



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y  
MOLECULAR APLICADA  
ICIVET LITORAL UNL-CONICET

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**“PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA  
ACTIVINA/INHIBINA/FOLICULOSTATINA, Y  
DEL FACTOR DE CRECIMIENTO  
TRANSFORMANTE  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) EN LA PATOGENIA  
DE LA ENFERMEDAD QUISTICA OVÁRICA  
BOVINA Y EN LA PERSISTENCIA FOLICULAR  
ASOCIADA”.**

AUTORA: VET. VALENTINA MATILLER  
DIRECTORA: DRA. NATALIA SALVETTI  
CODIRECTORA: DRA. FLORENCIA REY

Cultivad el espíritu crítico. Reducido a sí mismo no es ni un despertador de ideas ni un estímulo para grandes obras, pero sin el todo es caduco...

Louis Pasteur

*Dedico este trabajo a...*

Juan Cruz,  
mi gran orgullo, estímulo y el mayor regalo que me hizo la vida...

Mis padres, Martha y Raúl,  
mis ejemplos a seguir en bondad, trabajo y perseverancia...

## Agradecimientos...

A toda mi familia: mi adorado Juan, mis padres, mi queridísima hermana y los suyos; por su apoyo incondicional, comprensión infinita y amor inquebrantable.

A la Dra. Natalia Salvetti por confiar en mí y, día a día, durante el transcurso de mis años como estudiante doctoral, transmitirme con la mayor generosidad, sus conocimientos, su criterio y su seguridad. También y con mucho agrado, por su amistad.

Al Dr. Hugo Ortega por brindarme la posibilidad de acrecentar mi formación profesional, por su siempre buena predisposición y por ser ejemplo a seguir en empeño, liderazgo y perseverancia.

A la Dra. Florencia Rey, por su carácter detallista, vocación educadora y por sus alentadoras palabras.

Al Mag. Matías Stangaferro, por trabajar conmigo en la realización de esta tesis.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biología Celular y Molecular y del Centro de Medicina Comparada del ICiVet Litoral: Silvina Addona, Natalia Alfaro, Ayelén Amweg, Carolina Andreotti, Celina Baravalle, Eugenia Baravalle, Camila Beccaría, Matías Belotti, Germán Benitez, Mónica Cadoche, Magalí Colombero, Bibiana Dallard, Pablo Díaz, Andrea Duré, Carlos Franco, Carolina Gaggiomo, Gustavo Hein, Emilia Huber, Mauricio Kern, Belkis Marelli, Leandro Neme, Carolina Panzani, María Belén Peralta, Elizabet Pereyra, Adrián Perri, Nicolás Piccioti, María Sol Renna, Fernanda Rodriguez, Sofía Sacco, Paula Silvestrini, Pablo Siroski, Antonela Stassi, Melisa Velázquez y Marcelo Zayas por tantos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

A mi muy querida Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, por permitirme concretar mis sueños veterinarios de grado y postgrado y cumplir mis anhelos de docencia.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la Beca que me permitió finalizar los estudios de posgrado en la carrera del doctorado en Ciencias Veterinarias.

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

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

<b>Abreviaturas utilizadas</b> .....	I
<b>Índice de tablas</b> .....	III
<b>Índice de figuras</b> .....	IV
<b>Resumen</b> .....	XVI
<b>Abstract</b> .....	XVIII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. HISTOFISIOLOGÍA OVÁRICA.....	2
1.1.1. Clasificación y desarrollo folicular.....	2
1.1.2. Regulación del crecimiento folicular.....	3
1.1.3. Ciclo estral en bovinos.....	8
1.1.3.1. Ondas foliculares.....	9
1.1.3.2. Atresia folicular.....	11
1.1.4. Conclusión de conceptos introductorios: Histofisiología ovárica.....	12
1.2. SUPERFAMILIA DEL TGF- $\beta$ .....	14
1.2.1. Factores de crecimiento.....	14
1.2.2. Roles orgánicos de la superfamilia del TGF- $\beta$ .....	14
1.2.3. Integrantes de la superfamilia del TGF- $\beta$ : ligandos, receptores y correceptores.....	15
1.2.3.1. Subfamilia del TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3.....	16
1.2.3.2. Sistema activina, inhibina y foliculostatina.....	18
1.2.3.3. Receptores.....	20
1.2.3.3.1. Activación del receptor.....	21
1.2.3.3.2. Señalización a través de las Smads.....	23
1.2.3.4. TGF $\beta$ -RIII (Betaglycano).....	24
1.2.4. Roles intraováricos de los miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$ .....	25
1.2.4.1. Activación de los folículos primordiales en reposo.....	26
1.2.4.2. Progresión de los folículos primarios a estadios antrales tempranos.....	27
1.2.4.3. Desarrollo de los folículos antrales y mecanismo de selección folicular.....	29
1.2.4.4. Ovulación y formación del cuerpo lúteo.....	33
1.2.5. Conclusión de conceptos introductorios: Superfamilia TGF- $\beta$ .....	34
1.3. ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA.....	35
1.3.1. Definición.....	35
1.3.2. Etiología y patogenia.....	37
1.3.2.1. Disfunción hipotálamo-hipofisaria.....	37
1.3.2.2. Disfunción ovárica/folicular.....	38
1.4. PERSISTENCIA FOLICULAR.....	40
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	44
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	45
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	46
3.1. PROCEDIMIENTOS EFECTUADOS CON ANIMALES.....	47
3.1.1. COD espontánea.....	47
3.1.1.1. Diagnóstico de COD espontánea.....	47

3.1.1.2. Obtención de muestras.....	47
3.1.1.2.1. Aspiración folicular guiada por ecografía.....	48
3.1.1.2.2. Ovariectomía.....	49
3.1.2. COD Inducida mediante ACTH.....	50
3.1.2.1. Diseño experimental.....	50
3.1.2.2. Monitoreo de los cambios ováricos.....	51
3.1.2.3. Obtención de muestras.....	51
3.1.3. Modelo de Persistencia Folicular.....	52
3.1.3.1. Diseño experimental.....	52
3.1.3.2. Monitoreo de los cambios ováricos.....	54
3.1.3.3. Obtención de muestras.....	54
3.1.4. Quistes ováricos bovinos obtenidos en playa de faena.....	56
3.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	57
3.2.1. Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas.....	58
3.2.2. Procesamiento de las muestras para western blot.....	58
3.3. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS EN SUERO Y LÍQUIDO FOLICULAR.....	60
3.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MIEMBROS DE TGF- $\beta$ .....	61
3.4.1. Inmunohistoquímica simple.....	61
3.4.2. Western Blot.....	64
3.4.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	68
3.4.4. Análisis digital de imágenes.....	68
3.5. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA.....	70
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
4.1. RESULTADOS DE PROCEDIMIENTOS EFECTUADOS CON ANIMALES.....	72
4.1.1. Diagnóstico y obtención de muestras provenientes de casos de COD espontánea.....	72
4.1.2. Inducción de la enfermedad quística ovárica mediante ACTH.....	73
4.1.2.1 Niveles de hormonas esteroides durante la inducción.....	75
4.1.2.2. Concentración de hormonas esteroides en suero y líquido folicular.....	77
4.1.3. Inducción de folículos persistentes mediante dispositivos de progesterona.....	77
4.1.3.1. Perfil de LH a lo largo del modelo de inducción de folículos persistentes.....	80
4.1.3.2. Concentración de hormonas esteroides y FSH en suero a lo largo de la inducción de folículos persistentes.....	81
4.1.3.3. Concentración de hormonas esteroides en suero y LF en animales con folículos persistentes.....	82
4.2. EXPRESION DE COMPONENTES DE LA SUPERFAMILIA DE TGF- $\beta$ Y PROTEINAS RELACIONADAS EN COD ESPONTANEA E INDUCIDA.....	83
4.2.1. Expresión de las isoformas TGF- $\beta$ .....	83
4.2.1.1. TGF- $\beta$ 1.....	83
4.2.1.2. TGF- $\beta$ 2.....	87
4.2.1.3. TGF- $\beta$ 3.....	91
4.2.2. Expresión de Activina, Inhibina y Foliculostatina.....	95
4.2.2.1. Activina.....	95
4.2.2.2. Inhibina.....	99
4.2.2.3 Concentración de Inhibina en Líquido Folicular y Suero.....	100
4.2.2.4. Foliculostatina.....	101

4.2.2.5. Expresión de isoformas de Foliculostatina en pared folicular completa de folículos en desarrollo y quísticos provenientes de playa de faena.....	105
4.2.3. Localización y expresión de receptores de miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$ en COD espontánea e inducida.....	106
4.2.3.1. Localización y expresión de TGF- $\beta$ RI.....	107
4.2.3.2. Localización y expresión de TGF- $\beta$ RIII.....	111
4.2.3.3. Localización y expresión de ACTRIIB.....	115
4.3 EXPRESIÓN DE COMPONENTES DE LA SUPERFAMILIA TGF- $\beta$ EN LA PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA.....	119
4.3.1. Expresión de Activina.....	120
4.3.2. Expresión de Inhibina en pared folicular.....	121
4.3.3. Concentración de Inhibina B en Líquido Folicular y Suero.....	123
4.3.4. Expresión de Foliculostatina.....	123
4.3.4. Expresión de TGF- $\beta$ 1.....	125
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>128</b>
5.1. INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA: RELACIONES CON LOS HALLAZGOS EN LA ENFERMEDAD ESPONTÁNEA EN BOVINOS.....	129
5.2. PERSISTENCIA FOLICULAR: MODELO DE INDUCCIÓN.....	132
5.3. EXPRESIÓN DE TGF- $\beta$ EN LA FOLICULOGÉNESIS NORMAL Y EN ANIMALES CON COD ESPONTÁNEA E INDUCIDA Y EN LA PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA.....	134
5.4. SISTEMA ACTIVINA-INHIBINA-FOLICULOSTATINA: EXPRESIÓN EN LA FOLICULOGÉNESIS NORMAL Y EN ANIMALES CON COD ESPONTÁNEA E INDUCIDA Y PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA.....	137
5.5 RECEPTORES DE LA SUPERFAMILIA TGF- $\beta$ : SU EXPRESIÓN EN LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA INDUCIDA Y ESPONTÁNEA.....	142
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>145</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>149</b>



## Abreviaturas utilizadas:

AC	Folículos atrésicos del grupo control
ACTH	Adrenocorticotrofina
ACVRIB	Receptor de Activina IB
ACVRIIB	Receptor de Activina IIB
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AESP	Folículos atrésicos del grupo con COD espontánea
AIND	Folículos atrésicos del grupo con COD inducida
ALK	Quinasa tipo activina
AMH	Hormona Inhibidora de los conductos de Müller
AMHR	Receptor de la Hormona Inhibidora de los conductos de Müller
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
BMP	Proteínas Morfogénicas Óseas
BMPR	Receptores de Proteínas Morfogénicas Óseas
CL	Cuerpo Lúteo
COD	Enfermedad Quística Ovárica
CRH	Hormona liberadora de Corticotrofina
Cyp17	Citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa
Cyp19	Citocromo P450 aromatasa 19 <sup>a</sup>
DAB	Diaminobencidina
DE	Desvío Standard
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
FSH	Hormona Foliculoestimulante
FSHR	Receptor de Hormona Foliculoestimulante
G	Granulosa
GDF	Factor de crecimiento y diferenciación
GDNF	Factor Neurotrófico derivado de las células Gliales
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
IGFR1	Receptor de Factor de crecimiento análogo a Insulina tipo 1
IGF	Factor de crecimiento análogo a Insulina
IM	Intramuscular
kDa	Kilo Dalton
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
MANOVA	Análisis multivariante de varianza
MEC	Matríz extracelular
NGF	Factor de crecimiento nervioso
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	Prostaglandina
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
PIND	Folículos primarios del grupo con COD inducida
PM	Peso molecular
QESP	Quistes espontáneos
QIND	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
TESP	Folículos terciarios del grupo con COD Espontánea
TI	Teca Interna
TIND	Folículos terciarios del grupo con COD Inducida
TGF	Factor de crecimiento transformante
TGF- $\alpha$	Factor de crecimiento transformante- $\alpha$
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TGF- $\beta$ 1	Factor de crecimiento transformante $\beta$ 1
TGF- $\beta$ 2	Factor de crecimiento transformante $\beta$ 2
TGF- $\beta$ 3	Factor de crecimiento transformante $\beta$ 3
TGF- $\beta$ RI	Receptor I del factor de crecimiento transformante $\beta$
TGF- $\beta$ RII	Receptor II del factor de crecimiento transformante $\beta$
TGF- $\beta$ RIII	Receptor III del factor de crecimiento transformante $\beta$
TI	Teca Interna
TIND	Folículos terciarios del grupo con COD inducida
TESP	Folículos terciarios del grupo con COD inducida
UI	Unidades internacionales
USA	Estados Unidos de América
VEGF	Factor de crecimiento de endotelios vasculares
WB	Western blot
ZP	Zona Pelúcida

# *Índice de tablas*

<b>Tabla 1</b>	Representación de los grupos que incluyen a los distintos receptores y sus ligandos.	21
<b>Tabla 2</b>	Detalle de los anticuerpos primarios utilizados y las condiciones de uso en la técnica de inmunohistoquímica.	61
<b>Tabla 3</b>	Detalle de los anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de inmunohistoquímica de acuerdo a los grupos experimentales.	62
<b>Tabla 4</b>	Detalle de los anticuerpos primarios utilizados en la técnica de western blot.	66
<b>Tabla 5</b>	Detalle de los anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de western blot.	69

# *Índice de figuras*

<b>Figura 1</b>	Principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento con sus componentes.	3
<b>Figura 2</b>	Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo hipofisario y el ovario.	5
<b>Figura 3</b>	Progresión folicular a través de las sucesivas etapas de desarrollo y su respuesta a las gonadotrofinas hipofisarias.	8
<b>Figura 4</b>	Diagrama del ciclo estral bovino mostrando los niveles hormonales en cada una de las etapas de las fases folicular y luteal.	8
<b>Figura 5</b>	Esquema representativo del reclutamiento folicular.	9
<b>Figura 6</b>	Diagrama esquemático que relaciona los cambios de expresión (en células de la granulosa) de inhibina, activina y foliculostatina de acuerdo con las diferentes etapas de desarrollo folicular y sus funciones reguladoras a nivel intraovárico y periférico.	20
<b>Figura 7</b>	Representación del mecanismo general de activación de los receptores TGF- $\beta$ y SMADS.	24
<b>Figura 8</b>	Diferentes miembros de la superfamilia TGF $\beta$ , receptores asociados y proteínas de unión son expresados en células de la teca, células de la granulosa y ovocitos, y ejecutan un rol como moléculas de señalación intrafolicular autócrinas (flechas blancas) y parácrinas (flechas negras).	25
<b>Figura 10</b>	Persistencia del folículo dominante.	42
<b>Figura 11</b>	Técnica de aspirado folicular guiado por ecografía.	48
<b>Figura 12</b>	Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje transvaginal.	49

<b>Figura 13</b>	Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes foliculares mediante ACTH.	50
<b>Figura 14</b>	Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje por flanco izquierdo.	52
<b>Figura 15</b>	Representación de los tratamientos y el monitoreo del modelo de persistencia folicular.	53
<b>Figura 16</b>	Imágen ecográfica que demuestra un folículo persistente en el momento previo a su aspiración en el día 15 de permanencia.	54
<b>Figura 17</b>	Secuencia de imágenes ecográficas que muestran el desarrollo folicular en un animal del grupo tratado con 15 días de persistencia que evolucionó hasta el estadio de quiste. OI: Ovario Izquierdo, OD: Ovario Derecho, CL: Cuerpo Lúteo.	55
<b>Figura 18</b>	Ovarios provenientes de playa de faena. A: ovarios sanos con folículos terciarios grandes y CL. B: ovarios con estructura quística de diámetro superior a 30 mm en uno de ellos.	56
<b>Figura 19</b>	Esquema de la procedencia de las muestras destinadas a distintos estudios.	57
<b>Figura 20</b>	Marcadores de PM para SDS-PAGE, amplio espectro (Rainbow™, RPN800E, GE Healthcare).	65
<b>Figura 21</b>	A: Ovarios de una vaca con COD espontánea obtenidos mediante ovariectomía bilateral. B: Imágen ecográfica de un quiste espontáneo en el momento de la aspiración folicular guiada por ecografía. Características morfológicas de los folículos preovulatorios y quísticos al momento de la extracción mediante ovariectomía.	73

<b>Figura 22</b>	Características morfológicas de los folículos preovulatorios y quísticos al momento de la extracción mediante ovariectomía.	74
<b>Figura 23</b>	Concentraciones séricas de 17 $\beta$ -estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en animales de los grupos control y tratados con ACTH durante el protocolo experimental.	76
<b>Figura 24</b>	Concentración de 17 $\beta$ -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.	78
<b>Figura 25</b>	Características morfológicas de los folículos preovulatorios (control) y con 5, 10 y 15 días de persistencia (tratados) al momento de la ovariectomía (A). Se observa el espesor de las capas granulosa y teca interna (B). Las barras representan la media $\pm$ DE, aquellas con asterisco son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). G: granulosa; T: teca.	79
<b>Figura 26</b>	A: Diámetro máximo de los folículos dominantes y persistentes en vacas del grupo control (●) y tratado (■) respectivamente. Media ( $\pm$ SEM) del diámetro folicular interno y diferencias con el correspondiente al folículo preovulatorio en el grupo control. B: Imágenes ecográficas representativas de los folículos preovulatorios y persistentes de 5, 10 y 15 días.	79
<b>Figura 27</b>	Perfiles representativos de LH en el control (A, C, D) y las vacas tratadas con progesterona (B, E, F, G, H).	80
<b>Figura 28</b>	Concentraciones séricas de 17 $\beta$ -estradiol, progesterona y FSH en vacas controles (●) y tratadas (■).	81
<b>Figura 29</b>	Concentración de hormonas esteroides en suero y líquido folicular en animales con folículos persistentes.	82
<b>Figura 30</b>	Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para TGF- $\beta$ 1 en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea.	84

