostatina e inhibina como moduladores de la producción de hormonas esteroides descritas en otros estudios, podrían relacionarse con los valores hormonales hallados en nuestro ensayo. La comparación entre las concentraciones séricas y foliculares de progesterona y la expresión de activina en quistes y folículos preovulatorios, permiten suponer el rol indirecto de esta última molécula sobre la producción hormonal. Lo mismo podría esperarse entre la producción de andrógenos y la inhibina, o los cambios encontrados en los niveles de estrógenos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la producción de esteroides ováricos involucra numerosos factores que integran un complejo mecanismo, por lo que no sería correcto adjudicar todos los cambios encontrados a la acción moduladora de la gonadotropinas que tienen dichas moléculas.

7- Los niveles de inhibina y estrógenos detectados en animales con quistes fueron tan altos como los encontrados en los folículos preovulatorios de animales control. Esto podría estar inhibiendo la liberación de FSH a nivel de hipófisis, lo que contribuiría a la persistencia folicular y a la falta de reanudación de la ciclicidad normal.

8- El modelo experimental utilizado permitió el estudio y conocimiento de aspectos difíciles de abordar trabajando con muestras provenientes de animales que presentaron

la enfermedad de manera espontánea. Si bien hubo diferencias entre el modelo utilizado y los casos espontáneos de quistes diagnosticados y obtenidos a campo, las mismas podrían explicarse principalmente por el tiempo de persistencia. En este sentido, los modelos experimentales que permiten el estudio de los cambios incipientes que ocurren en la enfermedad, cambios que se establecen muchas veces antes de que esta sea diagnosticada a campo, resultan fundamentales para ampliar los conocimientos referentes a la etiopatogenia temprana de los quistes y pueden ser utilizados en estrategias preventivas.

VII. BIBLIOGRAFÍA



VII- BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.; GINTHER, O.J., (1992a). Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 94: 177–188.
- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; GINTHER, O.J. (1992b). The effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating FSH in heifers. *J. Reprod. Fert.* 95: 627-640.
- ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. (1995). Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenology* 43: 113-120.
- ADAMS, G.P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology.* 69: 72–80.
- ADHIKARI, D.; ZHENG, W.; SHEN, Y.; GORRE, N.; HAMALAINEN, T.; COONEY, A.J.; HUHTANIEMI, I.; LAN, Z.J.; LIU, K. (2010). Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum. Mol. Genet.* 3: 397–410.
- AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. (2010). Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reprod. Dom. Anim.* 45: 171–179.
- AGARWAL, S.K.; SHANKAR, U. (1998). Clinical response, related progesterone profile and subsequent fertility after gonadotropin releasing hormone administration in crossbred cows with ovarian cyst. *Ind. Vet. J.* 75: 127-130.
- ALFARO, N.S.; SALVETTI, N.R.; VELAZQUEZ, M.M.; STANGAFERRO, M.L.; REY, F.; ORTEGA, H.H. (2012). Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Res. Vet. Sci.* 92(3):478-85.
- AMSTERDAM, A.; TAJIMA, K.; SASSON, R. (2002). Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem. Pharmacol.* 64: 843-850.
- AMWEG, A.N.; PAREDES, A.H.; SALVETTI, N.R.; LARA, H.E.; 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.; MCEVOY T.G.; GARDNER J.O.; BAXTER G.; HOGG C.O.; WEBB R. (2002). Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction*. 123: 371-378.
- BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; MANN, G.E.; MCNEILLY, A.S. (1991). Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep *J. Reprod. Fertil.* 43: 125-138.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A. (1998). Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.* 76: 1903-1921.
- BARAVALLE, C.; SALVETTI, N.R.; MIRA, G.A.; LORENTE, J.A.; 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.
- BARTOLOMÉ, J.A.; THATCHER, W.W.; MELENDEZ, P.; RISCO, C.A.; ARCHBALD, L.F. (2005). Strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cysts in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227: 1409-1415.
- BAUMAN, D.E.; CURRIE, W.B. (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.* 63: 1514-1529.
- 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.; BUTLER, W.R. (1997). Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.* 56: 133-142.
- BEAM S.W.; BUTTLER W.R. (1999). Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in post partum dairy cows. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 5: 411-424.
- BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; GINTHER, O.J. (2002). Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biol. Reprod.* 66: 120-126.
- BESECKE, L.M.; GUENDER, M.J.; SLUSS, P.A.; POLAK, A.G.; WOODRUFF, T.K.; JAMESON, J.L.; BAUER-DANTOIN, A.C.; WEISS, J. (1997). Pituitary follistatin regulates activin-mediated production of follicle-stimulating hormone during the rat estrous cycle. *Endocrinology*. 138: 2841-2848.

- BLEACH, E.C.L.; GLENCROSS, R.G.; FEIST, S.A.; GROOME, N.P.; KNIGHT, P.G. (2001). Plasma Inhibin a in Heifers: Relationship with Follicle Dynamics, Gonadotropins, and Steroids During the Estrous Cycle and after Treatment with Bovine Follicular Fluid. *Biol. Reprod.* 64: 743–752
- BLOCK, S.S.; BUTLER, W.R.; EHRHARDT, R.A.; BELL, A.W.; VAN AMBURGH, M.E.; BOISCLAIR, Y.R. (2001). Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *J. Endocrinol.* 171: 339-348.
- BO, G.A.; CACCIA, M. (2002). Dinámica folicular en el ganado bovino. En: UNGERFELD, R. (2002). *Reproducción en los animales domésticos*. Ed. Melibea. 57-70p.
- BODENSTEINER, K.J.; WILTBANK, M.C.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. (1996). Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology.* 45: 499-512.
- BODENSTEINER, K.J.; CLAY, C.M.; MOELLER, C.L.; SAWYER, H.R. (1999). Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod.* 60, 381–386.
- BOSU, W.T.; PETER, A.T. (1987). Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 28: 725
- BOUSFIELD, G.R.; PERRY, W.M.; WARD, D.N. (1994). Gonadotropins chemistry and biosynthesis. En: KNONIL, E.; NEIL, J. *The physiology of reproduction*. 2nd ed. Raven Press Ltd, New York. 30: 1749-1792.
- 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.
- BUTLER, W.R. (1997). Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 449-457.
- BUTLER, W.R. (2003). Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 83: 211–218.
- CALDER, M.D.; SALFEN, B.E.; BAO, B.; YOUNGQUIST, R.S.; GARVERICK, H.A. (1999). Administration of progesterone to cows with ovarian follicular cysts results in a reduction in mean LH and LH pulse frequency and initiates ovulatory follicular growth. *J. Anim. Sci.* 77: 3037-3042.
- CALDER, M.D.; MANIKKAM, M.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S.; LUBAHN, D.B.; LAMBERSON, W.R.; GARVERICK, H.A. (2001). Dominant bovine ovarian follicular