<b>Figura 31</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 1 en células de la granulosa de varios tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	85
<b>Figura 32</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 1 en células de la teca interna de diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	86
<b>Figura 33</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 1 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo control (C).	86
<b>Figura 34</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 1 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD inducida (IND).	87
<b>Figura 35</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 1 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD espontánea (ESP).	87
<b>Figura 36</b>	Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para TGF- $\beta$ 2 en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea.	88
<b>Figura 37</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 2 en células de la granulosa de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	89
<b>Figura 38</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 2 en células de la teca interna de varios tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	89

<b>Figura 39</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 2 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo control (C).	90
<b>Figura 40</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 2 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD inducida (IND).	90
<b>Figura 41</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 2 de los diferentes tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD espontánea (ESP).	91
<b>Figura 42</b>	Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para TGF- $\beta$ 3 en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea.	92
<b>Figura 43</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 3 en células de la granulosa de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados	93
<b>Figura 44</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 3 en células de la teca interna de varios tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	93
<b>Figura 45</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 3 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo control (C).	94
<b>Figura 46</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 3 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD inducida (IND).	94



<b>Figura 47</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 3 de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con COD espontánea (ESP).	94
<b>Figura 48</b>	Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para Activina en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea.	96
<b>Figura 49</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para Activina en células de la granulosa de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	97
<b>Figura 50</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para Activina en células de la teca interna de diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	97
<b>Figura 51</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para Activina de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo control (C).	98
<b>Figura 52</b>	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).	98
<b>Figura 53</b>	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).	99
<b>Figura 54</b>	Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para Inhibina en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea.	100
<b>Figura 55</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para Inhibina en células de la granulosa de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	100

<b>Figura 56</b>	Concentración de Inhibina B: A en suero y B: en líquido folicular de animales control (proestro) y con COD espontánea.	101
<b>Figura 57</b>	Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para Foliculostatina en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea.	102
<b>Figura 58</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para foliculostatina en células de la granulosa de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	103
<b>Figura 59</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para Foliculostatina en células de la teca interna de diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	104
<b>Figura 60</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para Foliculostatina de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo Control (C).	104
<b>Figura 61</b>	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).	105
<b>Figura 62</b>	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).	105
<b>Figura 63</b>	Porcentaje de expresión detectada por western blot en pared completa para cada una de las isoformas de Foliculostatina en diferentes folículos terciarios (FP: Folículo Pequeño, FM: Folículo Mediano, FG: Folículo Grande) y quistes (Q: Quistes).	106

<b>Figura 64</b>	Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para el TGF- $\beta$ RI en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea.	108
<b>Figura 65</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ RI en células de la granulosa de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	109
<b>Figura 66</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ RI en células de la teca interna de diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	109
<b>Figura 67</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ RI de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo control (C).	110
<b>Figura 68</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ RI de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo Inducido (Ind).	110
<b>Figura 69</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ RI de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo Espontáneo (ESP).	111
<b>Figura 70</b>	Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para el TGF- $\beta$ RIII en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea.	112
<b>Figura 71</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ RIII en células de la granulosa de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	113

<b>Figura 72</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ RIII en células de la teca interna de diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	113
<b>Figura 73</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ RIII de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo control (C).	114
<b>Figura 74</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ RIII de diferentes categorías foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo COD inducida (IND).	114
<b>Figura 75</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ RIII de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo con COD Espontánea (ESP).	115
<b>Figura 76</b>	Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para el ACTRIIB en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea.	116
<b>Figura 77</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para ACTRIIB en células de la granulosa de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	117
<b>Figura 78</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para ACTRIIB en células de la teca interna de diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados.	117
<b>Figura 79</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para ACTRIIB de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo control (C).	118

<b>Figura 80</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para ACTRIIB de diferentes categorías foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo Inducido (IND).	118
<b>Figura 81</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para ACTRIIB de diferentes categorías foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciario ) del grupo Espontáneo (ESP).	119
<b>Figura 82</b>	Folículos terciarios y persistentes inmunomarcados para Activina en animales de los grupos control y persistencia inducida a los 5, 10 y 15 días.	120
<b>Figura 83</b>	<b>A:</b> Porcentaje de área inmunomarcada para Activina en células de la granulosa de diferentes categorías foliculares y pertenecientes a diferentes grupos (TC: Terciarios Controles; T5: Terciarios de 5 días de Persistencia, T10: Terciarios de 10 días de Persistencia, T15: Terciarios de 15 días de Persistencia; P5: Persistentes de 5 días, P10: Persistentes de 10 días, P15: Persistentes de 15 días). <b>B:</b> Evolución de la inmunomarcación a lo largo de la persistencia.	121
<b>Figura 84</b>	<b>A:</b> Porcentaje de área inmunomarcada para Activina en células de la teca interna de diferentes tipos foliculares y pertenecientes a distintos grupos (TC: Terciarios Controles; T5: Terciarios de 5 días de Persistencia, T10: Terciarios de 10 días de Persistencia, T15: Terciarios de 15 días de Persistencia; P5: Persistentes de 5 días, P10: Persistentes de 10 días, P15: Persistentes de 15 días) <b>B:</b> Evolución de la inmunomarcación a lo largo de la persistencia.	121
<b>Figura 85</b>	Folículos terciarios y persistentes inmunomarcados para Inhibina en animales de los grupos control y persistencia inducida a los 5, 10 y 15 días. La barra corresponde a 25 $\mu$ m. G: granulosa; T: Teca interna.	122

<b>Figura 86</b>	Porcentaje de área inmunomarcada para Inhibina en células de la granulosa de varios tipos foliculares y pertenecientes a diferentes grupos (T: folículos terciarios; P: folículos persistentes; C: Control; 5: 5 días de persistencia, 10: 10 días de persistencia, 15: 15 días de persistencia). <b>B:</b> Evolución de la inmunomarcación a lo largo de la persistencia.	122
<b>Figura 87</b>	Representación de la concentración de Inhibina B. <b>A:</b> en líquido folicular y <b>B:</b> en suero proveniente de folículos controles y con persistencia inducida a los 5, 10 y 15 días.	123
<b>Figura 88</b>	Folículos terciarios y persistentes inmunomarcados para Foliculostatina en animales de los grupos control y persistencia inducida a los 5, 10 y 15 días.	124
<b>Figura 89</b>	<b>A:</b> Porcentaje de área inmunomarcada para Foliculostatina en células de la granulosa de los tipos foliculares pertenecientes a distintos grupos (TC: Terciarios Controles; T5: Terciarios de 5 días de Persistencia, T10: Terciarios de 10 días de Persistencia, T15: Terciarios de 15 días de Persistencia; P5: Persistentes de 5 días, P10: Persistentes de 10 días, P15: Persistentes de 15 días). El numeral (#) indica diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre las estructuras señaladas según corresponda. <b>B:</b> Evolución de la inmunomarcación a lo largo de la persistencia.	124
<b>Figura 90</b>	<b>A:</b> Porcentaje de área inmunomarcada para Foliculostatina en células de la teca interna de los tipos foliculares pertenecientes a diferentes grupos y a diferentes estructuras foliculares (TC: Terciarios Controles; T5: Terciarios de 5 días de Persistencia, T10: Terciarios de 10 días de Persistencia, T15: Terciarios de 15 días de Persistencia; P5: Persistentes de 5 días, P10: Persistentes de 10 días, P15: Persistentes de 15 días). El numeral (#) indica diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre las estructuras señaladas. <b>B:</b> Evolución de la inmunomarcación a lo largo de la persistencia.	125

- Figura 91** Folículos terciarios y persistentes inmunomarcados para TGF- $\beta$ I en animales de los grupos control y persistencia inducida a los 5, 10 y 15 días. La barra corresponde a 25  $\mu$ m. G: granulosa; T: teca interna. 126
- Figura 92** **A:** Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 1 en células de la granulosa de los tipos foliculares pertenecientes a diferentes estructuras y a los distintos grupos (TC: Terciarios Controles; T5: Terciarios de 5 días de Persistencia, T10: Terciarios de 10 días de Persistencia, T15: Terciarios de 15 días de Persistencia; P5: Persistentes de 5 días, P10: Persistentes de 10 días, P15: Persistentes de 15 días). El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las estructuras señaladas. **B:** Evolución inmunomarcación a lo largo de la persistencia. 126
- Figura 93** **A:** Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 1 en células de la teca interna de los tipos foliculares pertenecientes a diferentes grupos (TC: Terciarios Controles; T5: Terciarios de 5 días de Persistencia, T10: Terciarios de 10 días de Persistencia, T15: Terciarios de 15 días de Persistencia; P5: Persistentes de 5 días, P10: Persistentes de 10 días, P15: Persistentes de 15 días). **B:** Evolución de la inmunomarcación a lo largo de la persistencia. El asterisco (\*) y el numeral (#) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las estructuras señaladas. 127

## ***RESUMEN***





La producción de ovocitos y la secreción hormonal en los ovarios, determinan la eficiencia reproductiva y en consecuencia, productiva de bovinos de leche y carne. La progresión a través del desarrollo folicular requiere de una comunicación entre el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca; y en dicho intercambio de información participan integrantes de la superfamilia del TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante- $\beta$ ). El presente estudio fue diseñado para determinar la localización celular específica y expresión de los integrantes del sistema activina/inhibina/foliculostatina, de las isoformas del TGF- $\beta$  y los receptores que podrían participar en la enfermedad quística ovárica en bovinos y en la persistencia folicular asociada. El desarrollo de los modelos experimentales resultó apropiado para el estudio de los estadios iniciales de la enfermedad así como el desarrollo de la persistencia encontrándose algunas diferencias entre los modelos y los casos espontáneos, las cuales podrían explicarse principalmente por el tiempo de persistencia. Se demostró que existe un posible efecto de activina, foliculostatina e inhibina como moduladores de la producción de hormonas esteroides, balance proliferación/apoptosis y diferenciación celular descritas previamente en ovarios quísticos. Conociendo la fuerte justificación económica para desarrollar medidas preventivas y tratamientos para las alteraciones foliculares, los resultados obtenidos en esta tesis aumentan el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad quística ovárica y los mecanismos involucrados en la persistencia folicular proveyendo una invaluable herramienta para estudios adicionales así como para la evaluación de medidas preventivas y terapéuticas.

## ***ABSTRACT***



The production of oocytes and ovarian hormone secretion, determine the reproductive efficiency and consequently productive efficiency in dairy and beef cattle. Progression through the follicular development requires a communication between the oocyte, granulosa cells and theca cells. In the exchange of information between these cells are involved members of the TGF- $\beta$  superfamily (transforming growth factor- $\beta$ ). The present study was designed to determine the specific cellular localization and expression of the members of the activin/inhibin/folistatin system and isoforms of TGF- $\beta$  and receptors who could participate in ovarian cystic disease in cattle and in the follicular persistence associated. The development of the experimental models was appropriate for the study of the early stages of the disease and the development of persistence found some differences between models and spontaneous cases, which could be explained mainly by the persistence time. We showed that there is a potential effect of activin, inhibin and folistatin as modulators of steroid hormone production, balance proliferation/apoptosis and cell differentiation previously described in cystic ovaries. Knowing the strong economic justification for developing preventive measures and treatments for follicular disorders, the results obtained in this thesis increase the knowledge of the pathogenesis of cystic ovarian disease and the mechanisms involved in the follicular persistence providing an invaluable tool for additional studies and for the evaluation of preventive and therapeutic actions.

# *1. INTRODUCCIÓN*



### 1.1. HISTOFISIOLOGÍA OVÁRICA

El ovario es una combinación de glándula exocrina y endocrina, es decir, produce tanto ovocitos (secreción exocrina) como hormonas ováricas, principalmente estrógenos y progesterona (secreción endocrina) (Dellmann y Priedkalns, 1993). La estructura del ovario normal varía enormemente con la especie, la edad y la fase del ciclo sexual (Hafez y Hafez, 2004). En el bovino, esta glándula está constituida por una médula interna y una corteza externa. La médula (zona vascular) es el área interior en la que están contenidos los nervios, un gran número de vasos sanguíneos grandes y arrollados y los vasos linfáticos (Dellmann y Eurell, 1998). La corteza o estroma cortical (zona avascular) se compone de tejido conectivo denso donde se localizan los folículos en distintos estadios de desarrollo, cuerpos hemorrágicos, cuerpos lúteos y cuerpos blancos (Frandsen y Spurgeon, 1995).

El folículo es una unidad fisiológica equilibrada cuyo funcionamiento y estructura dependen de factores extracelulares como las gonadotrofinas, las que llevan a una sucesión de transformaciones subcelulares y moleculares de diversos componentes del folículo: el ovocito, las células de la granulosa y de la teca (Hafez y Hafez, 2004).

#### 1.1.1. Clasificación y desarrollo folicular

Los folículos primordiales se componen de un único ovocito primario rodeado por una capa simple circundante de células epiteliales aplanadas, estas se denominan células foliculares. Estos folículos surgen prenatalmente, como consecuencia de la proliferación mitótica de las masas celulares epiteliales internas de la corteza ovárica (Dellmann y Priedkalns, 1993). 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 y Skinner, 2001). Cuando algunos de estos folículos primordiales inician su maduración, sus células foliculares se transforman de un epitelio plano simple a uno cúbico, dando lugar a los denominados folículos primarios (Priedkalns, 1993).

## 1. Introducción

La transformación del folículo primario a folículo secundario implica diversos cambios en las células foliculares que rodean al ovocito, entre los que se destacan la intensa división mitótica y la consiguiente estratificación paulatina del epitelio que originalmente era simple. En este momento las células pasan a denominarse granulosa. Los folículos preantrales se caracterizan por el desarrollo de la zona pelúcida (ZP), una capa glicoproteica de 3 a 5 mm de espesor, que se sitúa alrededor de la membrana plasmática del ovocito. Hacia el final de la fase de folículo preantral, comienza a formarse alrededor de la capa de células de la granulosa, una capa multilaminar vascularizada de células alargadas (en forma de huso), denominadas células de la teca. Conforme crecen y proliferan las células granulosa y teca, el folículo va aumentando notablemente su tamaño y empiezan a aparecer cúmulos de líquido entre las células de la granulosa, que van confluyendo a la vez que aumentan de tamaño, y dan lugar a una cavidad central llena de líquido (folicular) denominada antro. Estas transformaciones dan lugar a los folículos terciarios (multilaminares, antrales y en crecimiento) o también llamados folículos de De Graaf, en los que el ovocito ocupa una posición excéntrica rodeado de dos o tres capas de células granulosa, que componen el denominado cúmulo ovífero (Dellmann y Eurell, 1998). En la figura 1 se demuestran las principales categorías de folículos (Adaptación de Roos y col. 2004).

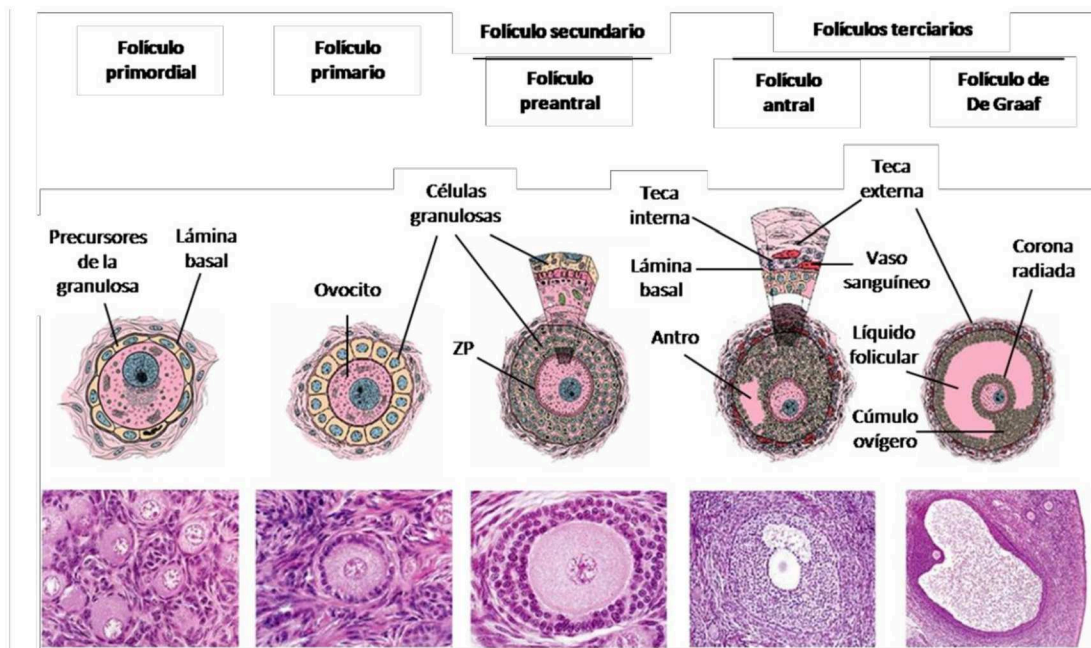


Figura 1: Principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento con sus componentes. (Adaptado de Ross y col., 2004).

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 grandes folículos terciarios, 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 y Eurell, 1998).

### 1.1.2. Regulación del crecimiento folicular

La reproducción en las hembras constituye un proceso cíclico estrictamente regulado por la interacción del hipotálamo, la hipófisis y los ovarios. Con respecto al control neuroendocrino, el sistema nervioso y el sistema endócrino, funcionan para iniciar, coordinar o regular las funciones del sistema reproductor. El hipotálamo une los dos sistemas a partir del sistema porta hipotalámico-hipofisario para coordinar las funciones de las gónadas. El sistema nervioso desempeña una función esencial en la regulación de la actividad de las gónadas por medio de mecanismos de retroalimentación endocrina, vías neurales y control inmunoendocrino (Hafez y Hafez., 2004). La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) de origen hipotalámico, proporciona un enlace entre los sistemas neural y endocrino. Los cambios en las tasas de síntesis y liberación de GnRH, así como la velocidad de degradación de la misma, son factores que modifican la biosíntesis y liberación de hormonas gonadotróficas desde la hipófisis anterior. La GnRH es sintetizada en núcleos de la zona preóptica del hipotálamo y luego transportada a través de sus axones terminales a la eminencia media hipotalámica, para ingresar a la circulación portal y ser liberada en la adenohipófisis. La GnRH se une a los receptores presentes en las células gonadotrofas hipofisarias regulando, de esta manera, la secreción de Hormona Luteinizante (LH) y de Hormona Folículoestimulante (FSH). En respuesta a señales neurales, se libera GnRH de manera pulsátil hacia el sistema portal hipofisario para la liberación “en pulsos” de LH y FSH desde la hipófisis anterior.

## 1. Introducción

En definitiva, debe existir un complejo sistema regulatorio para determinar qué folículos son seleccionados. A pesar de encontrarse bien establecido que la función ovárica es regulada principalmente por las gonadotrofinas pituitarias: FSH, LH y sus receptores: Recetor de Homona Foliculoestimulante (FSHR) y Receptor de Hormona Luteinizante (LHR), es evidente que factores producidos localmente como hormonas esteroides, factores de crecimiento y moléculas asociadas ejercen roles moduladores esenciales en el desarrollo folicular y en la ovulación (Fortune y col. 1988). Las hormonas ováricas ejercen un efecto estimulador (retroalimentación positiva) e inhibitor (retroalimentación negativa) sobre el eje hipotálamo-hipofisario, determinando dos tipos de secreciones de gonadotrofinas: tónica, manteniendo niveles basales; y cíclica, produciendo un aumento rotundo de los niveles, en un momento determinado del ciclo reproductivo. Además, algunos péptidos gonadales estimulan (especialmente activinas) o inhiben (inhibinas, foliculostatina) la secreción de FSH a nivel hipofisario (Hillier, 2001; Knight y Glister 2001). Este sistema de regulación es denominado eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y se muestra de manera esquemática en la figura 2.

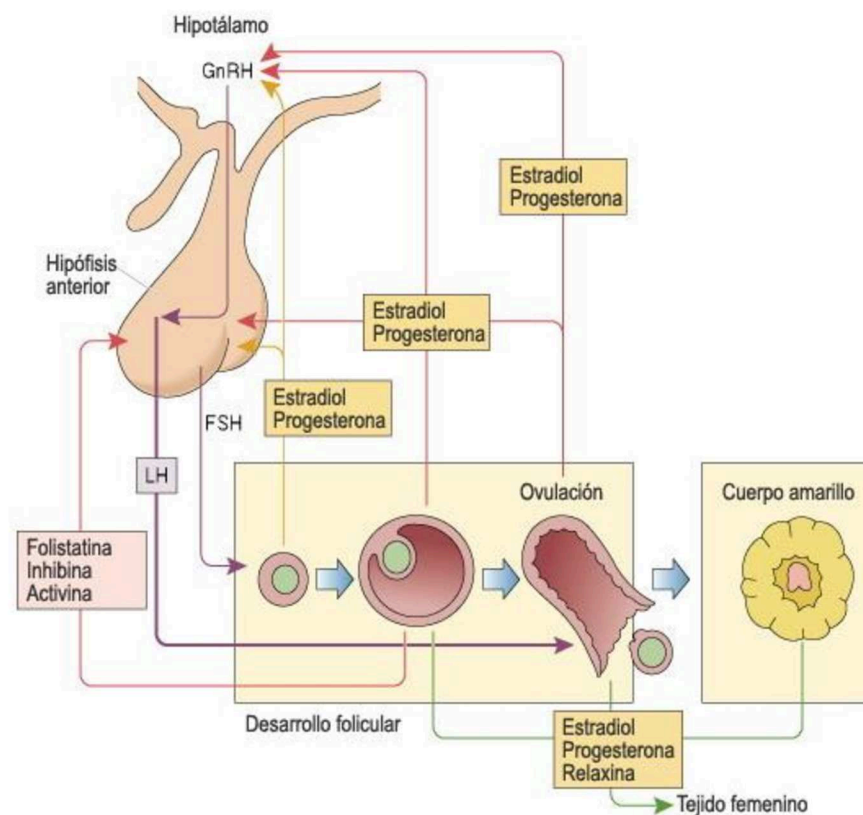


Figura 2: Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo hipofisario y el ovario. (Gartner y Hiatt, 1997).



El crecimiento y la maduración folicular, la ovulación y luteinización, son procesos integrados que abarcan señales extraováricas, tales como concentraciones suficientes y proporcionadas de hormonas metabólicas y gonadotróficas, así como factores intraováricos. Existen evidencias de que la foliculogénesis es independiente de la FSH hasta la etapa en que se forma el antro folicular, ya que la fase inicial de la misma es regulada por otros factores locales. Entre ellos se pueden destacar al factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9), proteínas morfogénicas óseas (BMPs), activinas, inhibinas, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento epidermal (EGF) y el receptor del factor análogo a insulina tipo 1 (IGFR1). (Hafez y Hafez, 2004; Armstrong y col., 2002; Diskin y col., 2003; Webb y Campbell, 2007). En este sentido, si bien la presencia de FSH no es un requerimiento esencial, los folículos antrales están bajo el control de esta gonadotropina dado que, sin el aumento transitorio de la misma, no hay emergencia de la onda folicular (Adams, 1999; Eppig, 2001; Webb y Campbell, 2007).

Las concentraciones tónicas de FSH y de LH son controladas por retroalimentación endocrina negativa desde las gónadas. La frecuencia y amplitud de los pulsos de LH están influenciadas por las concentraciones circulantes de progesterona y 17  $\beta$ -estradiol. El principal efecto del 17  $\beta$ -estradiol es inhibir la liberación de FSH hipofisaria, conjuntamente con otros factores como factores de crecimiento análogos a insulina (IGFs), inhibina y foliculostatina, que sinergizan el efecto del 17  $\beta$ -estradiol (Wiltbank y col., 2002; Ortega y col., 2008; Adams y col., 2008; Rey y col., 2010; Rodriguez y col., 2011). La FSH, como se mencionó anteriormente, ejerce una función importante en el inicio de la formación de la cavidad antral. 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 así como de enzimas esteroidogénicas (citocromo P450 aromataasa, 3  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa) que ocurren en este estadio del desarrollo folicular y en cada uno de los estratos celulares que integran los folículos (Bao y Garverick, 1998; Webb y col., 1999; Zurvarra y col., 2009; Pretheeban y col., 2010; Alfaro y col., 2012). Por otro lado, las concentraciones séricas basales de LH, interaccionan con los receptores gonadotróficos presentes en las células de la teca interna de los folículos antrales y estimulan la producción de andrógenos y pequeñas cantidades de estrógenos (principalmente 17  $\beta$ -estradiol). Estos andrógenos son

## 1. Introducción

secretados a los capilares o bien atraviesan la lámina basal para alcanzar la capa de células de la granulosa donde se produce su aromatización por acción de las enzimas esteroidogénicas. Al mismo tiempo, conforme avanza el desarrollo del folículo dominante, los niveles basales de LH actúan conjuntamente con la FSH en la estimulación de la secreción de estrógenos, dada la presencia de receptores de LH en las células de la granulosa de folículos maduros (Bodensteiner y col., 1996; Robert y col., 2003). Este aumento en el número total de 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 y col., 1994; Wiltbank y col., 2002; Mihm y Austin, 2002). El aumento en la concentración de estrógenos circulantes debido a la marcada actividad esteroidogénica 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. El folículo ovulatorio maduro alcanza un tamaño aproximado de 17 mm en la vaca. Luego de la ovulación, el folículo se retrae, dado que la presión del líquido folicular se reduce y mediante un plegamiento de la pared folicular que es muy notable, se forma lo que se conoce como cuerpo hemorrágico. Las células de la granulosa aumentan de tamaño, se multiplican bajo el influjo de la LH, y contribuyen a formar la población de células luteínicas grandes del cuerpo lúteo (CL). Las células de la teca interna, también contribuyen a la formación del mismo. La LH hace que las células de la granulosa y de la teca se conviertan en células lúteas (por hipertrofia e hiperplasia de las mismas) y produzcan progesterona, hormona necesaria para mantener la gestación. En la vaca, el CL está totalmente desarrollado y vascularizado a los nueve días de la ovulación, pero continúa creciendo hasta el duodécimo día, en el que alcanza, aproximadamente, un diámetro de 25 mm. La progesterona producida en altas concentraciones por dicha glándula, es esencial para el mantenimiento de la preñez temprana, inhibe la producción de gonadotrofinas a nivel hipotálamo-hipofisario, controlando mediante el sistema de retroalimentación, los niveles de LH (Day y Anderson, 1998) (figura 3).

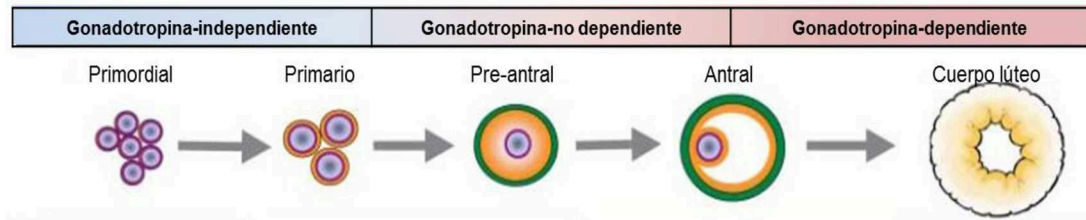


Figura 3: Progresión folicular a través de las sucesivas etapas de desarrollo y su respuesta a las gonadotropinas hipofisarias. (Adaptado de Knight y Glister, 2006).

### 1.1.3. Ciclo estral en bovinos

El ciclo estral dura de 17 a 25 días en vacas adultas y es definido como el intervalo entre el comienzo de un celo y el siguiente. La primera ovulación en la vida del animal, ocurre en la pubertad y marca el comienzo de un patrón rítmico de ciclicidad reproductiva (Senger, 2003). El ciclo es regulado por mecanismos endocrinos y neuroendocrinos; esto es, por hormonas hipotalámicas e hipofisarias (gonadotropinas) y por la acción de hormonas esteroides secretadas por los ovarios. Consiste de la fase folicular en la que se incluyen proestro y estro, y la fase luteal con metaestro y diestro (figura 4).

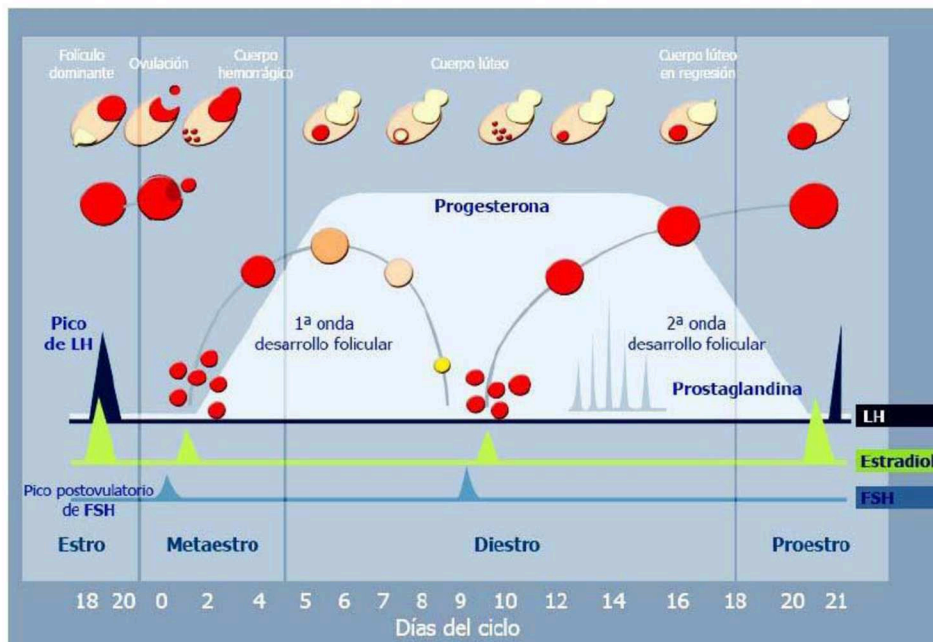


Figura 4: Diagrama del ciclo estral bovino mostrando los niveles hormonales en cada una de las etapas de las fases folicular y luteal (Adaptado de Enciclopedia Bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM)

## 1.1.3.1. Ondas foliculares

En el bovino existen varios miles de folículos ováricos, pero sólo un ovocito es liberado en cada ciclo estral. El proceso de crecimiento continuo y regresión de folículos antrales que conduce al desarrollo del folículo preovulatorio se conoce como dinámica folicular y se refiere al crecimiento de dichas estructuras en oleadas o grupos. Observaciones realizadas mediante ultrasonografía revelaron que el desarrollo de folículos ováricos durante el ciclo estral de la vaca ocurre en un patrón con forma de ondas (figura 5). El desarrollo y crecimiento de los folículos ováricos en rumiantes se caracteriza, según Savio y col. (1993) y Fortune y col. (1988) por el desarrollo de dos o tres ondas foliculares por ciclo y, según descubrimientos posteriores de Ginther y col. (1989) y Jainudeen y Hafez (2000), por una onda como mínimo y cuatro como máximo.

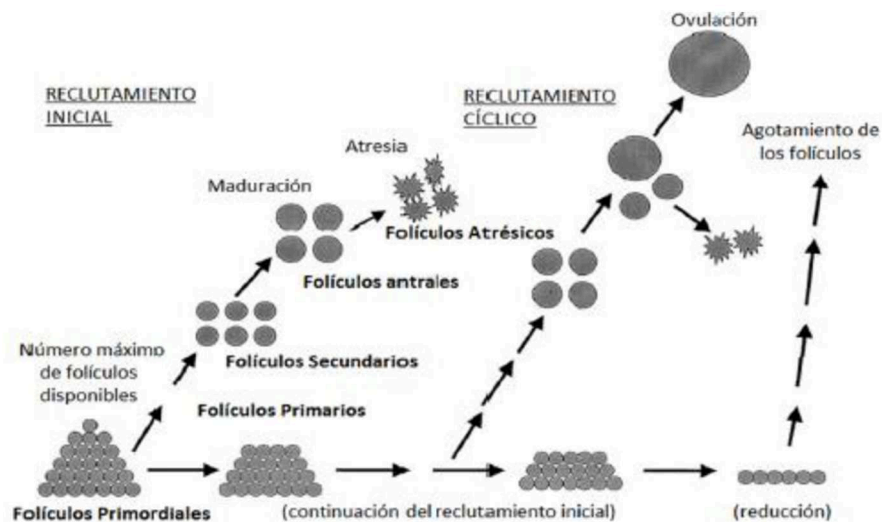


Figura 5: Esquema representativo del reclutamiento folicular. (Adaptado de McGee y Hsueh, 2000).

No se conoce con certeza qué factores influyen antes de la pubertad para que un folículo primordial deje la reserva y reinicie su crecimiento en un proceso denominado reclutamiento inicial. Sin embargo, se han señalado algunos factores de crecimiento, ciertas neurotrofinas y a la hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH) como inductores de dicho proceso. La etapa del reclutamiento conocida como reclutamiento cíclico, donde los folículos preantrales entran en el grupo de folículos de cada onda folicular, comienza casi inmediatamente después del nacimiento como resultado de los incrementos en la secreción de FSH de manera transitoria. Estos aumentos de FSH se registran antes de cada onda folicular ya en el periodo pre-púber

(Mihm y Austin, 2002; Espinoza-Villavicencio y col., 2007). Precisamente, el cambio hormonal más notable durante el ciclo estral es el pico de FSH que estimula la emergencia de cada onda folicular. El aumento inicial de FSH se ha asociado con la existencia de folículos de 1 a 3 mm de diámetro y el pico de mayor concentración de FSH es notable cuando el folículo mayor del grupo emergente alcanza los 4 mm de diámetro. Luego, los niveles de dicha gonadotropina disminuyen hasta concentraciones basales, pero el folículo dominante continúa creciendo, ya que es sensible a la LH; mientras que los subordinados, que son FSH dependientes, sufren atresia (Peter, 2004). Una onda de desarrollo folicular se puede definir como el desarrollo armónico y simultáneo de entre 8 y 40 folículos antrales pequeños de aproximadamente 3-4 mm de diámetro funcionando a través de estadios integrados de reclutamiento, selección y dominancia folicular (Adams y col., 2008). La emergencia, desviación y dominancia son los sucesos más relevantes de la onda folicular:

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

Desviación y selección folicular: un folículo es seleccionado a partir del grupo de folículos que emergieron y pasa a tener un crecimiento continuo hasta un tamaño preovulatorio, mientras los demás folículos de la onda (subordinados) regresan. La desviación en bovinos comienza con una reducción en la tasa de crecimiento de los folículos subordinados que contrasta con la tasa de crecimiento constante en el folículo dominante (Beg y col., 2002). El inicio de la desviación se da cuando el diámetro de los folículos mayores alcanzan los 8 mm (Peter y col., 2009). No obstante, el mecanismo de selección está determinado por mecanismos intraováricos. Como consecuencia, el folículo dominante expresa mayor número de receptores para LH que los subordinados en las células de la teca y además adquiere receptores de LH en las células de la

granulosa (que los subordinados no tienen). Por ello, es ampliamente aceptado que la LH está involucrada en el proceso de selección, ya que los sucesos de desviación de tamaño y aumento de LH ocurren simultáneamente (Adams y col., 2008). Por otro lado, la regresión de los folículos de menor tamaño es atribuida a una inadecuada concentración de FSH y carencia de receptores para esta gonadotropina en las células de la granulosa. En efecto, el folículo seleccionado incrementa la secreción de  $17\beta$ -estradiol lo que provoca la supresión de las concentraciones de FSH, y la consecuente atresia de los folículos subordinados.