- cysts express increased levels of messenger RNAs for luteinizing hormone receptor and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase $\Delta 4, \Delta 5$ isomerase compared to normal dominant follicles. *Biol. Reprod.* 65: 471–476.
- CALLEJAS, S. (2001) Fisiología del ciclo estral bovino. En: Palma, G. (2001). *Biotecnología de la Reproducción*. Ed Reprobiootec. 701 p.
- CAMERON, V.; NISHIMURA, E.; MATHEWS, L.; LEWIS, K.; SAWCHENCO, P.; VALE, W. (1994). Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary and testis. *Endocrinology*. 134: 799–808.
- CAMPBELL, B.K.; SOUZA, C.; GONG, J.; WEBB, R.; KENDALL, N.; MARSTERS, P.; ROBINSON, G.; MITCHELL, A.; TELFER, E.E.; BAIRD, D.T. (2003). Domestic ruminants as models for elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reproduction*. 61: 429–443.
- CANFIELD, R.W.; BUTLER, W.R. (1990). Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 7: 323-330.
- CASIDA, L.E.; MCSHAN, W.H.; MEYER, R.K. (1944). Effects of an unfractionated pituitary extract upon cystic ovaries and nymphomania in cows. *J. Anim. Sci.* 3: 273-282.
- CASIDA, L.E.; CHAPMAN, A.B. (1951). Factors affecting the incidence of cystic ovaries in a herd of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 34: 1200-1205.
- CASTRILLON, D.H.; MIAO, L.; KOLLIPARA, R.; HORNER, J.W.; DEPINHO, R.A. (2003). Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 5630: 215–218.
- CHRISTOPHER, C.; DEVANATHAN, T.G. (1997). Incidence of Cystic Ovarian Degeneration in crossbred cows. *Ind. Vet. J.* 74: 184-184.
- COOK, D.L.; SMITH, C.A.; PARFET, J.R.; YOUNGQUIST, R.S.; BROWN, E.M.; GARVERICK, H.A. (1990) Fate and turnover of ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J. Reprod. Fertil.* 90: 37–46.
- CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. (1997). Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Hum. Reprod.* 12: 759–768.
- DAVIS, G.H.; MCEWAN, J.C.; FENNESSY, P.F.; DODDS, K.G.; MCNATTY, K.P.; O, WS. (1992). Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecX1 FecX1) for the inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. *Biol. Reprod.* 46: 636-640.

- DAVOREN, J.B.; KASSON, B.G.; LI, C.H.; HSUEH, A.J.W. (1986). Specific insulin-like growth factor (IGF) I and II –binding sites on rat granulosa cells: relation to IGF action. *Endocrinology*. 119: 2155-2162.
- DAY, N. (1991). The treatment and prevention of cystic ovarian disease. *Vet. Med.* 86: 761–766.
- DAY, M.L.; ANDERSON L.H. (1998). Current concepts on the control of puberty in cattle. *J. Anim. Sci.* 76: 1–15.
- DE KRETZER, D.M.; MEINHARDT, A.; MEEHAN, T.; PHILLIPS, D.J.; O'BRYAN, M.K.; LOVELAND, K.A. (2000). The roles of inhibin and related peptides in gonadal function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 161: 43–46.
- DE SILVA, M.; REEVES, J.J. (1988). Hypothalamic-Pituitary function in chronically cystic and regularly cycling dairy cows. *Biol. Reprod.* 38: 264.
- DE VET, A.; LAVEN, J.S.; DE JONG, F.H.; THEMME, A.P.; FAUSER, B.C. (2002). Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil. Steril.* 77: 357–362.
- DELLMANN, H.D.; EURELL, J.A. (1998). *Textbook of veterinary histology*. 5th ed, London: Williams y Wilkins. 252 p.
- DISKIN, M.G.; MACKAY, D.R.; ROCHE, J.F.; 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.; RIBADU, A.Y.; NOBLE, K.M.; TEBBLE, J.E.; 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.
- DONG, J.; ALBERTINI, D.F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T.R.; LU, N.; MATZUK, M.M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 383: 531–535.
- DOUTHWAITE, R.; DOBSON, H. (2000). Comparison of different methods of diagnosis of cystic ovarian disease in cattle and an assessment of its treatment with a progesterone-releasing intravaginal device. *Vet. Rec.* 147: 355-359.
- DORRINGTON, J.; CHUMA, A.V.; BENDELL, J.J. (1988). Transforming growth factor- β and follicle-stimulating hormone promote rat granulosa cell proliferation. *Endocrinology* 123, 353-359.

- DRUMMOND, A.E.; LE, M.T.; ETHIER, J.F.; DYSON, M.; FINDLAY, J.K. (2002). Expression and localization of activin receptors, Smads, and beta glycan to the postnatal rat ovary. *Endocrinology*. 143: 1423-1433.
- DUDLEY, A.T.; LYONS, K.M.; ROBERTSON, E.J. (1995). A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes. Dev.* 9: 2795-2807.
- DUFOUR, J.; WHITMORE, H.L.; GINTHER, O.J.; CASIDA, L.E. (1971). Identification of the ovulating follicle by its size on different days of the estrus cycle in heifers. *J. Anim. Sci.* 34: 527-538.
- DUFOUR, J.; CAHILL, L.P.; MAULEON, P. (1979). Short- and long-term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular populations in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 57: 301-309.
- DURLINGER, A.L.; KRAMER, P.; KARELS, B.; DE JONG, F.H.; UILENBROEK, J.T.; GROOTEGOED, J.A.; THEMMEN, A.P. (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 140: 5789-5796.
- DURLINGER, A.L.; GRUIJTERS, M.J.; KRAMER, P.; KARELS, B.; INGRAHAM, H.A.; NACHTIGAL, M.W.; UILENBROEK, J.T.; GROOTEGOED, J.A.; THEMMEN, A.P. (2002). Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*. 143: 1076-1084.
- ELVIN, J.A.; YAN, C.; MATZUK, M.M. (2000). Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Mol. Cell. Endocrinol.* 159: 1-5.
- EPPIG, J.J. (2001) Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122: 829-838.
- ESPINOZA-VILLAVICENCIO, J.L.; ORTEGA PÉREZ, R.; PALACIOS ESPINOSA, A.; VALENCIA MÉNDEZ, J.; ARÉCHIGA FLORES, C.F. (2007). Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia*. 32: 93-99.
- ETHIER, J.F.; FINDLAY, J.K. (2001). Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction*. 121: 667-675.
- EVANS, A.C.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. (1994). Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J. Reprod. Fertil.* 100: 187-194.