Dominancia folicular: el máximo diámetro de los folículos dominantes, tanto de ondas ovulatorias como anovulatorias es aproximadamente 16 mm en *Bos taurus*. La naturaleza de la dominancia representa tanto aspectos fisiológicos (expresión de LHR en granulosa) como endocrinos del folículo dominante, que secreta grandes cantidades de  $17\beta$ -estradiol, los que sumados a la inhibina, generan un ambiente inhibitorio para el desarrollo de los folículos subordinados (Gigli y col., 2006). Algunos efectos autocrinos y paracrinos del  $17\beta$ -estradiol en células de la granulosa, incluyen un aumento en la actividad y expresión del ARNm de la enzima P450aromatasa (Gore-Langton y Armstrong, 1994), promoción de una mayor expresión de FSHR y LHR, por ende, un incremento de la sensibilidad a las gonadotropinas (Richards y col., 1979) y una mayor síntesis de IGFs (Hsu y Hammond, 1987). La participación del sistema IGF en el desarrollo folicular y en la selección del folículo dominante es relevante (Donadeu y Ginther, 2002). En bovinos, incrementa la producción de progesterona y  $17\beta$ -estradiol, aumenta la sensibilidad de las células de la granulosa al estímulo de la FSH, al mismo tiempo que estimula la proliferación y diferenciación de células de la granulosa y de la teca (Monget y Monniaux, 1995).

Cada onda folicular involucra el reclutamiento de una cohorte de folículos y la selección de un folículo dominante que continúa creciendo y madura en la etapa preovulatoria, mientras que folículos subordinados en la onda sufren atresia.

### 1.1.3.2. Atresia folicular

Un buen equilibrio entre la supervivencia y los factores apoptóticos puede determinar si un folículo continuará desarrollándose o sufrirá atresia (Robkers y Richards, 1998; Hsueh y col. 1994; Amsterdam y col. 2003). 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 y col., 1994; Quirk y col., 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 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 y Wysocki, 2009; Rodgers e Irving-Rodgers, 2010).

La progresión de la apoptosis en las células foliculares depende de la regulación cooperativa de diferentes factores autocrinos y paracrinos, y es probable que ninguno de esos factores sea requerido en el control del crecimiento del folículo y la muerte. La regulación de la señalización apoptótica es generalmente alcanzada por el sistema FAS y la familia Bcl-2 (Hsu y Hsueh, 2000; Hussein, 2005; Slot y col. 2006)

### **1.1.4. Conclusión de conceptos introductorios: Histofisiología ovárica**

Los folículos son las unidades funcionales del ovario y cada uno se compone por un ovocito rodeado por una o más capas de células somáticas. Para que su potencial esteroideogénico y ovulatorio se realice los folículos deben progresar a través de series eficientemente coordinadas de desarrollo (Eppig, 2001). La foliculogénesis es un proceso en el que el estrecho equilibrio en la secreción hormonal a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal permite el desarrollo normal del ciclo reproductivo en las hembras.

Los factores de crecimiento producidos localmente, tales como los sistemas de IGF y TGF- $\beta$  (inhibinas, activinas y BMPs), trabajan en conjunto con las gonadotropinas a lo largo del continuo crecimiento folicular. Las estrechas 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 y col., 2007).

Una serie de factores ambientales, como la nutrición y el estrés, pueden influir en el desarrollo folicular y la calidad de los ovocitos, y por consiguiente en la fertilidad (Garnsworthy y Webb, 1999; Webb y col., 1999, 2003). Cualquier factor que altere

## 1. Introducción

este delicado balance podría dar lugar a alteraciones en la fertilidad, conllevando al anestro, a estros silentes y a quistes ováricos (Salveti y col., 2007).



### 1.2. SUPERFAMILIA DEL TGF- $\beta$

#### 1.2.1. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son polipéptidos y proteínas semejantes a las hormonas, que actúan predominantemente en forma paracrina y autocrina, y participan en la promoción de la actividad mitogénica necesaria para la proliferación y remodelación del tejido local. Su mecanismo de acción consiste en provocar respuestas celulares mediante la unión a receptores específicos en la superficie celular en su tejido blanco (Hafez y Hafez, 2004). Existen diversas familias de factores de crecimiento con estructuras bioquímicas similares. En cuanto a sus funciones, los factores de crecimiento regulan diversas proteínas en el ciclo celular, y pueden tener un efecto directo o indirecto sobre la proliferación celular, aunque muchos estimulan la proliferación celular, unos pocos tienen funciones inhibitoras, tales como el TGF- $\beta$  (Lloyd, 1997). Además, son conocidos por desempeñar un papel esencial en la iniciación de la mitosis y son requeridos para una variedad de procesos celulares (Hajimiri y col., 2014).

Los análisis moleculares de los factores de crecimiento, incluyendo la clonación y secuenciación de los receptores específicos, han contribuido en gran medida a la comprensión de la función que estos factores juegan en la homeostasis celular y el desarrollo neoplásico (Lloyd, 1997).

#### 1.2.2. Roles orgánicos de la superfamilia del TGF- $\beta$

La superfamilia del TGF- $\beta$  es un grupo muy grande de proteínas multifuncionales que afectan diversos procesos celulares que van desde la regulación de la diferenciación, proliferación y migración celular, hasta procesos fisiológicos complejos como la inflamación y la cicatrización de tejidos, incluyendo también a la formación del hueso, entre otros. Además, alteraciones en sus señales pueden contribuir a la patogénesis de enfermedades tan diversas como las autoinmunes, la fibrosis y el cáncer (Sosa Garrocho y Macias Silva, 2004).

Varios miembros de esta superfamilia ejercen una destacada función en el desarrollo del sistema nervioso e incluso algunos están regulados por actividad neuronal. Por ejemplo, la expresión de TGF- $\beta$  durante el desarrollo de la neocorteza cerebral en mamíferos es

requerida para la diferenciación de los axones y definición de la polaridad de las neuronas in vivo e in vitro (Yi y col., 2010). Además de impulsar la sinaptogénesis, miembros de la superfamilia TGF- $\beta$  están implicados en la promoción de la transmisión excitatoria sináptica (Poon y col., 2013). Por otra parte, diversos miembros de esta familia son considerados importantes citoquinas con funciones reguladoras duales en el sistema inmune y en las respuestas frente a las infecciones virales (Karimi-Googheri y col., 2013).

En animales, existe gran cantidad de evidencia que sugiere un papel importante de muchos factores de crecimiento en la regulación ovárica tanto en condiciones normales y en algunos estados patológicos (Fortune y col., 2004.; Hunter y col., 2004). Se ha determinado claramente que la progresión a través de los sucesivos estadios de desarrollo folicular requiere de una comunicación bidireccional entre el ovocito y las células de la granulosa así como también entre estas últimas y las células de la teca (Eppig, 2001); y que en dicho intercambio de información participa la superfamilia del TGF- $\beta$  (Pfeffer y col., 2007; Webb y col., 2007).

### 1.2.3. Integrantes de la Superfamilia del TGF- $\beta$ : ligandos, receptores y correceptores

La superfamilia del TGF- $\beta$  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 y Wotton, 2000). A partir de sus características estructurales, los miembros de esta superfamilia han sido clasificados a su vez en otras subfamilias:

- Subfamilia TGF- $\beta$ : comprende TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, y TGF- $\beta$ 3.
- Subfamilia BMP: con más de 20 miembros.
- Subfamilia GDF: con al menos 9 miembros.
- Subfamilia GDNF.
- Miembros adicionales como por ejemplo AMH.
- Subfamilia Activina/Inhibina: incluye activinas A, AB, B e inhibinas A y B.

La mayor parte de los miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$ , exceptuando a la subfamilia de GDF e inhibina, realizan sus acciones a través de la unión a dos tipos de **receptores** de membrana (designados como tipo I y tipo II), formando complejos hetero-tetraméricos. En los mamíferos existen 7 subtipos de receptores de tipo I, y 5 subtipos de tipo II asociados con la transducción de la señal de los ligandos de la superfamilia de TGF- $\beta$  (Glister y col. 2006; Knight y Glister, 2006).

Un grupo adicional de moléculas de superficie celular, que incluye a  $\beta$ -glicanos (conocidos como receptores TGF- $\beta$  tipo III) pueden actuar como **proteínas de unión o correceptores** para ciertos ligandos de la superfamilia de TGF- $\beta$  (Lewis y col., 2000). Existen otras proteínas de secreción (foliculostatina, nogina, cordina, gremlina) y de membrana (BAMBI) capaces de modular la señalización de los miembros de TGF- $\beta$ . La  $\alpha$ 2-macroglobulina es una glicoproteína de 720 kDa y constituye la segunda proteína de unión para las inhibinas y activinas. Mientras algunas de las proteínas de unión antes mencionadas disminuyen la disponibilidad del ligando impidiendo su interacción con los receptores, en otras oportunidades (particularmente cuando la afinidad es menor) facilitarían la presentación del ligando manteniendo elevadas concentraciones del mismo en las proximidades de la superficie celular (Sugino y col., 1993).

### 1.2.3.1. Subfamilia del TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3

En mamíferos, la familia de los TGF- $\beta$  está compuesta por tres isoformas con alto nivel de homología, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, y TGF- $\beta$ 3, codificadas por genes diferentes y que son secretadas por diversos tipos celulares. Así, los TGF- $\beta$ s regulan procesos de proliferación, diferenciación, motilidad y senescencia celular. También juegan un papel muy importante en diversos procesos biológicos como la embriogénesis, la cicatrización, la respuesta inmune y la apoptosis (Letterio y Roberts, 1998; Dobaczewski y col., 2011). La desregulación de sus rutas de señalización está implicada en diversas enfermedades sistémicas como el cáncer, enfermedades autoinmunes y cardiovasculares (Attisano y Wrana, 2002).

A pesar de su alta homología, estudios en animales deficientes en cada una de estas isoformas muestran que alguna de sus funciones no son redundantes (Annes y col., 2003; Goumans y Mummery, 2000). El TGF- $\beta$ 1 está involucrado en hematopoyesis, en

la diferenciación endotelial y en procesos de inflamación (Dickson y col., 1995; Kulkarni y col., 1993; Letterio y col., 1996; Shull y col., 1992). Además, desempeña la función más relevante en el sistema inmunitario, en particular en el control de la proliferación, activación y diferenciación de las células T (Gil y Galindo Izquierdo, 2014). El TGF- $\beta$ 2 afecta al desarrollo del corazón, pulmón, extremidades, ojos, oídos y sistema urogenital (Sanford y col., 1997). En cambio, TGF- $\beta$ 3 influye en la palatogénesis y el desarrollo pulmonar (Kaartinen y col., 1995; Proetzel y col., 1995). La isoforma que ha servido como modelo preferente para estudiar los mecanismos de activación de receptores por ligando y las vías de señalización es TGF- $\beta$ 1. Ratones mutantes para TGF- $\beta$ 1 evidencian respuestas inflamatorias multiorgánicas severas, además de tener una letalidad embrionaria del 50%. Por otra parte, mutaciones en las otras dos isoformas resultan en un 100% de letalidad embrionaria (Dickson y col., 1995, Sanford y col., 1997, Kaartinen y col., 1995).

La funcionalidad de TGF- $\beta$ 1 y sus receptores es fundamental en el proceso de cicatrización de heridas, reclutando células inflamatorias en el sitio de la injuria, promueve la expresión de componentes claves en la gradual formación del tejido de granulación como la fibronectina, colágeno tipo I y III y factor de crecimiento de endotelios vasculares (VEGF). De manera similar a TGF- $\beta$ 1, el TGF- $\beta$ 2 está involucrado en el reclutamiento de fibroblastos y de células inmunes desde la circulación a los bordes del área herida. Estos acontecimientos conducen a la formación de tejido de granulación, angiogénesis y a la síntesis y secreción de colágeno (Barrientos y col., 2008). En cuanto a la isoforma TGF- $\beta$ 3, esta ha demostrado tener un efecto antagónico al de la TGF- $\beta$ 1, disminuyendo la formación de la cicatriz (Hosokawa y col., 2003; Waddington y col., 2010).

La expresión, localización y regulación de las distintas isoformas de TGF- $\beta$  en el ovario es extremadamente variable entre especies. Nilsson y col. (2003) demostraron mediante inmunohistoquímica y RT-PCR que, en bovinos, TGF- $\beta$ 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. Sin embargo, no se encontró expresión proteica en las células de la granulosa de folículos de mayor tamaño (3-5 o 5-10 mm) ni en células de la teca. En cambio, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 fueron encontrados 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- $\beta$ 3 alcanza mayores niveles que los ARNm codificantes para TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2,

tanto en granulosa como en teca. También, se observó que la expresión de ARNm para TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 fue mayor en células de la teca que en granulosa. Para TGF- $\beta$ 1, si bien la proteína no fue detectable por inmunohistoquímica en folículos de 3-5 o 5-10 mm de diámetro, el ARNm fue detectado en estos estadios de desarrollo folicular.

En cuanto a las funciones de los TGF- $\beta$ s sobre los componentes ováricos, diferentes reportes que detallan los efectos de este factor de crecimiento sobre células ováricas cultivadas in vitro suelen ser contradictorios y parece 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 y Glister, 2006).

### 1.2.3.2. Sistema activina, inhibina y foliculostatina

Las inhibinas y activinas son glicoproteínas diméricas cuyas subunidades están unidas por un enlace disulfuro. La subunidad  $\beta$  está presente en ambas. Sin embargo, la molécula de inhibina está formada, además, por una subunidad  $\alpha$ . La subunidad  $\alpha$  es única pero de la subunidad  $\beta$  existen dos formas:  $\beta$ A y  $\beta$ B. Es así que existen dos isoformas de inhibina de acuerdo a la subunidad  $\beta$  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  $\beta$  que la inhibina. Existen tres isoformas de acuerdo a la combinación de las 2 subunidades  $\beta$ : la activina A ( $\beta$ A  $\beta$ A), la activina B ( $\beta$ B  $\beta$ B) y la activina AB ( $\beta$ A  $\beta$ B) (Hafez y Hafez, 2000; Bleach y col., 2001; Ethier y Findlay, 2001). Existe escasa 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 otro lado, la foliculostatina es una glicoproteína monomérica rica en cisteína que no está relacionada estructuralmente con la superfamilia TGF- $\beta$ , 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 y Glister, 2001). Se han podido identificar 5 isoformas de foliculostatina las cuales presentan distinta afinidad de unión a la activina (Glister y col., 2006). La foliculostatina es una de las más representativas y caracterizadas de estas proteínas (Welt y col., 2002; Lin y

col., 2003). Constituye una de las dos proteínas de unión de activinas e inhibinas (junto con la  $\alpha 2$ -Macroglobulina), posee elevada afinidad por la activina y neutraliza sus efectos biológicos sobre la hipófisis. Este último efecto es similar al producido por las inhibinas (De Paolo y col., 1991; Kumanov y col., 2005). También se ha demostrado su unión a otros miembros de la superfamilia TGF- $\beta$ , incluyendo a BMP-2,- 4,- 7 y -15 pero con baja afinidad (10% o menos de la que se ha demostrado para activina) (Otsuka y col., 2001a; Glister y col., 2004).

Las células de la granulosa son la principal fuente de inhibina en la hembra, donde su función principal es la regulación de la retroalimentación negativa de la secreción de FSH hipofisaria. La activina es producida por una amplia variedad de tejidos extra gonadales, además de células de la granulosa y ovarios, para actuar como moléculas de señalización locales autocrinas y paracrinas. Inhibina y activina se acumulan en altas concentraciones en el fluido folicular de los folículos antrales siendo importantes productos de secreción de células de la granulosa que expresan abundantemente los genes que codifican sus subunidades (Knight y col. 2012).

La presencia de este sistema en las distintas etapas de la evolución folicular se expresan de manera muy gráfica en la figura 6. En un estudio realizado para determinar la actividad endocrina de cultivos de folículos antrales tempranos aislados de ratas prepúberes tratadas con dietilbestrol, se demostró que la FSH y el microambiente folicular de esteroides modulan diferencialmente la expresión de genes de las subunidades de la inhibina y la activina, su ensamblaje y su secreción (Andreone y col. 2009). 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, esteroidogénesis, maduración del ovocito, ovulación y función del CL (Knight y Glister, 2001)

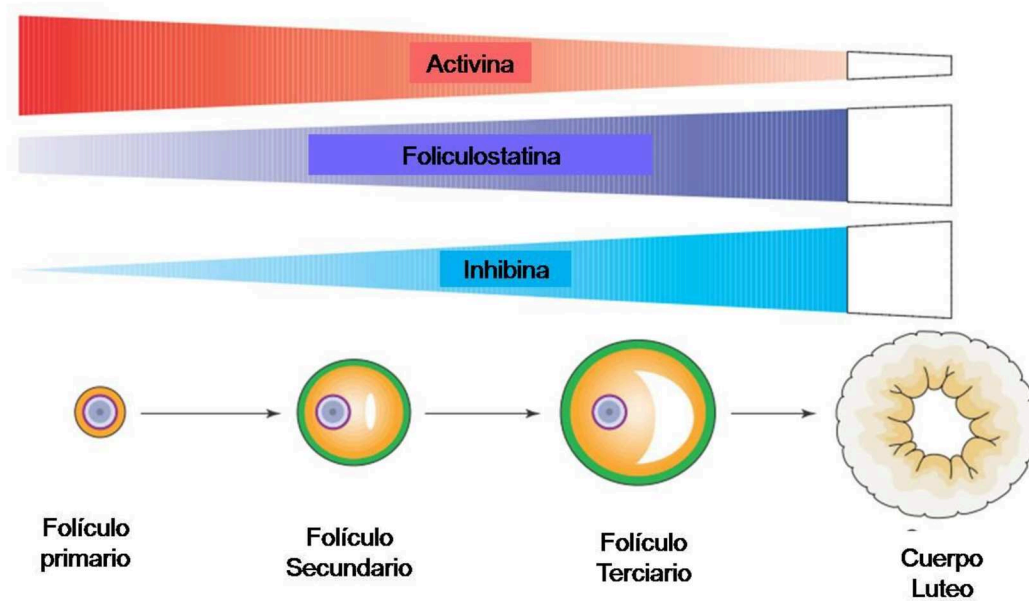


Figura 6: Diagrama esquemático que relaciona los cambios de expresión (en células de la granulosa) de inhibina, activina y foliculostatina de acuerdo con las diferentes etapas de desarrollo folicular y sus funciones reguladoras a nivel intraovárico y periférico. (Adaptado de Knight y Glister, 2001).

### 1.2.3.3. Receptores

Los receptores a los que se unen los ligandos de la superfamilia TGF- $\beta$  están divididos en dos grupos: **tipo I** y **tipo II**. La distinción entre los dos tipos de receptores está basada en la secuencia de conservación en sus dominios quinasa y la presencia de un dominio de membrana rico en glicina y serina. Los receptores tipo I han sido denominados Activin like kinasa (ALKs) (ten Dijke y col. 1993; ten Dijke 1994) y los receptores de tipo II de acuerdo con sus interacciones ligando dominantes. En la tabla 1, están representados los diferentes receptores y sus correspondientes ligandos. Los tipo I son clasificados de acuerdo a las similitudes de secuencia, el grupo ALK5 que incluye al receptor I de TGF- $\beta$ , ALK5, el receptor de activina ALK4 y al receptor Nodal ALK7. El grupo ALK3 comprende los receptores tipo I para BMP ALK3 y ALK6. Dentro del grupo ALK1, ALK1 y ALK2 interactúan con diferentes BMP /GDF y ligandos de la familia TGF- $\beta$ /activina. Los receptores tipo II incluyen: los receptores para TGF- $\beta$  (TGF $\beta$ -RII), para activina (ACVRII y ACVRIIB) y para BMPs (BMPRII y BMPRIIB) y el receptor tipo II para la hormona anti-mulleriana (AMHRII) (Zhao, 2003; Chang y col., 2001; Knight y Glister, 2003).

Las isoformas TGF- $\beta$  se unen a los receptores TGF- $\beta$  tipo II, estos a su vez reclutan a los receptores TGF- $\beta$  tipo I resultando en la trans-fosforilación del receptor de tipo I y la activación de señales corriente abajo. Un mecanismo similar ocurre con la activina que se une al receptor tipo II y a su vez recluta al receptor tipo I ALK4 (Attisano y col., 1996; Willis y col., 1996; Knight y Glistler, 2003).

<i>Receptores</i>	<i>Ligandos</i>
<i>Tipo I</i>	
<b>Grupo ALK 1</b>	
<i>ALK1</i>	<i>TGF-<math>\beta</math>, Activina -A</i>
<i>ALK2</i>	<i>TGF-<math>\beta</math>, Activina -A, MIS, BMP6/7</i>
<b>Grupo ALK 3</b>	
<i>ALK3</i>	<i>BMP2/4, BMP6/7</i>
<i>ALK6</i>	<i>BMP2/4, BMP6/7, GDF5/6, GDF9b, MIS</i>
<b>Grupo ALK 5</b>	
<i>ALK4</i>	<i>Activina A, GDF1, Nodal, GDF11</i>
<i>ALK5</i>	<i>TGF-<math>\beta</math></i>
<i>ALK7</i>	<i>Nodal</i>
<i>Tipo II</i>	
<i>TGF<math>\beta</math>-RII</i>	<i>TGF-<math>\beta</math></i>
<i>BMPRII</i>	<i>Inhibina A con TGF<math>\beta</math>RIII, BMP2/4, BMP6/7, GDF5/6, GDF9b</i>
<i>Act RII</i>	<i>Activina A, Inhibina A/B, Nodal, GDF1, BMP2/6/7, GDF 5, GDF 9B, GDF8/11</i>
<i>Act RIIB</i>	<i>Activina A, Inhibina A/B, Nodal, BMP2/6/7, GDF 5, GDF8/11</i>
<i>MISRII</i>	<i>MIS</i>

Tabla 1: Representación de los grupos que incluyen a los distintos receptores y sus ligandos. (Adaptación de Caestecker, 2004).

### 1.2.3.3.1. Activación del receptor

La activación del receptor por fosforilación del dominio quinasa intracelular, conduce a la fosforilación de moléculas de señal corriente abajo denominadas SMADS, reguladas por receptor (R-SMADS). Dichas moléculas modulan la expresión génica a través de interacciones con diversos factores de transcripción, los coactivadores y correpresores (Glistler y col., 2006; Knight y Glistler, 2006).

La señalización de TGF- $\beta$  mediada por proteínas SMADS representa una cascada de señalización muy conservada. En vertebrados se han descrito 9 proteínas SMAD diferentes (Raftery y col., 1995; Savage y col., 1996; Heldin y col., 1997) que se clasifican en 3 familias en base a su función celular:



## 1. Introducción

- R-SMADS (receptor-activated SMADS): Smad 1, 2, 3, 5 y 8. Estos SMADS son sustratos de fosforilación de los receptores tipo I: smad 2/3 son fosforilados por receptores de TGF- $\beta$ s y Activinas, y smad1/5/8 por receptores de BMPs (Macias-Silva y col., 1996; Zhang y col., 1996; Chen y col., 1997).

- Co-SMADS (co-mediator SMADS): Smad 4 y 10, que oligomerizan con R-SMADS activados para formar complejos que se translocarán al núcleo para modular la transcripción de genes diana (Derynck y col., 1998; Massague, 1998; Heger y col., 2009).

- I-SMADS (inhibitory-SMADS): Smad 6 y 7, que inhiben la señalización de TGF- $\beta$  o BMP por competición con R-SMADS por la interacción con el receptor tipo I y mediante la captación de fosfatasas y ubiquitin-ligasas (Itoh y Ten Dijke, 2007; van Meeteren y Ten Dijke, 2011). También compiten con Smad4 (Shi y Massagué, 2003). Smad7 inhibe preferentemente la vía de TGF $\beta$ s, mientras que Smad6 actúa sobre la vía de BMPs (Derynck y Akhurst, 2007; Santibanez y col., 2011).

A diferencia de receptores treonina quinasa, en los que la activación es inducida por la fosforilación de un elemento estructural central dentro del dominio quinasa (Johnson y col., 1996), la activación de los receptores TGF- $\beta$  tipo I resulta de la fosforilación de serina por el receptor quinasa tipo II dentro de la caja GS inmediatamente “corriente arriba” del dominio catalítico (Attisano y col. 1996; Wrana y col. 1992; Liu y col., 1995; Wrana y col., 1994). Estos eventos de fosforilación están asociados con un cambio conformacional en la caja GS que normalmente forman un complejo inhibitorio en el dominio quinasa de un receptor tipo I inactivo permitiendo la activación corriente abajo de sustratos de los receptores activados R-SMADS (Huse y col., 1999; Huse y col., 2001). La activación basal del dominio quinasa del receptor tipo I es regulado mediante la interacción con una proteína represora, la FK506-binding protein (FKBP12), que se une a la caja de GS no fosforilada capacitando la fosforilación de sitios del receptor tipo II y estabilizando al receptor en una conformación inactiva (Wang y col., 1996; Huse y col., 1999). Además, la fosforilación dependiente de ligandos de los R-SMADS es inhibida por competencia directa en el sitio de unión al receptor por las SMAD6 y SMAD7 (Wang y col., 1996; Nakao, 1997), que son regulados por diversas vías de señalización (Topper y col., 1997; Ulloa y col., 1999; Bitzer y col., 2000).

Si hacemos una referencia específica a las isoformas, los dímeros de TGF- $\beta$  se unen a los receptores de tipo I y tipo II formando un complejo heterotetramérico en la

superficie celular, compuesto por el TGF- $\beta$  dimérico, dos receptores tipo II y dos receptores tipo I. Tras la interacción con el ligando, el TGF- $\beta$ RII, que posee una actividad quinasa en serinas/treoninas, fosforila al TGF- $\beta$ RI en una región conservada rica en glicina y serina denominada dominio GS. Esta fosforilación provoca un cambio conformacional en el TGF- $\beta$ RI promoviendo una actividad quinasa en serinas/treoninas responsable de la propagación de la señal. Esta fosforilación es suficiente para que se activen las diferentes vías de señalización (Wharton y Derynck, 2009). A pesar de disponer ambos de un dominio de unión a TGF- $\beta$ , la afinidad de TGF- $\beta$ RII por el ligando es mucho mayor que la de TGF- $\beta$ RI y éste último sólo puede unirse a TGF- $\beta$  cuando ha sido previamente captado por TGF- $\beta$ RII. Por lo tanto, en la formación del complejo heterotetramérico de receptores, TGF- $\beta$ RI debe ser reclutado por un complejo TGF- $\beta$ RII:TGF- $\beta$  preformado (Laiho y col., 1991). El TGF- $\beta$ RIII, denominado también betaglicano, es capaz de interactuar con las 3 isoformas de TGF- $\beta$ , aunque muestra particular afinidad por TGF- $\beta$ 2. Está involucrado en la formación del complejo de receptores y funciona predominantemente presentando el ligando al TGF- $\beta$ RII (Massagué, J., 1998). Los receptores TGF- $\beta$ RI y TGF- $\beta$ RII son expresados ubicuamente en las células de los mamíferos. En estado basal, es decir en ausencia de ligando, la proteína FKBP12 está unida al dominio GS del TGF- $\beta$ RI, adoptando una conformación que impide la fosforilación por TGF- $\beta$ RII, lo cual previene la señalización dependiente del ligando (Chen y col., 1997; Datta y col., 1998; Huse y col., 1999).

### 1.2.3.3.2. Señalización a través de las SMADS

La fosforilación de las R-SMADS activa la vía canónica de señalización de Smad, resultando en la translocación nuclear de un complejo R-Smad/Smad 4. Esto regula la respuesta transcripcional a través de una interacción directa tanto con elementos asociados con una variedad de genes diana (Attisano y Wrana, 2000; Miyazono y col. 2001). En la figura 7, se muestra una representación de dicha señalización. En la superficie de la célula, el ligando se une un complejo de receptor transmembrana serina /treonina quinasas (tipos I y II) e induce la transfosforilación de los segmentos GS en el receptor de tipo I por las quinasas de los receptores de tipo II. El receptor tipo I, en consecuencia activado, fosforila SMADS seleccionados en las serinas C-terminales, y estos receptores activados SMADS (R-SMADS), forman un complejo con un Smad4

común. Los complejos SMADS activados se translocan al núcleo, donde regulan la transcripción de genes diana, a través de la interacción física y la cooperación funcional con DNA, factores de transcripción de unión (X) y coactivadores CREB binding protein (CBP) o p300. La activación de los R-SMADS por receptores de tipo quinasas tipo I es inhibida por SMAD6 o SMAD7. R-SMADS y SMAD4 actúan entre el núcleo y el citoplasma. Las ligasas E3 de ubiquitina Smurf1 y Smurf2 median en la ubiquitinación y consiguiente degradación de los R-SMADS, sin embargo, también puede interactuar con Smad6/7 y de ese modo ubiquitinan los receptores de tipo I.

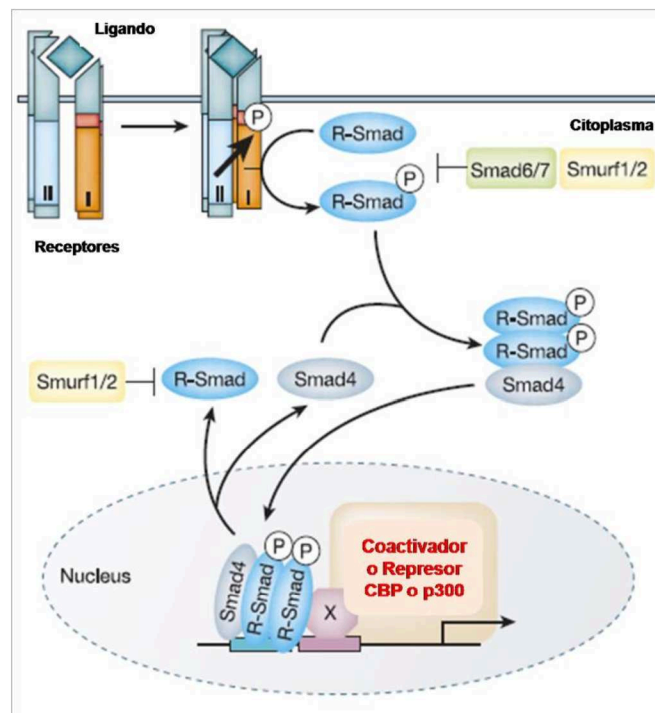


Figura 7: Representación del mecanismo general de activación de los receptores TGF-β y SMADS.

(Adaptado de Derinck R. y Zhang Y.E. 2003).

#### 1.2.3.4. TGF-βRIII (Betaglycano)

El TGF-βRIII es la proteína más abundante de la superficie celular en la mayoría de los tipos celulares. Está altamente glicosilada con un largo dominio extracelular y la cola citoplasmática corta que carece de actividad quinasa. Se expresa ampliamente en tejidos fetales y adultos, incluyendo células mesenquimales, epiteliales, neuronales (Cheifetz y col., 1986; Segarino y col., 1989). El TGF-βRIII es necesario para unir TGF-βRII con el TGF-βRII (Lopez-Casillas y col, 1993). También es un correceptor para la inhibina,

promoviendo interacciones para la misma y receptores ACVRII, ACVRIIB y BMPRII (Wiater y Vale, 2003; Chapman y col., 2002; Lewis y col., 2000).

#### 1.2.4. Roles intraováricos de los miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$

Numerosos estudios realizados en diversas especies han demostrado que los miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  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 gonadotrofinas, maduración del ovocito, ovulación, luteinización y formación del CL (Nilsson y col., 2003; Kumanov y col., 2005; Knight y Glistler, 2006; Sisco y Pfeffer, 2007). Esta evidencia puede ser agrupada en los correspondientes estadios del desarrollo folicular, como se explica a continuación (figura 8).

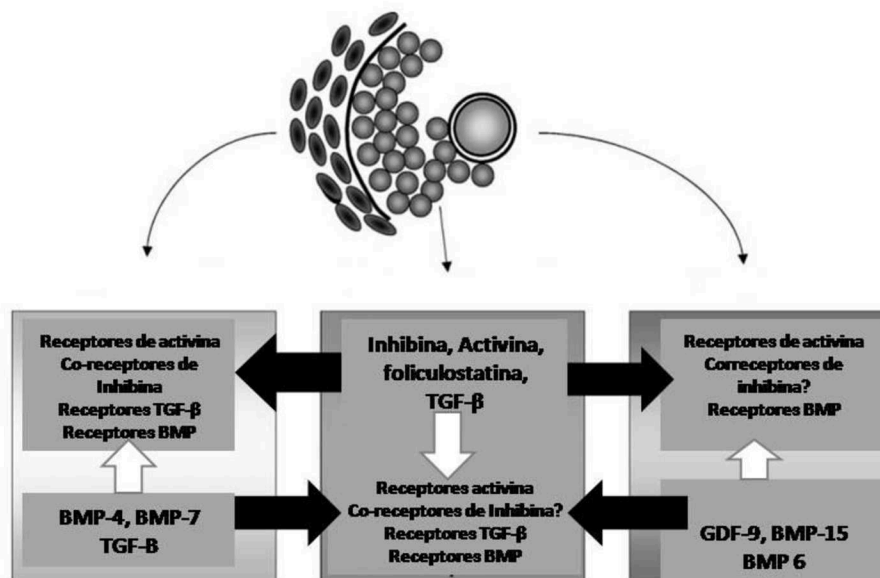
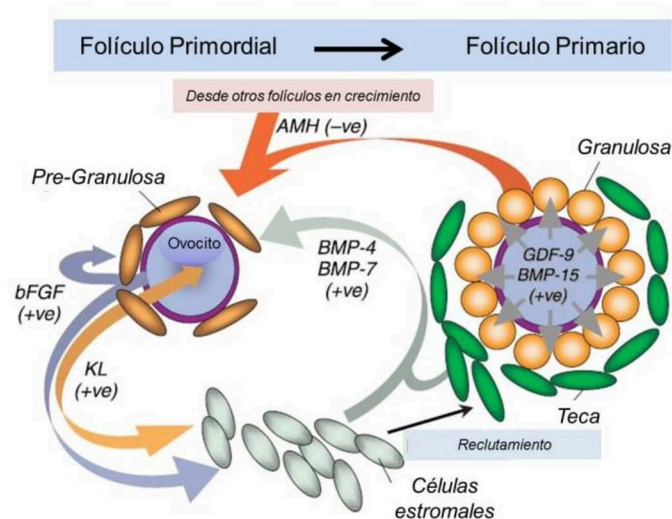


Figura 8: Diferentes miembros de la superfamilia TGF $\beta$ , receptores asociados y proteínas de unión son expresados en células de la teca, células de la granulosa y ovocitos, y ejecutan un rol como moléculas de señalización intrafolicular autócrinas (flechas blancas) y parácrinas (flechas negras). (Adaptado de Knight y Glistler, 2003).

### 1.2.4.1. 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 y 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 9). 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 y col., 2002; Nilsson y Skinner 2003, 2004; Knight y col., 2012). Dentro de aquellos factores que provienen de la familia TGF, ha sido demostrado a través de estudios realizados en roedores 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 y Skinner, 2004).



**Figura 9:** Señalizaciones (+VE, estimulante; -VE, inhibidora) 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. Las 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 y Glistler, 2006).