- EVANS, A.C.O.; WALSH, S.W.; WILLIAMS, E.J.; MOSSA, F. (2009). Desarrollo folicular y sus consecuencias en la fertilidad en bovinos. En: Libro de resúmenes del VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal – IRAC 2009.
- EYESTONE, W.H.; AX, R.L. (1984). A review of ovarian follicular cysts in cows, with comparisons to the condition in women, rats and rabbits. *Theriogenology*. 22: 109-125.
- FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, M.Á. (2008). El aparato reproductor de la vaca. Morfología, estructura y función. En: El ciclo estral de la vaca. Diagnóstico fotográfico. (Ed.: Fernández Sánchez, M.Á.) Servet, Zaragoza, España, 2-10 p.
- FORDE, N.; BELTMAN, M.E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J.M.; CROWE, M.A. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 124: 163–169
- FORTUNE, J.E. (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 135–163.
- FRANDSON, R.D.; SPURGEON, T.L. (1995). Anatomía y fisiología de los animales domésticos. 5ta edición. México, Mc. Graw-Hill Interamericana. 410 p
- GALLOWAY, S.M.; MCNATTY, K.P.; CAMBRIDGE, L.M.; LAITINEN, M.P.; JUENGEL, J.L.; JOKIRANTA, T.S.; MCLAREN, R.J.; LUIRO, K.; DODDS, K.G.; MONTGOMERY, G.W.; BEATTIE, A.E.; DAVIES, G.H.; RITVOS, O. (2000). Mutations in an oocytederived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.* 25: 279–283.
- GARCÍA SACRISTÁN, A. (1995). Fisiología Veterinaria. Editorial Interamericana. McGraw-Hill, España.
- GARM, O. (1949). A study of bovine nymphomania with special reference to etiology and pathogenesis. *Acta. Endocrinol.* (3): 1-144.
- GARNERO, O.; PERUSIA, O. (2002). Manual de anestias y cirugías del bovino. 1ra. Edición. - Editorial Imprenta San Cayetano, Santa Fe, Argentina, p. 125.
- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. (1997). Histología. Texto y Atlas. McGraw-Hill Interamericana, México, 506 p.
- GARVERICK, H.A. (1997). Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 995-1004.
- GENESER, F. (2005). Histología. 3ra edición. Editorial Médica Panamericana. 813 p.
- GHIGLIERI, C.; KHATCHADOURIAN, C.; TABONE, E.; HENDRICK, J.C.; BENAHMED, M.; MENEZO, Y. (1995). Immunolocalization of transforming growth factor-beta 1 and

- transforming growth factor-beta 2 in the mouse ovary during gonadotrophin-induced follicular maturation. *Hum. Reprod.* 10: 2115–2119.
- GIER, H.T.; MARION, G.B. (1968). Factors affecting bovine ovarian activity after parturition. *J. Anim. Sci.* 27: 1621–1626.
- GINTHER, O.J.; KNOPF, L; KASTELIC, J.P. (1989). Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 41: 247–254.
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55: 1187-1194.
- GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C.; (1997). Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology.* 48: 75-87.
- GINTHER, O.J. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 61-79.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADUE, F.X.; KOT, K. (2001). Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.* 65: 638-647.
- GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A.; KOT, K. (2002). Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. *Reproduction.* 124: 475–482.
- GLISTER, C.; KEMP, C.F.; KNIGHT, P.G. (2004). Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction.* 127: 239–254.
- GLISTER, C.; GROOME, N.P.; KNIGHT, P.G. (2006). Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. *Journal of Endocrinology* 188 215–225.
- GONG, J.G. (2002). Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23: 229-241.
- GREENWALD, G.S.; ROY, S.K. (1994). Follicular development and its control. In *The Physiology of Reproduction*. 2nd Ed pp 629–724. Eds E Knobil, and JD Neill. Raven Press Ltd, New York

- GÜMEN, A.; SARTORI, R.; COSTA, F.M.; 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.; 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.
- GUTIERREZ-AGUILAR C.G. (1997). The effect of nutrition and metabolic hormones on follicular development in cattle. PhD dissertation, University of Edinburgh, 146-166 p.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ B. (2000). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7ma ed. McGraw-Hill. Interamericana.
- HAMILTON, S.A.; GARVERICK H.A.; KEISLER D.H.; XU, Z.Z.; LOOS, K.; YOUNGQUIST, R.S.; SALFEN, B.E. (1995). Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol. Reprod.* 53: 890-898.
- HANSEL, W.; CONVEY, E.M. (1983). Physiology of the estrus cycle. *J. Anim. Sci.* 57(2): 404-424.
- HASEGAWA, Y.; MIYAMOTO, K.; ABE, Y.; NAKAMURA, T.; SUGINO, H.; ETO, Y.; SHIBAI, H.; IGARASHI, M. (1988). Induction of follicle-stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 156: 668–674.
- 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.
- HATLER, T.B.; HAYES, S.H.; RAY, D.L.; REAMES, P.S.; SILVIA, W.J. (2008). Effect of subluteal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows. *Vet J* 177: 360-368.
- HEUER, C.; SCHUKKEN, Y.H.; DOBBELAAR, P. (1999). Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* 82:295-304.
- HILLIER, S.G. (1991). Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries. *J. Endocrinol.* 131: 171–175.
- HILLIER, S.G. (2001). Gonadotrophic control of ovarian follicular growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179: 39-46.

- HOOIJER, G.A.; LUBBERS, R.B.F.; DUCRO, B.J.; VAN ARENDONK, J.A.M.; KAAL-LANSBERGEN L.M.T.E.; DER LENDE, T. (2001). Genetic parameters for cystic ovarian disease in Dutch black and white dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 84: 286–291.
- HOOIJER, G.A.; VAN OIJEN, M.A.; FRANKENA, K.; NOORDHUIZEN, J.P. (2003). Milk production parameters in early lactation: potential risk factors of cystic ovarian disease in Dutch dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 81: 25–33.
- HOOIJER, G.A.; VAN OIJEN, M.A.; FRANKENA K.; NOORDHUIZEN J.P. (2005). Influence of negative energy balance on the reproductive performance after treatment of cystic ovarian disease with gonadotrophin-releasing hormone in dairy cows. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 52: 298-304.
- HSUEH, A.J.; DAHL, K.D.; VAUGHAN, J.; TUCKER, E.; RIVIER, J.; BARDIN, C.W. (1987). Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proceedings National Academy of Sciences USA.* 84: 5082–5086.
- HSUEH, A.J.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev.* 15: 707-724.
- HUNTER, M.G.; ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; WEBB, R. (2004). Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83: 461–477.
- HUSSEIN, M.R. (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum. Reprod. Update.* 11:162- 178.
- HUTCHINSON, L.A.; FINDLAY, J.K.; DE VOS, F.L.; ROBERTSON, D.M. (1987). Effects of bovine inhibin, transforming growth factor-beta and bovine activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 146: 1405–1412.
- IGNOTZ, RA; ENDO, T; MASSAGUE, J. (1987). Regulation of fibronectin and type I collagen levels by transforming growth factor β . *J. Biol. Chem.* 262: 6443-6446.
- IRELAND, J.J. (1987). Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fertil.* 34: 39-54.
- ISOBE, N.; YOSHIMURA, Y. (2000a). Immunocytochemical study of cell proliferation in the cystic ovarian follicles in cows. *Theriogenology.* 54: 1159-1169.
- ISOBE, N.; YOSHIMURA, Y. (2000b). Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: a DNA-end labeling histochemical study. *Theriogenology.* 53: 897-904.