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 y col., 1995; Bodensteiner y col., 1999; Jaatinen y col., 1999; Elvin y col., 2000; McNatty y col., 2001; Knight y Glistler, 2003). Los receptores de tipo I y II a través de los cuales cumplen su acción estos factores, se expresan en las células foliculares y granulosas haciendo de éstas blancos potenciales de las señales paracrinas (Nilsson y Skinner, 2004).

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 grupo de folículos disponibles durante la etapa fértil de la hembra (Durlinger y col., 2002). 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 ejercidos por la secreción de AMH por parte de los folículos que están en estadios temprano del desarrollo (Durlinger y col., 2002).

### **1.2.4.2. 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 epitelio 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 y Glistler, 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 y col., 1979; Cortvrindt y col., 1997; Peña y col., 2007). Es así que los factores locales, incluyendo los de la superfamilia de TGF- $\beta$ , 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- $\beta$  producido por las células de la teca y de la granulosa. En contraste, la evidencia indica que la AMH tiene un rol negativo sobre el desarrollo folicular preantral (Knight y 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 y col., 1996). En cambio, ratones en los que se suprime la expresión de BMP-15 tienen un desarrollo folicular normal y son fértiles (Galloway y col., 2000).

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 oveja (Davis y col., 1992; Galloway y col., 2000; Juengel y col., 2002; McNatty y col., 2005). Las BMP-4 y -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 y Skinner, 2004). BMP-7 estimula la síntesis de ADN (efecto mitótico) en células de la granulosa de rata (Lee y col., 2001) y se sabe que inhibe la apoptosis en muchos tejidos (Dudley y col., 1995; Luo y col., 1995), por lo que se cree que también lo hace en las células de la granulosa, promoviendo por tanto, la supervivencia folicular (Shimasaki y col., 2004).

En cuanto a las activinas, su expresión así como la de los receptores de tipo I y II y la foliculostatina se ha 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 y col., 2000; Drummond y col., 2002; Pangas y col., 2002). Las subunidades  $\beta$ A y  $\beta$ B de activina y la foliculostatina están expresadas en las células de la granulosa mientras que

los receptores, tanto los de tipo I como los de tipo II, son expresados por las células de la teca, de la granulosa y el ovocito. En roedores, los folículos preantrales secretan activina A (Smith y Cortvrindt, 1998) la que interviene mejorando el crecimiento folicular y la proliferación de las células de la granulosa (Li y col., 1995; Smith y col., 1998; Liu y col., 1999; Zhao y col., 2003). 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 y col., 1996). La expresión del TGF- $\beta$  ha sido documentada en los folículos preantrales en muchas especies incluyendo roedores, humanos, ovejas y ganado vacuno (Teerds y Dorrington, 1992; Schmid et al., 1994; Roy y Kole, 1998; Nilsson y col., 2003; Juengel y col., 2004; Knight y Glister, 2006). Existe considerable variación espaciotemporal 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 y 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 (Fortune, 2003).

### **1.2.4.3. Desarrollo de los 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 y 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 pequeña se transforma en dependiente de FSH de manera crítica. En esta etapa del desarrollo folicular, diversos factores locales que integran la superfamilia del TGF- $\beta$ , tales como TGF- $\beta$ , AMH y sistema activina/inhibina/foliculostatina cumplen una función autocrina/paracrina 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 y Glister, 2006).



Las tres isoformas de TGF- $\beta$  parecen inducir efectos similares, aunque con diferentes potencias de acuerdo al tipo celular estudiado. Mientras que el TGF- $\beta$  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 y col, 1987; Roberts y Skinner, 1991; Lerner y col., 1995). Por ejemplo, TGF- $\beta$  inhibe la proliferación de células de la granulosa de bovino obtenidas de folículos antrales grandes (Skinner y col., 1987), mientras que aumenta la proliferación de células de la granulosa inmaduras de folículos menos diferenciados de ratas (Dorrington y col., 1988) y folículos preantrales de hámster (Roy, 1993). Como ocurre con la activina A, el TGF- $\beta$  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- $\beta$  puede suprimir la expresión tecal de la enzima Cyp17 y la producción de andrógenos de manera similar a la activina A (Fortune, 2003; Juengel y McNatty 2005; Knight y Glister, 2006).

La AMH actúa reduciendo 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 y col, 2002; Visser y Themmen, 2005). La AMH circulante ha sido correlacionada con el número de folículos antrales detectados por ultrasonografía transvaginal en mujeres (De Vet y col., 2002; Van Rooij y col., 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 y Themmen, 2005) así como para predecir la respuesta a protocolos de fertilización in vitro (Oktem y 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 y col., 2010), resaltando su utilidad como factor predictivo de la respuesta a la superovulación.

La inhibina ejerce una función endocrina muy importante sobre el eje hipotálamo-hipofisario-ovárico y tanto la activina como la foliculostatina tienen acciones a nivel del eje. En este último aspecto, las tres 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 y col., 1997; de Krester y col., 2000), es poco probable que la activina de origen ovárico ejerza un efecto endocrino sobre la glándula pituitaria. Además, la activina (al igual que la foliculostatina) puede ser producida por distintos tejidos, entre ellos la hipófisis anterior, demostrando que el efecto sobre la hipófisis puede ser autocrino-paracrino.

Activina, foliculostatina e inhibina sintetizadas por las células de la granulosa, modulan el crecimiento folicular, la respuesta a las gonadotrofinas, esteroidogénesis, maduración del ovocito y función del CL (Knight y Glistler, 2001). Aunque las células de la granulosa tienen la capacidad de sintetizar inhibinas y activinas desde estadios tempranos del desarrollo folicular (McNatty y col., 2000; Montgomery y col., 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 y col., 1990; Glistler y col., 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 y col., 1995; Miro y Hillier, 1996). En adición, ratones mutantes que tienen inhibida la expresión de la subunidad  $\alpha$  de inhibina, lo cual conduce a una sobreproducción de activina, tienen una proliferación descontrolada de células de la granulosa y desarrollan tumores ováricos (Matzuk y col., 1996).

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, es particularmente significativo dado 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 y col., 1989; Nakatani y col., 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 (Webb y col., 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 aromatasa (Cyp19) y la producción de estrógenos, mientras que inhibe de la secreción de progesterona (Shukovski y col., 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 y col., 1987) y bovinos 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 y Glistler, 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).

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 desempeñar, además, una función importante en el desarrollo del ovocito dentro del folículo antral. Las células de la granulosa que forman el cúmulo ovígero alrededor del ovocito expresan subunidades de inhibina/activina ( $\alpha$ ,  $\beta$ A y  $\beta$ B) y foliculostatina (Sidis y col., 1998), y el ovocito expresa receptores de tipo I y II para activina (Cameron y col., 1994; Sidis y col., 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 y Knight, 1998).

### 1.2.4.4. Ovulación y formación del cuerpo lúteo

No existe evidencia de que los elementos de la familia del TGF- $\beta$  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- $\beta$  y/o sus receptores puede considerarse como una consecuencia de la incapacidad de los folículos de desarrollarse exitosamente hacia la fase preovulatoria (Knight y 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 y 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- $\beta$  podría también contribuir a la formación de CL. TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 son expresados en células lúteas de ratones (Ghiglieri y col., 1995). En roedores, es posible que los TGF- $\beta$ s desempeñen la función 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 que 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  $17\beta$ -estradiol y aumentando la proliferación de células granulosa ( Otsuka y col., 2001; Glister y col., 2004).

Es altamente probable que la pérdida de estos factores durante la ovulación ejerza un efecto significativo sobre las células restantes de folículo promoviendo la luteinización (Knight y Glister, 2006).

### **1.2.5. Conclusión de conceptos introductorios: Superfamilia TGF- $\beta$**

Existen pruebas fehacientes de la variada pero contundente presencia de los diferentes componentes de la superfamilia del TGF- $\beta$  en todas y cada una de las etapas de la evolución folicular.

Se han hallado significativas diferencias entre especies en la importancia relativa de estos factores de crecimiento y queda mucho por esclarecer sobre los mecanismos por los que se ejercen sus funciones en el ovario. Al indagar sobre las funciones de estos factores durante el desarrollo folicular ovárico es probable que se generen avances para nuevas aplicaciones terapéuticas y para la gestión de la fertilidad.

### 1.3. ENFERMEDAD QUIÍSTICA 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 y col., 2010). La enfermedad quística ovárica (COD del inglés cystic ovarian disease) 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 y Ax, 1984; Laporte y col., 1994; Garverick, 1997; Silvia y col., 2002; Peter, 2004; Nelson y col., 2010; Cattaneo y col., 2014). 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 y col., 2006; Rizzo y col., 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 y col., 2004).

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 y col., 1944; Garm, 1949; Casida y Chapman, 1951; Wiltbank y col., 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 y Ulberg, 1967), gonadotrofinas (Casida y col., 1944; Nakao y col., 1978) y GnRH (Kesler y Garverick, 1982; Nanda y col. 1988). Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos no poseían un sustento teórico adecuado (Silvia y col., 2002).

#### 1.3.1. Definición

Durante los últimos años, la definición de quistes foliculares ováricos ha sido frecuentemente revisada. Silvia y col. (2002) los definieron como estructuras foliculares, con un diámetro mínimo de 17 mm, persistiendo por más de 6 días en ausencia de CL y con una clara interferencia de los ciclos estrales normales. Wiltbank y col. (2002) los caracterizaron como estructuras foliculares de 20 mm o más de diámetro,

que persisten por al menos 7 días en ausencia de CL. 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 y col., 2006). Sin embargo, Bartolomé y col., (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 CL y con falta de tonicidad uterina a la palpación. La incorporación del concepto de tonicidad uterina es clave para diferenciar un folículo preovulatorio de un quiste, y se basa en las características del útero durante el proestro, en el cual aumentan los receptores de oxitocina y, por ende, aumenta también la tonicidad en respuesta a las altas concentraciones de estrógenos. En el caso de quistes foliculares, la falla en la ovulación y la persistencia por varios días determinan la pérdida de los receptores de oxitocina y, por consiguiente, la falta de tonicidad. 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 debe 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, de folículos que puedan alcanzar la dominancia aún en presencia de estas estructuras, por lo cual se establece que esta es una enfermedad altamente dinámica (Hamilton y col., 1995; Rutter y Russo, 2000; Silvia y col., 2002; Bartolomé y col., 2005). La presencia de más de una estructura quística no es rara, en un estudio realizado por Silvia y col., (2002), el 47% de las vacas con quistes ováricos tuvieron 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.

### 1.3.2. Etiología y patogenia

Numerosos investigadores han acordado que los quistes foliculares se desarrollan debido a una disfunción del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000; Peter, 2004; Vanholder y col., 2006). A esto se le suma un componente intraovárico que ocasiona la disfunción de esta glándula.

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).

#### 1.3.2.1. 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 y col., 1995; Yoshioka y col., 1996; Vanholder y col., 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 y col., 2006). Las vacas con COD y con niveles elevados de estrógenos endógenos fallan en generar un pico de LH en respuesta a una dosis de  $17\beta$ -estradiol exógeno, indicando que se ha perdido la capacidad de responder a la retroalimentación positiva del estradiol sobre el eje hipotálamo-hipofisario (Zaied y col., 1981; Refsal y col., 1988; De Silva y Reeves, 1988). En este sentido, si la onda preovulatoria de GnRH/LH ocurre inoportunamente durante el crecimiento folicular, puede ocasionar la pérdida de sensibilidad del hipotálamo al efecto de retroalimentación positiva del  $17\beta$ -estradiol, llevando de esta manera a la anovulación y consecuente formación de quistes (Gümen y col., 2002; Gümen y Wiltbank, 2002).

En un estudio realizado por Hamilton y col. (1995) se detectó una concentración promedio mayor tanto de LH como de  $17\beta$ -estradiol circulantes en las vacas con



quistes, al compararlas 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  $\beta$ -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 y col. (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 17  $\beta$ -estradiol a nivel del hipotálamo, desencadenaría la falta del pico preovulatorio de LH debido al menor contenido de GnRH en el área preóptica-supraquiasmática, y los elevados niveles de la misma en el tallo hipofisario-eminencia media desde donde se libera LH de manera tónica. Como consecuencia, los niveles basales de LH durante la fase de crecimiento folicular serían más elevados (mayor frecuencia como resultado de un mayor contenido de GnRH en la eminencia media) y al momento de la ovulación, no habría niveles suficientes de GnRH en el centro cíclico (área preóptica-supraquiasmática) para inducir el pico preovulatorio de LH desde la hipófisis, conduciendo de esta manera a la formación de quistes. Por otra parte, esos niveles basales persistentemente elevados de LH podrían actuar sobre los receptores de las células de la granulosa, estimulando el desarrollo folicular más allá del tamaño ovulatorio (Vanholder y col., 2006).

### 1.3.2.2. Disfunción ovárica/folicular

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 y col., 2002; Salvetti y col., 2007).

Algunos autores han descrito alteraciones en la producción de factores de crecimiento por parte de células de la granulosa (Ortega y col., 2008; Rey y col., 2010; Rodríguez y col., 2013), en sus proteínas de unión (Rodríguez y col., 2011; Rodríguez y col., 2013) así como también, síntesis aberrante de proteínas en la matriz extracelular de los quistes (Salvetti y col., 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 y col., 1990) son similares a los que ocurren en quistes espontáneos (Hamilton y col., 1995), permitiendo estos modelos comprender la naturaleza dinámica de los mismos, las alteraciones endocrinas y su posterior destino (Cook y col., 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 de los receptores de LH y FSH podrían ser uno de los factores involucrados (Vanholder y col., 2006; Marelli y col., 2014).

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  $\alpha$  y  $\beta$  por ejemplo, dadas las diferencias en afinidad por el 17  $\beta$ -estradiol de cada uno de ellos o la capacidad de formar heterodímeros y actuar de manera diferente a nivel nuclear, puede causar modificaciones en el desarrollo folicular normal (Odore y col., 1999; Salvetti y col., 2007; Alfaro y col., 2012; Salvetti y col., 2012). 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 (Salvetti y col., 2004; Isobe y Yoshimura, 2007; Peter y Dhanasekaran, 2003; Ortega y col., 2007a; Salvetti y col., 2009, 2010). Al respecto, diversos 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 y Yoshimura, 2000 a, b; Salvetti y col., 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 y col. 2007; Amweg y col. 2011). Mediante cultivo de pared folicular in vitro se demostró recientemente que las células ováricas expresan receptores para melanocortinas. Dentro del grupo de las melanocortinas 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 y col. 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).

### 1.4. PERSISTENCIA FOLICULAR

La prolongación de la vida útil de los folículos bovinos produce una reducción de la fertilidad luego de la inseminación y de la ovulación (Revah y Butler, 1996). Una alta incidencia de pérdida embrionaria temprana se relaciona con la persistencia de los folículos dominantes. La persistencia del folículo dominante resulta de la incrementada frecuencia pulsátil de la LH cuando existen bajas concentraciones plasmáticas de progesterona (Taft y col., 1996) ya sea naturalmente durante la fase lútea (Folman y col., 1973; Meisterling y Dailey, 1987) o como parte de sincronización de celos (Wishart, 1977; Ahmad y col., 1995).

Al parecer, las bajas tasas de preñez se deben a la reanudación prematura de la meiosis en los ovocitos (Mihm et al, 1994; Revah y Butler, 1996), que lleva a la mortalidad embrionaria temprana. Wishart (1977) encontró que el 53% de los embriones fecundados de vacas tratadas con progesterona durante 21 días tenían escisión retardada a los 3-4 días después de la inseminación.

Durante décadas, los investigadores han tratado de desarrollar con éxito programas para sincronizar el estro en el ganado bovino (Jöchle, 1993). Los tratamientos que incluyen la administración prolongada de progesterona (por más de 7 días) resultan en una buena sincronización pero con baja fertilidad en el primer estro después del tratamiento (Hill y col, 1971; Henricks y col, 1973; Butcher y Pope, 1979; Macmillan y col., 1991; Jöchle, 1993; Savio y col, 1993a; Stock y Fortune, 1993; Wehrman y col., 1993). Diversos

estudios han mostrado que el tratamiento con progesterona induce la prolongación del desarrollo del folículo dominante (Trimberger y Hansel, 1955; Sirois y Fortune, 1990; Savio y col, 1993a). Al finalizar el tratamiento con progesterona, se produce el estro seguido por el aumento de LH y la ovulación del folículo dominante (Sirois y Fortune, 1990; Jöchle, 1993; Savio y col., 1993; Stock y Fortune, 1993; Revah y Butler, 1996). Dado que el CL surge del folículo dominante persistente produce cantidades normales de progesterona, la infertilidad no se puede atribuir a una incapacidad lútea (Stock y Fortune, 1993). Sin embargo, si se puede atribuir a los efectos del desarrollo folicular prolongado en el ovocito o en el tracto reproductivo. El mantenimiento de los folículos en una prolongada dominancia puede causar una maduración prematura del ovocito, antes del pico de LH (Mihm y col.1994).

Entre los múltiples factores que intervienen en la etiopatogenia de la COD, recientemente ha sido demostrado que las concentraciones subluteales de progesterona son capaces de inducir un incremento en la frecuencia de los pulsos de LH, inhibiendo el pico preovulatorio de LH y así la ovulación, llevando a la prolongación del crecimiento y en consecuencia persistencia de los folículos dominantes (figura 10), incrementando el 17  $\beta$ -estradiol periférico y reduciendo la fertilidad (Bridges y Fortune, 2003).

Las ondas de crecimiento y regresión de los folículos ováricos bovinos se producen sucesivamente en un ambiente rico en progesterona con el folículo dominante de la ola final diferenciándose en folículo preovulatorio luego de la regresión del CL. Si las concentraciones típicas de progesterona de la fase lútea son mantenidas experimentalmente, el ciclo estral puede extenderse en ondas regulares de crecimiento folicular y atresia continua (Sirois y Fortune, 1990; Stock y Fortune, 1993). Sin embargo, las concentraciones subluteales de progesterona circulantes extienden el ciclo mediante la inducción de un folículo dominante que permanece más tiempo que el normal (persistente). Con insuficiente progesterona para inducir la frecuencia pulsátil de LH, el folículo dominante continúa creciendo, secretando concentraciones cada vez mayores de 17  $\beta$ -estradiol (Sirois y Fortune, 1990; Shaham-Albalancy, 2000).