- ISOBE, N.; YOSHIMURA, Y. (2007). Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle. *J. Reprod. Dev.* 53: 1119-1124.
- JAATINEN, R.; LAITINEN, M.P.; VUOJOLAINEN, K.; AALTONEN, J.; LOUHIO, H.; HEIKINHEIMO, K.; LEHTONEN, E.; RITVOS, O. (1999). Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Mol. Cell. Endocrinol.* 156: 189–193.
- JOHNSON, A.D.; ULBERG, L.C. (1967). Influence of exogenous progesterone on follicular cysts in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 50: 758-761.
- 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.
- JOLLY, P.D.; TISDALL, D.J.; HEATH, D.A.; LUN, S.; 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.
- JUENGEL, J.L.; HUDSON, N.L.; HEATH, D.A.; SMITH, P.; READER, K.L.; LAWRENCE, S.B.; O'CONNELL, A.R.; LAITINEN, M.P.; CRANFIELD, M.; GROOME, N.P.; RITVOS, O.; MCNATTY, K.P. (2002). Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol. Reprod.* 67: 1777-1789.
- JUENGEL, J.L.; BIBBY, A.H.; READER, K.L.; LUN, S.; QUIRKE, L.D.; HAYDON, L.J.; MCNATTY, K.P. (2004). The role of transforming growth factor-beta (TGFbeta) during ovarian follicular development in sheep. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2: 78.
- JUENGEL, J.L.; MCNATTY, K.P. (2005). The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum. Reprod. Update.* 11: 143–160.
- KAWATE, N.; INABA, T.; MORI, J. (1990). A quantitative comparison in the bovine of steroids and gonadotropin receptors in normally developing follicles and in follicular and luteinized cysts. *Anim. Reprod. Sci.* 23: 273–281.
- KESLER, D.J.; GARVERICK, H.A.; CAUDLE, A.B.; ELMORE, R.G.; YOUNGQUIST, R.S.; BIERSCHWAL C.J. (1980). Reproductive hormone and ovarian changes in cows with ovarian cysts. *J. Dairy Sci.* 63: 166-170.

- KESLER, D.J.; GARVERICK, H.A. (1982). Ovarian cysts in dairy cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 55: 1147-1159.
- KEZELE, P.; NILSSON, E.E.; SKINNER, M.K. (2005). Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol. Reprod.* 73: 967-973.
- KNIGHT, P.G. (1996). Roles of inhibins, activins and follistatin in the female reproductive system. *Front. Neuroendocrin.* 17: 476-509
- KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. (2001). Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction.* 121: 503-512
- KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. (2003). Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 165-183.
- KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. (2006). TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 132: 191-206.
- KNOPF, L.; KASTELIC, J.P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O.J. (1988). Ovarian follicular dynamic in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest. Anim. Endocrin.* 6: 111-119.
- KOMIYAMA, J.; NISHIMURA, R.; LEE, H.Y.; SAKUMOTO, R.; TETSUKA, M.; ACOSTA, T.J.; SKARZYNSKI, D.J.; OKUDA, K. (2008). Cortisol Is a Suppressor of Apoptosis in Bovine Corpus Luteum. *Biol Reprod.* 78: 888-895.
- KROZOWSKI, Z.; LI, K.X.; KOYAMA, K.; SMITH, R.E.; OBEYESEKERE, V.R.; STEIN-OAKLEY, A.; SASANO, H.; COULTER, C.; COLE, T.; SHEPPARD, K.E. (1999). The type I and type II 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *J. Steroid Biochem.* 69: 391-401.
- KUMANOV, P.; NANDIPATI, K.C.; TOMOVA, A.; ROBEVA, R.; AGARWAL, A. (2005). Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications. *Reprod. Biomed. Online.* 10: 786-812.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LAPORTE, H.M.; HOGVEEN, H.; SCHUKKEN, Y.H.; NOORDHUIZEN, J.P.T.M. (1994) Cystic ovarian disease in Dutch dairy cattle I. Incidence, risk factors and consequences. *Livest. Prod. Sci.* 38: 191-197.

- LEE, W.S.; OTSUKA, F.; MOORE, R.K.; SHIMASAKI, S. (2001). The effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol. Reprod.* 65: 994-999.
- LERNER, A.A.; SALAMONE, D.F.; CHIAPPE, M.E.; BARANAO, J.L.; (1995). Comparative studies between freshly isolated and spontaneously immortalized bovine granulosa cells: protein secretion, steroid metabolism, and responsiveness to growth factors. *J. Cell. Physiol.* 164: 395-403.
- LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P.E.J.; DE WULF, J.; DE KRUIF, A. (2004). Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology.* 62: 1131-1143.
- LEROY, J.L.M.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I.G.F.; BOLS, P.E.J. (2008). Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part I. The Importance of Negative Energy Balance and Altered Corpus Luteum Function to the Reduction of Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows. *Reprod. Dom. Anim.* 43: 612-622.
- LI, R.; PHILLIPS, D.M.; MATHER, J.P. (1995). Activin promotes ovarian follicle development in vitro. *Endocrinology.* 136: 849-856.
- LIEFERS, S.C.; VEERKAMP, R.F.; TE PAS, M.F.W.; DELAVALD, C.; CHILLIARD Y.; VAN DER LENDE, T. (2003). Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight, and estrus in dairy cows. *J. D. Sc.* 86: 799-807.
- LIPTRAP, R.M.; 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, X.; ANDOH, K.; ABE, Y.; KOBAYASHI, J.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. (1999). A comparative study on transforming growth factor-beta and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinology.* 140: 2480-2485.
- LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YA'NIZ, J.; FENECH, M.; LÓPEZ-BÉJAR, M. (2002). Risk factors for postpartum ovarian cysts and their spontaneous recovery or persistence in lactating dairy cows. *Theriogenology.* 58: 1623-1632.