En estas condiciones, la fertilidad se encuentra dramáticamente reducida (Stock y Fortune, 1993; Mihm y col. 1994) presentando inconvenientes en los regímenes de sincronización que dilatan el estro con una terapia progestágena. Una extendida exposición a concentraciones subluteales de progesterona induce una prematura

## 1. Introducción

luteinización de las células de la granulosa (Bigelow y Fortune, 1998). El incremento en la capacidad secretora de  $17\beta$ -estradiol de folículos de dominancia prolongada en un ambiente hormonal de progesterona subluteal puede ser atribuido a un incremento en la masa de tejido esteroideogénico recibiendo una frecuente estimulación de LH. En ausencia de los efectos inhibitorios de las concentraciones de progesterona en una normal fase lútea, los folículos dominantes persistentes desarrollan una mayor masa de teca interna que puede producir niveles mayores de andrógenos tras la frecuente estimulación de LH. Se detecta entonces, una mayor concentración de  $17\beta$ -estradiol en el plasma de los animales con este tipo de folículos, en comparación con los niveles encontrados en animales con folículos dominantes normales. El incremento en la habilidad para producir esteroides sugiere que la prematura luteinización en los folículos dominantes persistentes puede ser un factor involucrado en la disminución de la fertilidad de ovocitos de este tipo de folículos (Bigelow y Fortune, 1998).

Las concentraciones bajas de progesterona pueden reducir la capacidad del estradiol, ya sea endógeno o exógeno, para inducir un pico preovulatorio de LH y por consiguiente la ovulación (Hatler y col., 2008).

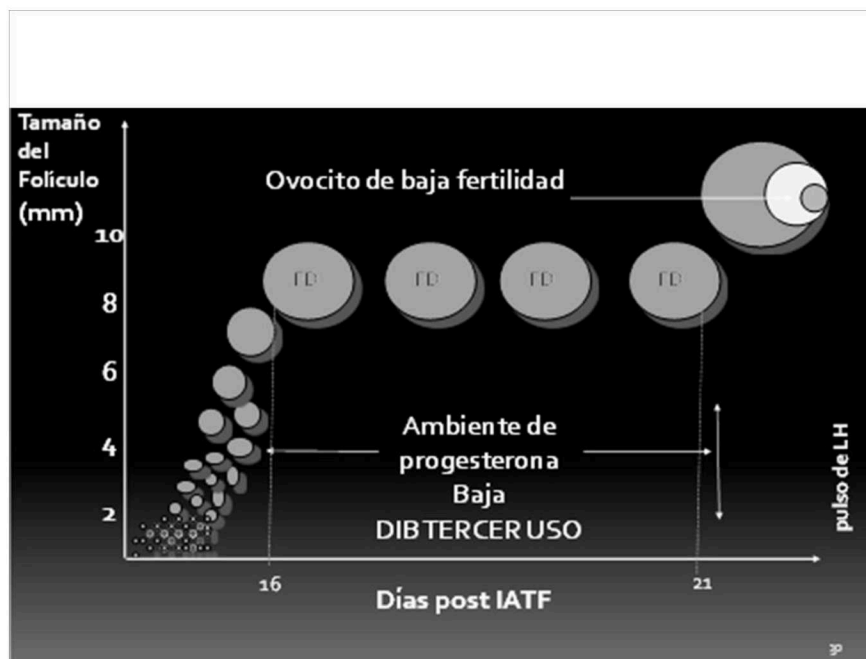


Figura 10: Persistencia del folículo dominante. (Adaptado de Santos Ramírez, 2013).

## 1. Introducción

Como se ha descrito previamente, alteraciones en los mecanismos de control endocrino, autocrino y/o paracrin, en los que están involucradas gran cantidad de moléculas (hormonas, péptidos, etc.) podrían participar en el desarrollo de quistes ováricos a partir de momentos tempranos de la persistencia de los folículos, resultando de utilidad emplear modelos de inducción de folículos persistentes y quistes, para la evaluación de los procesos previos a la formación de los quistes ováricos en condiciones más controladas, pudiendo correlacionar las distintas variables entre la enfermedad de presentación espontánea con lo ocurrido en el modelo experimental. Esto permitirá aumentar el caudal de conocimientos hasta ahora comprendidos en la formación inicial de folículos persistentes como base de la etiopatogenia de la COD.

## ***2. OBJETIVOS***



Planteamos como **Hipótesis general** que una alteración en la expresión de componentes de la superfamilia de TGF- $\beta$  importantes actores en los mecanismos autocrinos, paracrinos y endocrinos del ovario, podría afectar el normal desarrollo folicular, formando parte de la patogenia de trastornos reproductivos de origen ovárico en bovinos, proponiéndonos por lo tanto, como:

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la localización celular específica y expresión de los integrantes del sistema activina/inhibina/foliculostatina, de las isoformas del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) y receptores que podrían participar en la enfermedad quística ovárica en bovinos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Desarrollar y caracterizar morfológica y endocrinológicamente un modelo de persistencia folicular que permita el estudio de los estadios iniciales en la formación de quistes.
2. Detectar y cuantificar diferentes componentes de la superfamilia del TGF- $\beta$  y proteínas relacionadas con la transducción de sus señales en las estructuras foliculares ováricas de animales con COD inducida mediante ACTH y espontánea.
3. Detectar y cuantificar diferentes componentes de la superfamilia del TGF- $\beta$  y proteínas relacionadas en las estructuras foliculares ováricas de animales con persistencia folicular inducida.
4. Realizar inferencias sobre los hallazgos y la posibilidad de la utilización de los modelos como herramientas de estudio de la enfermedad así como también en el desarrollo de acciones preventivas y terapéuticas.



### ***3. MATERIALES Y MÉTODOS***



#### **3.1. PROCEDIMIENTOS EFECTUADOS CON ANIMALES**

Todos los procedimientos que se llevaron a cabo con animales se realizaron de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching. Tercera Edición. Federation of Animal Science Societies, 2010) y fueron aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral bajo el número 32/2008. Los animales fueron alojados en corrales adecuados y la alimentación estuvo basada en alimento balanceado comercial, heno de alfalfa y agua ad libitum.

##### **3.1.1. COD espontánea**

###### **3.1.1.1. Diagnóstico de COD espontánea**

Se realizó la identificación de casos de COD espontánea a través de controles reproductivos de rutina en rodeos comerciales de la zona, mediante la cooperación de numerosos profesionales del área de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias (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 y col. (2005).

###### **3.1.1.2. Obtención de muestras**

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) o líquido folicular (en vacas que continuaban en el tambo). La obtención de ovarios enteros se efectuó mediante ovariectomía bilateral transvaginal, mientras que la obtención de líquido folicular se realizó por aspiración folicular guiada por ecografía, utilizando la técnica descrita por Seneda y col. (2003), como se detalla más adelante.

En todos los casos se tomaron muestras de sangre y se confeccionó una anamnesis completa, recabando datos sobre la alimentación que recibían, condiciones climáticas,

medidas de manejo, etc., para un posterior análisis en trabajos paralelos. Además, se tomaron muestras de animales controles, considerándose de este modo a vacas que, en comparación con el caso de COD, tenían el mismo número de lactancias, la misma edad, se encontraban en el mismo momento de la lactancia (días en lactancia) y en el mismo lote.

#### 3.1.1.2.1. Aspiración folicular guiada por ecografía

Para la realización de la aspiración de LF se adaptó la técnica descrita por Seneda y col. (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 8300vet equipado con un transductor microconvexo de 5,0 MHz montado en una sonda transvaginal para aspiración folicular (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil). La misma posee una guía para la colocación de una aguja calibre 20G con bisel ecogénico que se conecta por medio de una tubuladura de teflón a tubos contenedores cónicos estériles de 50 ml. Para la aspiración se empleó una bomba de vacío (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil) a una presión de aspiración constante. 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 se tomó la 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 aspirado folicular guiado por ecografía. Extraído de Stangaferro, M.L. 2013.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1.1.2.2. Ovariectomía

Una vez realizado y confirmado el diagnóstico de COD se procedió a la obtención de los ovarios mediante ovariectomía bilateral. Esto se realizó a través de abordaje transvaginal con el animal en pie (figura 12), para lo cual en primer lugar realizó la sedación con 150 mg totales de clorhidrato de ketamina (Ketamina 10%, Alfazan®) y se efectuó anestesia epidural baja con 100 mg totales de clorhidrato de lidocaína (Lidocaína 2%, Vetue®). En segundo lugar, se realizó la limpieza y desinfección del área perineal y de la cavidad vaginal con una solución de cloroxilenol (5 %).



Figura 12: Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje transvaginal.  
(Extraído de Stangaferro, 2013).

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 de tamaño suficiente para introducir una mano dentro de la cavidad pélvica, localizar el útero y retrotraerlo, junto con los ovarios, dentro de la cavidad vaginal (Garnero y Perussia, 2002). Se procedió a la sección y extracción de ambos ovarios, ligando previamente por transfixión los vasos sanguíneos que lo irrigan. Finalmente los animales fueron tratados con antibióticos, coagulantes, antiinflamatorios y antiparasitarios externos.

## 3.1.2. COD inducida mediante ACTH

## 3.1.2.1. Diseño Experimental

Se utilizaron 10 vaquillonas de la raza Holando Argentino puras por cruce, de entre 15 y 24 meses de edad, fueron examinadas antes del comienzo de la experiencia para comprobar la normalidad en su tracto reproductor y regularidad de sus ciclos estrales. Los animales fueron sometidos al protocolo de sincronización del ciclo estral Ovsynch (Pursley y col., 1995) de la siguiente manera: se administraron 100 µg de un análogo sintético de GnRH (2,5 ml IM de acetato de buserelina, 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 y Fortune, 1998) luego de la última inyección de GnRH y fue designada como día 1 del ciclo estral (figura 13). Durante este período, los animales no recibieron ningún otro tratamiento.

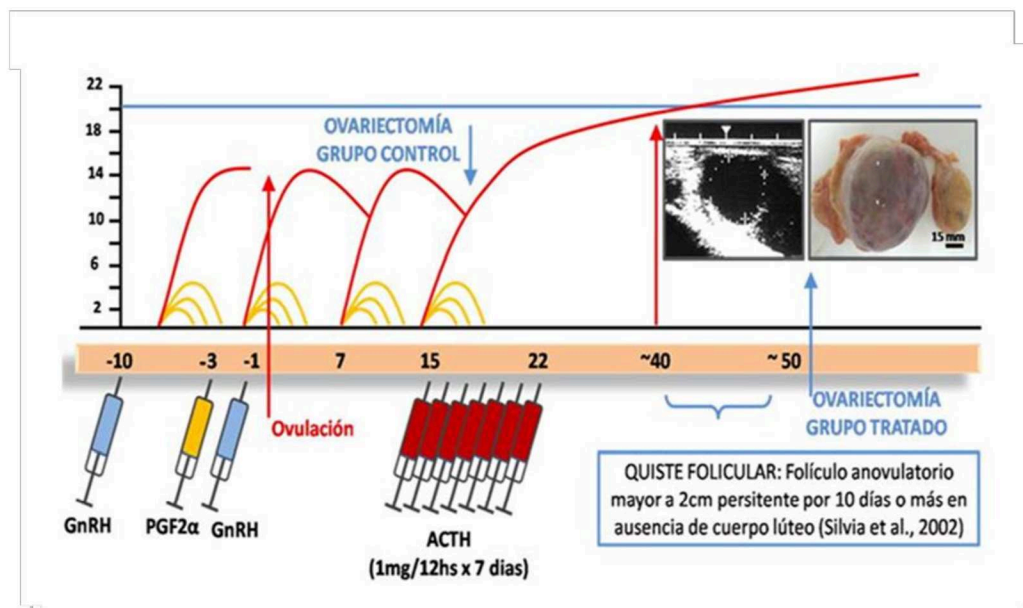


Figura 13: Protocolo de sincronización de celos e inducción de quistes foliculares mediante ACTH.

Los animales fueron distribuidos en 2 grupos al azar: Grupo I (n=6): luego de la sincronización de celos, estas vaquillonas fueron tratadas con 100 UI de ACTH (1mg/ml de Tetracosactido [corticotropina], Synacthen depot, 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 y McNally, 1976; Dobson y col., 2000; Ortega y col., 2008). Grupo II (n=4): luego de la sincronización, este grupo de hembras fue mantenido en condiciones ambientales idénticas al grupo I y sin tratamiento fueron tratados con agua destilada en la misma frecuencia que en el grupo I (grupo control).

#### **3.1.2.2. Monitoreo de los cambios ováricos**

Con el fin de monitorear los cambios en el ovario durante el ciclo estral se realizaron exámenes diarios mediante tacto rectal y ultrasonografía a las vaquillonas de ambos grupos hasta la obtención de las muestras. Para esto, se utilizó un equipo de ultrasonografía Honda HS101V con Transductor lineal transrectal de 5 MHz (Tokio, Japón). 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 19-21 días.

Como estructuras quísticas fueron considerados aquellos folículos con un diámetro mayor de 20 mm y que persistían durante 10 días o más, sin ovular y sin formación de cuerpo/s lúteo/s y en ausencia de tono uterino (Silvia y col., 2002; Bartolomé y col., 2005). Se determinó como primer día de formación del quiste al día en que el folículo superó los 20 mm de diámetro.

#### **3.1.2.3. Obtención de muestras**

Desde el inicio del tratamiento con ACTH y hasta el momento de la ovariectomía se obtuvieron diariamente muestras de sangre. La extracción de los ovarios se realizó mediante ovariectomía bilateral con abordaje por flanco izquierdo con el animal en pie. En primer lugar se realizó la sedación mediante la aplicación por vía subcutánea de 5 ml de una formulación combinada de Clorpromazina (5 mg/ml) y Difenhidramina (2 mg/ml) (Stresin LA®, Laboratorio Rio de Janeiro) y luego se realizó anestesia local infiltrativa según la técnica de Magda modificada, utilizando 160 ml de clorhidrato de lidocaína (2 %) (Lidocaína 2%, Vetue®). Se procedió realizar una incisión desde dorso-caudal hacia ventro-craneal de la piel del flanco y los planos musculares que se

### 3. Materiales y Métodos

encuentran debajo de la misma, de una longitud suficiente para permitir un buen acceso a cavidad abdominal. Una vez localizados, ambos ovarios fueron extraídos (ligando previamente por transfixión los vasos sanguíneos que lo irrigan), procediendo luego a la sutura de los planos musculares y de la piel (Garnero y Perusia, 2002) (figura 14). Al final de la intervención, los animales fueron tratados con antibióticos, coagulantes, antiinflamatorios y antiparasitarios externos.



Figura 14: Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje por flanco izquierdo. (Extraído de Stangafferro, 2013).

#### 3.1.3. Modelo de Persistencia folicular

##### 3.1.3.1. Diseño experimental

En el desarrollo de este modelo experimental también se utilizaron hembras bovinas de la raza Holando Argentino, seleccionadas fuera del período de lactancia de establecimientos locales de la zona. Las mismas fueron inspeccionadas antes del comienzo de la experiencia a fin de confirmar la normalidad en su tracto reproductor y la regularidad de sus ciclos estrales. Este ensayo se realizó por duplicado de modo de obtener por un lado muestras de sangre destinadas a mediciones hormonales: determinación de pulso y frecuencia de gonadotrofinas, y muestras de LF destinadas a biología molecular (n=16) y por otro muestras de ovarios completos destinados a técnicas histológicas e inmunohistoquímicas (n=20).

### 3. Materiales y Métodos

Los animales fueron aleatoriamente asignados en cuatro grupos experimentales denominados C (control), P5 (de 5 días de persistencia folicular), P10 (de 10 días de persistencia folicular) y P15 (de 15 días de persistencia folicular). El día 0 del protocolo estuvo determinado por el inicio de la sincronización del ciclo estral en todos los animales para lo cual se utilizó un protocolo adaptado del denominado G-6-G-Ovsynch, previamente descrito (Pursley y col., 1995; Bello y col., 2006), que consiste en la administración en el día 0 de una dosis de 150 µg de PG, seguida de una segunda dosis a las 12 horas para asegurar la completa luteólisis (Hatler y col., 2008). El día 2 se administraron 20 µg de un análogo sintético de GnRH (Buserelina) y el día 8, correspondiéndose con el comienzo del Ovsynch, se administró una segunda dosis de esta hormona. Finalmente se inyectaron dos dosis de PG separadas por 12 hs. el día 15. El día 16 a los animales de los grupos experimentales P5, P10 y P15 se les colocaron dispositivos intravaginales de liberación lenta de progesterona de 750 mg para conseguir concentraciones subluteales de dicha hormona (1-2 ng/ml) según lo descrito por Bigelow y Fortune (1998). Estos dispositivos permanecieron hasta los 5, 10 y 15 días de persistencia, según el grupo; momento en el que se realizó la ovariectomía para la realización de la caracterización histológica. El grupo control permaneció sin tratamiento y dichos animales fueron sometidos a ovariectomía en proestro. En la figura 15 se esquematizan los diseños de los tratamientos hormonales, el monitoreo y las tomas de muestras vinculados al modelo.