- LUCY, M.C. (2003). Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reprod Suppl.* 61: 415–427.
- LUO, G.; HOFMANN, C.; BRONCKERS, A.L.; SOKOCKI, M.; BRADLEY, A.; KARSENTY, G. (1995). BMP-7 is an inducer of nephrogenesis and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes. Dev.* 9: 2808-2820
- LYONS, R.M.; MOSES, H.L. (1990). Transforming growth factor and the regulation of cell proliferation. *Eur. J Biochem.* 187: 467-473.
- MAIZON, D.O.; OLTENACU, P.A.; GRÖN, Y.T.; STRAWDERMAN, R.L.; 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.
- MARTIN, P. (1997). Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 276: 75–81.
- MASSAGUÉ, J.; WOTTON, D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 19: 1745-1754.
- MATHER, J.P.; MOORE, A.; LI, R.H. (1997). Activins, inhibins and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. *Proceedings of the Society of Experimental and Biological Medicine.* 215: 209–222.
- MATTON, P.; ADELAKOUN, V.; COUTURE, Y.; DUFOUR, J.J. (1981). Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrus cycle. *J. Anim. Sci.* 52: 813-820.
- MATZUK, M.; GINEGOLD, M.; SU, J.; HSUEH, A.; BRADLEY, A. (1992). A-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature.* 360: 313–319.
- MATZUK, M.M.; KRUMAR, T.R.; SHOU, W.; COERVER, K.A.; LAU, A.L.; BEHRINGER, R.R.; FINEGOLD, M.J. (1996) Transgenic models to study the roles of inhibins and activins in reproduction, oncogenesis, and development. *Recent Prog. Horm. Res.* 51: 123-154.
- MCGEE, E.; HSUEH, A. (2000). Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocr. Rev.* 21(2): 200–214.
- MCGRATH, S.A.; ESQUELA, A.F.; LEE, S.J. (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol. Endocrinol.* 9: 131–136.

- MCNATTY, K.P.; FIDLER, A.E.; JUENGEL, J.L.; QUIRKE, L.D.; SMITH, P.R.; HEATH, D.A.; LUNDY, T.; OCONNELL, A.; TIDDALL, D.J. (2000). Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol. Cel. Endocrinol.* 163: 11-20.
- MCNATTY, K.P.; JUENGEL, J.L.; WILSON, T.; GALLOWAY, S.M.; DAVIS, G.H. (2001). Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 13: 549-555.
- MCNATTY, K.P.; GALLOWAY, S.M.; WILSON, T.; SMITH, P.; HUDSON, N.L.; O'CONNELL, A.; BIBBY, A.H.; HEATH, D.A.; DAVIS, G.H.; HANRAHAN, J.P.; JUENGEL, J.L. (2005). Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet. Sel. Evol.* 37(Suppl I): S25-S38.
- MIHM, M.; AUSTIN E.J. (2002). The final stages of dominant follicle selection in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23: 155-166.
- MIRO, F.; SMYTH, C.D.; HILLIER, S.G. (1991). Development-related effects of recombinant activin on steroid synthesis in rat granulosa cells. *Endocrinology.* 129: 3388-3394.
- MIRO, F.; HILLIER, S.G. (1996). Modulation of granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and differentiation by activin. *Endocrinology.* 137: 464-468.
- MOBERG, G.P. (1991). How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *J. Dairy Sci.* 74: 304-311.
- MONNIAUX, D.; BARBEY, S.; RICO, C.; FABRE, S.; GALLARD, Y.; LARROQUE, H. (2010). Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle?. *Reprod. Fertil. Dev.* 22(7): 1083-1091.
- MONTGOMERY, G.W.; GALLOWAY, S.M.; DAVIS, G.H.; MCNATTY, K.P. (2001). Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction.* 121: 843-852.
- NAKAO, T.; NUMATA, Y.; KUBO, M.; YAMAUCHI, S. (1978). Treatment of cystic ovarian disease in dairy cattle. *Cornell Vet.* 68: 161-178.
- NAKAO, T.; GRÜNERT, E. (1990). Effects of dystocia on postpartum adrenocortical function in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73: 2801-2806.
- NAKATANI, A.; SHIMASAKI, S.; DEPAOLO, L.V.; ERICKSON, G.F.; LING, N. (1991). Cyclic changes in follistatin messenger ribonucleic acid and its protein in the rat ovary during the oestrous cycle. *Endocrinology.* 129: 603-611.

- NANDA, AS.; WARD, W.R.; WILLIAMS, P.C.W.; DOBSON, H. (1988). Retrospective analysis of the efficacy of different hormone treatments of cystic ovarian disease in cattle. *Vet. Rec.* 122: 155-158.
- NANDA, A.S.; WARD, W.R.; DOBSON, H. (1991). Opioid involvement in LH release during the negative feedback effects of oestradiol and progesterone in dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 3: 709-714.
- NELSON, S.T.; MARTIN, A.D.; OSTERAS, O. (2010). Risk factors associated with cystic ovarian disease in Norwegian dairy cattle. *Acta Vet. Scand.* 52:60. <http://www.actavetscand.com/content/52/1/60>.
- NILSSON, E.E.; SKINNER, M.K. (2001) Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 8: 17-20.
- NILSSON, E.E.; KEZELE, P.; SKINNER, M.K. (2002). Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol. Cell. Endocrinol.* 188: 65-73.
- NILSSON, E.E.; DORAISWAMY, V.; SKINNER, M.K. (2003). Transforming growth factor-beta isoform expression during bovine ovarian antral follicle development. *Mol Reprod Dev.* 66(3): 237-246.
- NILSSON, E.E.; SKINNER, M.K. (2003). Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol. Reprod.* 69: 1265-1272.
- NILSSON, E.E.; SKINNER, M.K. (2004). Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol. Cell. Endocrinol.* 214: 19-25.
- ODORE, R.; RE, G.; BADINO, P.; DONN, A.; VIGO, D.; BIOLATTI, B.; 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.
- OKTAY, K.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R.G. (1997). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 11: 3748-3751.

- OKTAY, K.; KARLIKAYA, G.; AKMAN, O.; OJAKIAN, G.K.; OKTAY, M. (2000). Interaction of extracellular matrix and activin-A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. *Biol. Reprod.* 2: 457–461.
- OKTEM, O.; URMAN, B. (2010). Understanding follicle growth in vivo. *Hum. Reprod.* 25 (12): 2944–2954.
- OPSOMER, G.; MIJTEN, P.; CORYN, M.; DEKRUIF, A. (1996). Post-partum anoestrus in dairy cows. *Vet. Quart.* 18: 68-75.
- 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?. *An. Rep. Sc.* 56: 211-222.
- ORTEGA, H.H.; MACIEL, M.; GALLARDO, M.; TABOADA, A. (1995). Influencia de la Ingestion de Proteínas Sobre la Reproducción. *Therios.* 24(126): 306-314
- ORTEGA, H.H.; ALTHAUS, R.; TABOADA, A.; GALLARDO, M. (1997). Niveles de urea y amonio en sangre y leche de bovinos y su influencia sobre la reproducción. *Revista F.A.V.E.* 10(1-2): 33-39.
- 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.; STANGAFERRO, M.L.; SALVETTI, N.R.; ARCANGELO, D.; PALOMAR, M.M. (2007a) Estudio del balance proliferación/apoptosis en estructuras foliculares de bovinos con enfermedad quística ovárica inducida experimentalmente. *Medicina.* 67(Supl III): 185.
- ORTEGA, H. H.; SALVETTI, N.R.; MÜLLER, L.A.; AMABLE, P.; LORENTE, J.A.; BARBEITO, C.G.; GIMENO, E.J. (2007b). Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with Cystic Ovarian Disease. *J. Comp. Pathol.* 136: 222-230.
- ORTEGA, H.H.; PALOMAR, M.M.; ACOSTA, J.C.; SALVETTI, N.R.; DALLARD, B.E.; LORENTE, J.A.; BARBEITO, C.G.; 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.

- OTSUKA, F.; MOORE, R.K.; IEMURA, S.; UENO, N.; SHIMASAKI, S. (2001b). Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 289: 961–966.
- OTSUKA, F.; MOORE, R.K.; SHIMASAKI, S. (2001a). Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. *J. Biol. Chem.* 276: 32889–32895.
- OVERTON, T.R.; WALDRON, M.R. (2004). Nutritional management of transitions dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *J. Dairy Sci.* 87: E105–E119.
- PALMA, G.A. (2008). *Biocnología de la Reproducción*. 2da Edición. Repro Biotec., Argentina.
- PANGAS, S.A.; RADEMAKER, A.W.; FISHMAN, D.A.; WOODRUFF, T.K. (2002). Localization of the activin signal transduction components in normal human ovarian follicles: implications for autocrine and paracrine signaling in the ovary. *J. Clin. Endocr. Metab.* 87: 2644-2657.
- PANGAS, S.A.; MATZUK, M.M. (2004). Genetic models for transforming growth factor beta superfamily signaling in ovarian follicle development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 225(1–2):83–91.
- PANGAS, S.A.; RAJKOVIC, A. (2006). Transcriptional regulation of ealy oogenesis: in search of masters. *Hum. Reprod. Upd.* 12: 65-76
- PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. (1998). Developmental and Hormonal Regulation of Keratinocyte Growth Factor Expression and Action in the Ovarian Follicle. *Endocrinology* 139: 228–235.
- PEÑA, M.; GÓNGORA, A.; ESTRADA, L. (2007). Factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación. Implicaciones en la producción de embriones bovinos. *Revista MVZ.* 12: 942-954
- PETER, A.T.; LIPTRAP, R.M. (1985). Plasma gonadotrophin levels in sows with experimental cystic ovarian follicles. *Br. Vet. J.* 141: 288–296.
- PETER, A.T.; DHANASEKARAN, N. (2003). Apoptosis of granulosa cells: a review on the role of MAPK-signalling modules. *Reprod. Domest. Anim.* 38: 209-213.
- PETER, A. T. (2004). An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 39:1-7.

- PRETHEEBAN, T.; BALENDRAN, A.; GORDON, M.B.; 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.
- PRICE, C.A.; SILVA, J.M. (1999). Intracellular regulation of P450 aromatase by FSH and insulin in bovine granulosa cells. *J. Reprod. Fertil. Abstract Series* 23: 5.
- PRIEDKALNS, J. (1993). Capítulo 13: Sistema reproductor femenino. En: *Histología Veterinaria* (Ed. Dellman H.D). 2da. Edición. Acribia. España.
- PROBO, M.; COMIN, A.; MOLLOC, A.; CAIROLIA, F.; STRADAIOLID, G.; VERONESI, M.C. (2011). Reproductive performance of dairy cows with luteal or follicular ovarian cysts after treatment with buserelin. *Anim. Reprod. Sci.* 127: 135–139.
- PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology* 44: 915-923.
- QUIRK, S.M.; COWAN, R.G; HARMAN, R.M; HU, C.L.; PORTER, D.A. (2004). Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J. Anim. Sci.* 82: E40-E52.
- RABINOVICI, J.; GOLDSMITH, P.C.; ROBERTS, V.J.; VAUGHAN, J.; VALE, W.; JAFFE, R.B. (1991). Localization and secretion of inhibin/activin subunits in the human and subhuman primate fetal gonads. *J. Clin. Endocr. Metab.* 73: 1141-1149.
- RAJAKOSKI, E. (1960). The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*. 34 (52): 7-68.
- REDDY, P.; LIU, L.; ADHIKARI, D.; JAGARLAMUDI, K.; RAJAREDDY, S.; SHEN, Y.; DU, C.; TANG, W.; HAMALAINEN, T.; PENG, S.L. (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*. 5863: 611–613.
- REFSAL, K.R.; JARRIN-MALDONADO J.H. Y NACHREINER R.F. (1988). Basal and estradiol-induced release of gonadotrofins in dairy cows with naturally occurring ovarian cysts. *Theriogenology*. 30: 679.
- REY, F.; RODRÍGUEZ, F.M.; SALVETTI, N.R.; PALOMAR, M.M.; BARBEITO, C.G.; ALFARO, N.S.; 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.; NAKADA, K.; TANAKA, Y.; MORIYOSHI, M.; ZHANG, W.C.; NAKAO, T. (1999). Lack of LH response to exogenous estradiol in heifers with ACTH-induced ovarian follicular cysts. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 979-981.
- RIBADU, A.Y.; NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; ZHANG, W.C.; TANAKA, Y.; NAKAO, T. (2000). The role of LH pulse frequency in ACTH induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 64: 21–31.
- RIZZINO, A. (1988). Transforming growth factor- β : multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. *Devel. Biol.* 130: 411-422.
- RIZZO, A.; CAMPANILE, D.; MUTINATI, M.; MINOIA, G.; SPEDICATO, M.; SCIORSCI, R.L. (2011). Epidural vs intramuscular administration of leirelin, a GnRH analogue, for the resolution of follicular cysts in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 126: 19–22
- ROBERT, C.; GAGNE, D.; LUSSIER, J.G.; BOUSQUET, D.; BARNES, F.L.; 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, A; SPORN, B. (1988). Transforming growth factor β . *Adv. Cancer. Res.* 51: 107-145.
- ROBERTS, A.J.; SKINNER, M.K. (1991). Transforming growth factor-alpha and -beta differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinology.* 129: 2041–2048.
- ROBERTS, V.J.; BARTH, S.; EL-ROEIY, A.; YEN, S.S.C. (1993). Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocr. Metab.* 77: 1402–1410.
- ROBKER, R.L.; RUSSELL, D.L.; YOSHIOKA, S.; CHIDANADA SHARMA, S.; LYDON, J.P.; O'MALLEY, B.W.; ESPEY, L.L.; RICHARDS, J.S. (2000). Ovulation: a multi-gene, multi-step process. *Steroids* 65: 559–570.
- ROCHE, J.F. (2006). The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim. Reprod. Sci.* 96: 282–296.
- RODGERS, R.J.; 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.; 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.
- ROSS, M.; KAYE, G.; PAWLINA, W. (2004). *Electronic Image Collection for Histology. A text and Atlas with cell and molecular biology.* (Eds. Lippincot Williams and Wilkins) 4ta Edición.
- ROTH, Z.; BIRAN, D.; LAVON, Y.; DAFNI, I.; YAKOBI, S.; BRAW-TAL, R. (2012). Endocrine milieu and developmental dynamics of ovarian cysts and persistent follicles in postpartum dairy cows, *J. Dairy Sci.* 95 (2012) 1729-1737.
- ROY, S.K. (1993). Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta modulation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster pre-antral and early antral follicles. *Biol. Reprod.* 48: 552-557.
- ROY, S.K.; KOLE, A.R. (1998). Ovarian transforming growth factor-beta (TGFbeta) receptors: in-vitro effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF-beta on receptor expression in human preantral follicles. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 207-214.
- RUKKWAMSUK, T.; GREENELEN, M.J.; KRUIP, T.A.; WENSING, T. (2000). Interrelation of fatty acid composition in adipose tissue, serum, and liver of dairy cows during the development of fatty liver postpartum. *J. D. Sci.* 83: 52-59.
- RUTTER, B.; RUSSO A.F. (2000). *Enfoques sobre la Dinámica, el Diagnóstico y el Tratamiento de los quistes ováricos en el Bovino.* Centro Editor Dr. Edgardo Segismundo Allignani, Santa Fe, Argentina, 37 p.
- SALVETTI, N.R.; GIMENO E.J.; LORENTE J.A., ORTEGA H.H. (2004). Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. *Cells Tissues Organs.* 178: 117-125.
- SALVETTI, N. R.; REY, F.; ORTEGA, H. H. (2007). Enfermedad quística ovárica bovina. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias* 6 (1-2): 72-87.
- SALVETTI, N.R., PANZANI, C.G., GIMENO, E.J., NEME, L.G., ALFARO, N.S.; ORTEGA, H.H. (2009). An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7: 68.
- SALVETTI, 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.

- SALVETTI, N.R.; STANGAFERRO, M.L.; PALOMAR, M.M.; ALFARO, N.S.; REY, F.; GIMENO, E.J.; 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(1-2): 98-110.
- SALVETTI, N.R.; ALFARO, N.S.; VELÁZQUEZ, M.M.; AMWEG, A.N.; MATILLER, V.; DÍAZ, P.U.; ORTEGA, H.H. (2012). Alteration in localization of steroid hormone receptors and coregulatory proteins in follicles from cows with induced ovarian follicular cysts. *Reproduction.* 144(6): 723-735.
- SARTORI, R.; BARROS, C.M. (2011). Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 124: 244–250.
- SASSON, R.; TAJIMA, K.; AMSTERDAM, A. (2001). Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2. *Endocrinology* 142: 802-811.
- SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. (1988). Pattern of growth of dominant follicles during the estrus cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 83: 663-671.
- SAVIO, J.D.; BOLAND, M.P.; HYNES, N.; ROCHE, J.F. (1990). Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. *J. Reprod. Fertil.* 88: 569–579.
- SCHERNTHANER, W.; WENIGERKIND, H.; STOJKOVIC, M.; PALMA, G.A.; MÖDL, J.; WOLF, E.; BREM, G. (1999). Pregnancy rate after ultrasound-guided follicle aspiration in nonlactating cows from different breeds. *Zentralbl. Veterinärmed. A.* 46: 33-37
- SCHILLO, K.K. (2008). *Reproductive Physiology of Mammals: From Farm to Field and Beyond.* Ed. Hardcover, Cengage Learning. 142-169 p.
- SCHMID, P.; COX, D.; VAN DER PUTTEN, H.; MCMASTER, G.K.; BILBE, G. (1994). Expression of TGF-beta s and TGF-beta type II receptor mRNAs in mouse folliculogenesis: stored maternal TGF-beta 2 message in oocytes. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 201: 649–656.
- SCHULTZ, G.S.; WYSOCKI, A. (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair and Regen.* 17: 153–162.
- SCHWALL, R.H.; MASON, A.J.; WILCOX, J.N.; BASSET, S.G.; ZELEZNIK, A.J. (1990). Localization of inhibin/activin subunit mRNAs within the primate ovary. *Mol Endocrinol.* 4: 75–79.

- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; ANDRADE, E.R.; BINELLI, M.; OLIVEIRA, J.A.; NASCIMENTO, A.B. (2003). Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*. 59:1435-1440.
- SHARMA, S.P. (1998). Surgical treatment of unilateral cystic ovary in a Friesian cow - Clinical case report. *Ind. Vet. J.* 75: 161-162.
- SHELDON, I.M.; DOBSON, H. (2004). Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 82-3 (Special Issue): 295-306.
- SHEMESH, M.; GUREVICH, M.; MIZRACHI, D.; DOMBROVSKY, L.; STRAM, Y.; FIELD, M.J.; SHORE, L.S. (1997). Expression of functional luteinizing hormone (LH) and its messenger ribonucleic acid in bovine uterine vein. *Endocrinology*. 138: 4844-4851.
- SHIMASAKI, S.; KOGA, M.; BUSCAGLIA, M.; SIMMONS, D.; BICSAK, T.; LING, N. (1989). Follistatin gene expression in the ovary and extragonadal tissues. *Mol. Endocrinol.* 3: 651-659.
- SHIMASAKI, S.; ZACHOW, R.J.; LI, D.; KIM, H.; IEMURA, S.; UENO, N.; SAMPATH, K.; CHANG, R.J.; ERICKSON, G.F. (1999). A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 7282-7287.
- SHIMASAKI, S.; MOORE, R.K.; OTSUKA, F.; ERICKSON, G.F. (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr. Rev.* 25: 72-101.
- SHRESTHA, H.K.; NAKAO, T.; HIGAKI, T.; SUZUKI, T.; 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.
- SHUKOVSKI, L.; FINDLAY, J.; ROBERTSON, D. (1991). The effect of folliclestimulating hormone-suppressing protein or follistatin on luteinizing bovine granulosa cells in vitro and its antagonistic effect on the action of activin. *Endocrinology*. 126: 3395-3402.
- SIDIS, Y.; FUJIWARA, T.; LEYKIN, L.; ISSACSON, K.; TOTH, T.; SCHNEYER, A. (1998). Characterization of inhibin/activin subunit, activin receptor, and follistatin messenger ribonucleic acid in human and mouse oocytes: evidence for activin's paracrine signaling from granulosa cells to oocytes. *Biol. Reprod.* 50: 807-812.
- SILVA, C.C.; KNIGHT, P.G. (1998). Modulatory actions of activin-A and follistatin on the developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 58: 558-565.

- SILVIA, W.J.; HATLER, T.B.; NUGENT, A.M., LARANJA DA FONSECA, L.F. (2002). Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23: 167-177.
- SILVIA, W.J.; MCGINNIS, A.S.; HATLER, T.B. (2005). A comparison of adrenal gland function in lactating dairy cows with or without ovarian follicular cysts. *Reprod. Biol.* 5: 19-29.
- SIMPSON, R.B.; CHASE, J.R.; SPICER, L.J.; VERNAN, R.K.; HAMMOND, A.L.; RAE D.O. (1994). Effect of exogenous insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. *J. Reprod. Fertil.* 102: 483-492.
- SIRIOS, J.; FORTUNE, J.E. (1988). Ovarian follicular dynamic during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39: 308-317.
- SISCO, B.; PFEFFER P.L. (2007). Expression of activin pathway genes in granulosa cells of dominant and subordinate bovine follicles. *Theriogenology.* 68(1):29-37.
- SKINNER, M.K.; KESKI-OJA, J.; OSTEEEN, K.G.; MOSES, H.L. (1987). Ovarian thecal cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology.* 121: 786-792.
- SKINNER, M.K. (2005). Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum. Reprod. Update.* 5: 461-471.
- SMITH, J.; CORTVRIND, R. (1998). Inhibin A and B secretion in mouse preantral follicle culture. *Hum Reprod.* 13: 927-935.
- SMITH, J.; CORTVRIND, R.; HU, Y.; VANDERSTICHELE, H. (1998). Effects of recombinant activin A on in vitro culture of mouse preantral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 50: 294-304.
- SONG, J.; WESSEL, G.M. (2005). How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. *Differentiation* 73: 1-17
- SPICER, L.; ECHTERNKAMP S. (1986). Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 68: 428-451.
- SPICER, L.; ECHTERNKAMP S. (1995). The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Dom. Anim. Endocrinol.* 12: 223-245.

- STAIGMILLER, R.B.; ENGLAND, B.G. (1982). Folliculogenesis in the bovine. *Theriogenology*. 17: 43-52.
- STAPLES, G.R.; BURKE, J.M.; THATCHER, W.W. (1998). Influence of supplemental fats on reproductive tissue and performance of lactating cows. *J. Anim. Sci.* 81: 856-871.
- STOCK, A.E.; FORTUNE, J.E. (1993). Ovarian follicular dominant in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicles and endocrine parameters. *Endocrinology*. 132: 1108-1114.
- SUNAK, N.; GREEN, D.F.; ABEYDEERA, L.R.; THURSTON, L.M.; MICHAEL, A.E. (2007). Implication of cortisol and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the development of porcine (*Sus scrofa domestica*) ovarian follicles and cysts. *Reproduction* 133: 1149-1158.
- TEERDS, K.J.; DORRINGTON, J.H. (1992). Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 during follicular development in the adult rat ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 84: R7-R13.
- TETSUKA, M.; YAMAMOTO, S.; HAYASHIDA, N.; HAYASHI, K.G.; HAYASHI, M.; ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. (2003). Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in bovine follicle and corpus luteum. *J. Endocrinol.* 177: 445-852.
- TROMBLY, D.J.; WOODRUFF, T.K.; MAYO, K.E. (2009). Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis. *Semin. Reprod. Med.* 27(1):14-23
- UNGERFELD, R. (2002). Reproducción en los animales domésticos. 1ra edición. Melibea Ediciones, Montevideo. ISSN/ISBN: 9974-659-2;
- URROZ, C. (2010). Fisiología de la reproducción. En: Elementos de anatomía y fisiología animal. EUNED, Costa Rica, 187-217 p.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63: 1717-1751.
- VAN ROOIJ, I.A.; BROEKMANS, F.J.; TE VELDE, E.R.; FAUSER, B.C.; BANCSI, L.F.; DE JONG, F.H.; THEMME, A.P. (2002). Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum. Reprod.* 17: 3065-3071.
- VANHOLDER, T.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A. (2006). Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod. Nutr. Develop.* 46: 105-119.

- VISSER, J.A.; THEMME, A.P. (2005). Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 234: 81–86.
- WALSH, S.W.; WILLIAMS, E.J.; EVANS, A.C.O. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 123: 127–138
- WANG, H.; ERIKSSON, H.; 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.; GUTIERREZ, C.G.; GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K. (1998). Dynamics and aetiology of ovarian follicular cysts in post-partum dairy cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 33: 285-288.
- WEBB, R.; CAMPBELL, B.K.; GARVERICK, H.A.; GONG, J.G.; GUTIERREZ, C.G.; ARMSTRONG, D.G. (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.; GUTIERREZ, C.G.; GARVERICK, H.A.; ARMSTRONG, D.G. (2003). Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction.* 61: 71–90.
- WEBB, R.; CAMPBELL, B.K. (2007). Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 64: 141-163.
- WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; CAMPBELL, B.K.; HUNTER, M.G. (2007). Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology.* 68:22-29.
- WILT BANK, J.N.; TYLER, W.J.; CASIDA, L.E. (1953). A study of atretic large follicles in six sire-groups of Holstein–Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 36: 1077–1082.
- WILT BANK, M.; GÜMEN, A.; SARTORI, R. (2002). Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology.* 57: 21–52.
- WRATHALL, J.H.M.; KNIGHT, P.G. (1995). Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. *J. Endocrinol.* 145: 491–500.
- XIAO, S.; ROBERTSON, D.M.; FINDLAY, J.K. (1992). Effects of activin and folliclestimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 131: 1009–1016.

- XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. (1995). Expression of FSH and LH receptor mRNA in bovine follicles during the first follicular waves. *Biol. Reprod.* 53: 951-957.
- YAMOTO, M.; MINAMI, S.; NAKANO, R.; KOBAYASHI, M. (1992). Immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits in human ovarian follicles during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocr. Metab.* 74: 989-993.
- YOSHIOKA, K.; IWAMURA, S.; KAMOMAE, H. (1996). Ultrasonic observations on the turnover of ovarian follicular cysts and associated changes of plasma LH, FSH, progesterone and oestradiol-17 β in cows. *Res. Vet. Sci.* 61: 240-244.
- YOSHIOKA, K.; IWAMURA, S.; KAMOMAE, H. (1998). Changes of ovarian structures, plasma LH, FSH, progesterone and estradiol-17 beta in a cow with ovarian cysts showing spontaneous recovery and relapse. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 257-260.
- ZAIED, A.A.; GARVERICK, H.A.; KESLER, D.J.; BIRSCHWAL, C.J.; ELMORE, R.J., YOUNGQUIST R.S. 1981. Luteinizing hormone response to estradiol benzoate in cows with ovarian cyst. *Theriogenology.* 16: 349.
- ZHAO, J.; TAVERNE, M.A.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; BEVERS, M.M.; VAN DEN HURK, R. (2001). Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biol. Reprod.* 65: 967-977
- ZULU, V.C.; SAWAMUKAI, Y.; NAKADA, K.; KIDA, K.; MORIYOSHI, M. (2002). Relationship among insulin-like growth factor-I, blood metabolites and post partum ovarian function in dairy cows. *J. Vet. Med. Sc.* 64: 879-885.
- ZURVARRA, F.M.; SALVETTI, N.R.; IAN MASON, J.; VELAZQUEZ, M.M. L.; ALFARO, N.S.; 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.