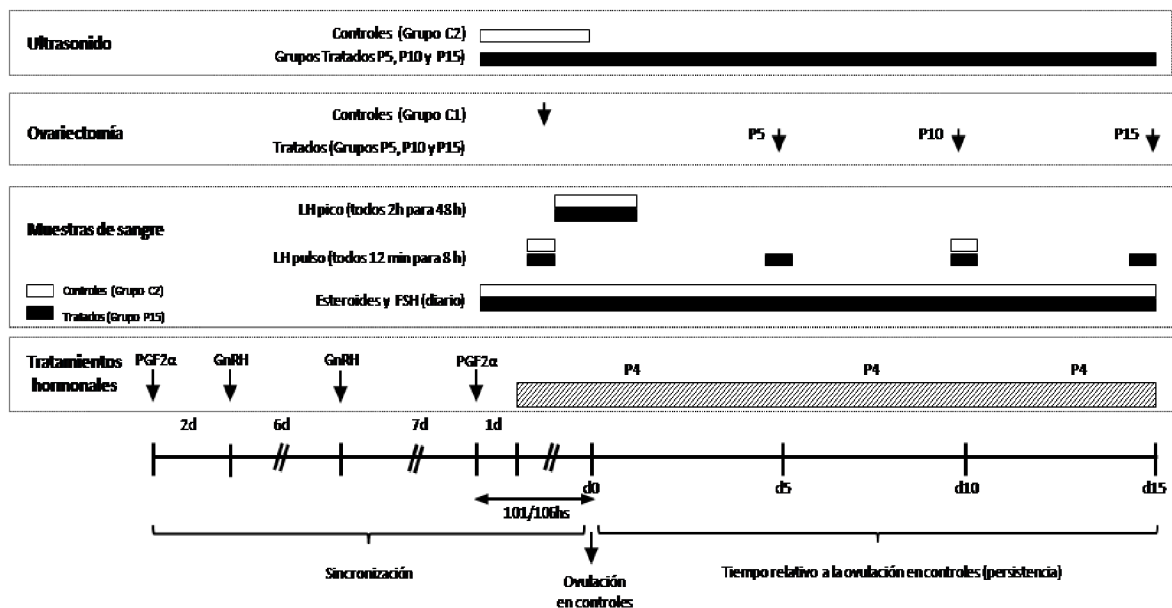


Figura 15: Representación de los tratamientos y el monitoreo del modelo de persistencia folicular.



#### 3.1.3.2. Monitoreo de los cambios ováricos

Durante el protocolo descrito, se realizó el seguimiento ecográfico el desarrollo de folículos con hasta 15 días de persistencia en todos los animales tratados. Para la determinación del momento de ovulación en el grupo control o la falla de la misma en los grupos tratados se procedió a la realización de ecografías ováricas cada 12 hs.

Los folículos se observaron como estructuras anecogénicas presentes permanentemente en la misma posición y ovario, comprobándose el crecimiento de las mismas mediante palpación rectal y ultrasonografía (figura 15).

#### 3.1.3.3. Obtención de muestras

Se realizó la toma de muestras de sangre diaria durante todo el protocolo y con mayor frecuencia para la determinación de pico de LH (cada 2 horas) y frecuencia de pulsos de gonadotrofinas (cada 12 minutos) en días específicos del protocolo (momento esperado de ovulación para animales control).

Para la identificación del pico preovulatorio de LH en 4 animales controles y 4 tratados, se tomaron muestras de sangre cada 2 hs. a partir de las 72 hs. posteriores a la administración de la primera dosis de PG (día 15) hasta las 120 horas. Para la determinación de la actividad pulsátil de LH en los animales (controles n=4; tratados n=4), se tomaron muestras de sangre cada 12 minutos por 8 h durante la fase folicular (48-56 h post PG) (fig. 16) y durante el período de persistencia folicular en los grupos tratados los días 24 (día 5 de persistencia, P5, n=4), 29 (día 10 de persistencia, P10, n=4) y 34 (día 15 de persistencia, P15, n=4) (figura 15).

Además desde el día 16 hasta el día 34 se tomaron muestras de sangre diarias en todos los animales para la medición de hormonas esteroideas y gonadotrofinas, y se realizaron ecografías para poder observar, medir y registrar en imágenes los folículos persistentes (figuras 16 y 17).

Figura 16: Imagen ecográfica que demuestra un folículo persistente en el momento previo a su aspiración en el día 15 de permanencia.



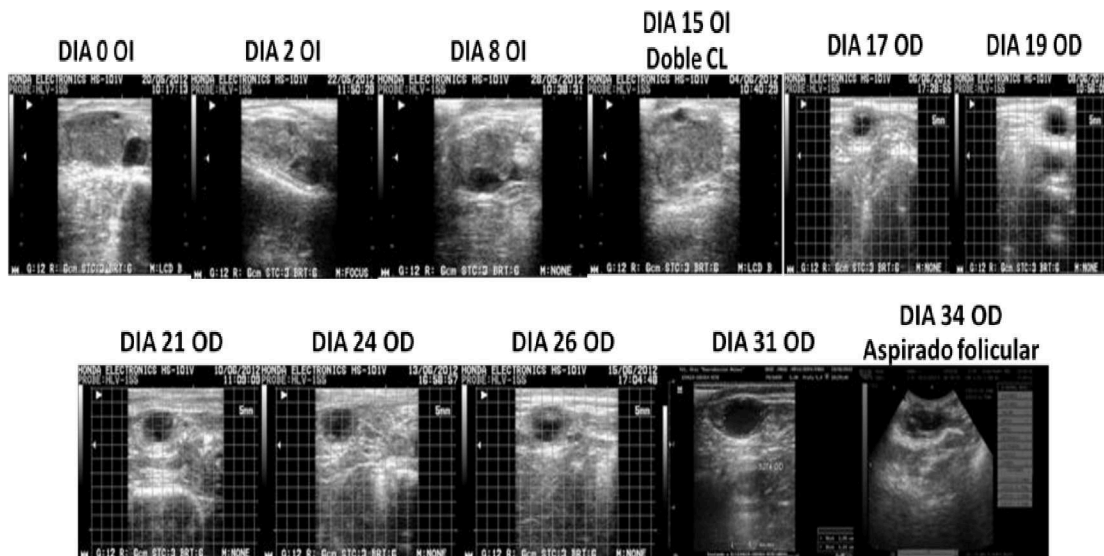


Figura 17: Secuencia de imágenes ecográficas que muestran el desarrollo folicular en un animal del grupo tratado con 15 días de persistencia que evolucionó hasta el estadio de quiste. OI: Ovario Izquierdo, OD: Ovario Derecho, CL: Cuerpo Lúteo.

La obtención de las muestras de sangre de los animales de los grupos experimentales se hizo a través de la colocación en la vena yugular de un catéter endovenoso permanente. Una vez obtenidas las muestras fueron inmediatamente colocadas en estufa a 37°C durante 1 hora y luego refrigeradas a 4-6°C por 2 horas para favorecer la retracción del coagulo. Posteriormente fueron centrifugadas a 1500g por 15 min. El suero obtenido separado y fue conservado a -20 °C.

La actividad ovárica fue verificada por ecografía (Transductor lineal transrectal 5 MHz, Honda HS101V, Japón) para corroborar la respuesta a los tratamientos durante el G6G-Ovsynch (días 0, 2, 8 y 15) y diariamente durante el período experimental (días 16 al 34) para una completa descripción de la actividad ovárica durante el período de persistencia folicular. Se tomaron imágenes de las estructuras de interés para su posterior evaluación.

Finalmente se realizó el aspirado folicular guiado por ecografía de los animales a los 5 (P5), 10 (P10) y 15 (P15) días de persistencia folicular y en el proestro de los animales del grupo control (C). Para ello, se utilizó la misma técnica de aspiración descrita anteriormente en la toma de muestras del modelo de COD espontánea. Inmediatamente de recolectado el líquido folicular rico en células de la granulosa, se procedió a su conservación a temperatura de refrigeración (4-6°C) y traslado al laboratorio para su procesamiento para la separación de las células de la granulosa del resto del líquido

folicular mediante centrifugación. Las células se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento en otros estudios. El líquido folicular se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En la repetición del ensayo se obtuvieron muestras de sangre y de los ovarios mediante la técnica de ovariectomía por abordaje transvaginal previamente descrita (Garnero y Perussia, 2002).

#### 3.1.4. Quistes ováricos bovinos obtenidos en playa de faena

En el frigorífico, se procedió a la recolección de ovarios con folículos terciarios y con folículos compatibles con la descripción de quistes foliculares (Bartolomé y col., 2005), dentro de los 20 minutos de sacrificio de los animales (figura 18). Los ovarios se obtuvieron de hembras bovinas de raza Holando Argentino, evaluadas visualmente como vacas no preñadas, sin la presencia de anomalías macroscópicas del sistema reproductivo.

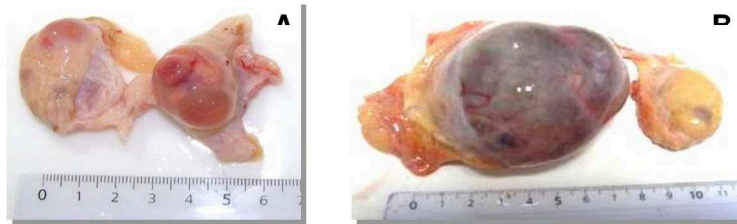


Figura 18: Ovarios provenientes de playa de faena. A: ovarios sanos con folículos terciarios grandes y CL. B: ovarios con estructura quística de diámetro superior a 30 mm en uno de ellos.

### 3.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Los ovarios y el LF provenientes de animales con COD espontánea diagnosticada a campo, procedentes de ambos modelos experimentales y remitidos desde la playa de faena, fueron procesados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada del ICiVet Litoral (UNL-CONICET).

En la figura 19 se muestra un esquema de las muestras que arribaron al laboratorio.

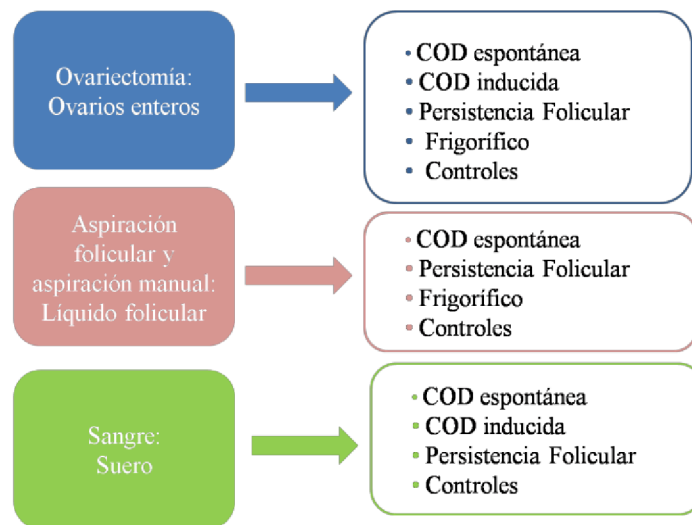


Figura 19: Esquema de la procedencia de las muestras destinadas a distintos estudios.

En el laboratorio, las muestras se procesaron a partir del material proveniente del campo y del modelo experimental, sobre las cuales se realizaron posteriormente todas las determinaciones:

- Muestras de LF, obtenidas por aspiración folicular guiada por ecografía en quistes diagnosticados a campo, en folículos persistentes y en folículos preovulatorios controles, o mediante jeringa y aguja en folículos intactos de ovarios enteros obtenidos por ovariectomía (quísticos o controles) y en frigorífico. El LF recolectado fue conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y destinado a mediciones hormonales. En cuanto a las muestras provenientes de playa de faena el LF fue obtenido por aspiración mediante aguja 25G, acoplada a jeringa de 1 ml y conservado de igual manera que en los casos anteriores.
- Muestras de pared folicular, tanto de quistes foliculares (espontáneos o inducidos), de folículos persistentes, como de folículos sanos (en los animales control), incluyendo: folículos terciarios pequeños menores a 5 mm de diámetro; folículos terciarios

medianos entre 5 y 10 mm de diámetro; y folículos terciarios grandes mayores a 10 mm (n=10 en todos los casos) (Parrott y Skinner, 1998). Todas estas muestras fueron conservadas a -80°C hasta su procesamiento (extracción de proteínas para la técnica de western blot y de ARN total para otros estudios).

c) Los ovarios enteros (de animales con COD espontánea, con persistencia folicular o controles), luego de la extracción de las muestras de pared folicular y de LF, fueron reducidos y fijados en formaldehído bufferado (10%) durante 8-12 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, caracterizar los modelos experimentales utilizados y evaluar las modificaciones endocrinas existentes durante el desarrollo de los mismos así como de los animales con diagnóstico de COD espontánea.

#### **3.2.1. Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas**

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

Se efectuaron cortes seriados de 4µm de espesor con un micrótopo rotativo, las que se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3- aminopropyl-triethoxysilane (Sigma, USA), y 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.

#### **3.2.2. Procesamiento de las muestras para western blot**

Se tomaron fracciones de aproximadamente 60 mg de pared folicular de los distintos tipos de folículos terciarios pequeños y grandes sanos y folículos quísticos provenientes de frigorífico, las que fueron colocadas en buffer RIPA (del inglés: Radioimmunoprecipitation assay buffer) con inhibidores de proteasas y

### 3. Materiales y Métodos

homogeneizadas con un homogeneizador de mano Ultra Turrax®. El sobrenadante se obtuvo luego de centrifugar las muestras a 14.000g en centrifuga refrigerada durante 20 minutos. Una vez obtenidos los extractos de proteínas se determinó la concentración proteica de cada muestra mediante el método fluorimétrico (Quant-iT Protein Assay Kit, Qubit, Invitrogen, Nueva York, Estados Unidos). Previamente a las lecturas, se utilizó un patrón de referencia para realizar la curva de calibrado.

### 3.3. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS EN SUERO Y LÍQUIDO FOLICULAR

Las concentraciones de 17  $\beta$ -estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en suero y líquido folicular de animales control y de aquellos con COD inducida y espontánea fueron evaluadas 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 17  $\beta$ -estradiol, 0,13 ng/ml de progesterona, 0,04 ng/ml para la testosterona, y 0,10 mg/dl para el cortisol.

Para el modelo de persistencia folicular, las concentraciones de 17  $\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona en el suero y líquido folicular, se midieron por ECLIA (inmunoensayo de electroquimioluminiscencia) kits (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) en un sistema E411 COBAS (Roche Diagnostics), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 5 pg / ml para 17  $\beta$ -estradiol, 0,03 ng / ml para la progesterona y 0,02 ng / mL para la testosterona. Además, los niveles plasmáticos de FSH y LH se determinaron por radioinmunoensayo (RIA) utilizando el kit proporcionado por NIDDK (EE.UU.) como se describe y validado previamente (Lacau-Mengido y col., 2000; Ortega y col., 2004). Los coeficientes de variación Intra e inter-ensayo para LH y FSH fueron menos del 8% y 12%, respectivamente. Las concentraciones detectables mínimos fueron 0,16 y 1,18 ng / ml de suero para LH y FSH, respectivamente. Las concentraciones de 17-hidroxiprogesterona en el suero y líquido folicular, se midió por un RIA competencia disponible comercialmente sin extracción (Immunotech, Marsella, Francia) con una sensibilidad de 0,046 ng / ml.

Para la validación de los esteroides ECLIA y RIA, el líquido folicular agrupado y suero de vacas ovariectomizadas se hicieron esteroides libres por tratamiento con carbón vegetal (McNeilly y col., 1991).

### 3.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MIEMBROS DE TGF- $\beta$

#### 3.4.1. Inmunohistoquímica simple

Mediante esta técnica se logró la identificación in situ y cuantificación de las siguientes proteínas: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, activina, inhibina y foliculostatina; TGF- $\beta$ RI, TGF- $\beta$ RIII; y ACVRIIB en tejido ovárico proveniente de animales con COD espontánea, así como de los modelos experimentales, utilizando anticuerpos específicos disponibles comercialmente, detallados en la tablas 2 y 3.

Anticuerpos Primarios	Clon	Proveedor comercial	Dilución	Recuperación Antigénica
<b>Ligandos</b>				
TGF- $\beta$ 1	Policlonal	Santa Cruz (Sc-146)	1:25	si
TGF- $\beta$ 2	Policlonal	Santa Cruz (Sc-90)	1:200	si
TGF- $\beta$ 3	Policlonal	Santa Cruz (Sc-83)	1:200	no
Activina	Monoclonal E4	Serotec (MCA95OST)	1:50	si
Inhibina	Monoclonal R1	Serotec (MCA9515T)	1: 75	si
Foliculostatina	Policlonal	Abcam (ab 64490)	1:100(Casos Espontáneos, Inducidos y controles) 1:400 ( Casos Persistentes y controles)	no
<b>Receptores</b>				
ARIIB	Monoclonal IgG2A	Abcam (ab 76940)	1:800	no
TGF- $\beta$ RI	Policlonal	Abcam (ab 31013)	1:25	si
TGF- $\beta$ RIII	Policlonal	Abcam (ab28366)	1:50	si

Tabla 2: Detalle de los anticuerpos primarios utilizados y las condiciones de uso en la técnica de inmunohistoquímica.

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



### 3. Materiales y Métodos

- 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 etanol absoluto (dos pasajes de 3 minutos), etanol 96° (dos pasajes de 3 minutos) y finalmente etanol 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 800W). Como solución de recuperación se usó buffer citrato 0,01M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en un coplin sumergido en un recipiente con agua, y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación: 3 minutos a 100% de

<b>Anticuerpos Secundarios</b>	<b>Proveedor comercial</b>	<b>Dilución</b>	<b>Grupos Experimentales</b>
IgG anti-rabbit Biotinilado	LETHAM-B1	1:100	COD Inducida, Espontánea y Control: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 y Foliculostatina.
IgG anti-mouse Biotinilado	LETHAR-B1	1:100	COD inducida, espontánea y control: Activina, Inhibina.
Secundario Universal	Cytoscan HRP- Detection System- Cell Mark	-	COD inducida, espontánea y control: Receptores: TGF- $\beta$ RI, TGF- $\beta$ RIII, ARIIB. Persistencia y control: TGF- $\beta$ 1, Activina, Inhibina y Foliculostatina.

Tabla 3: Detalle de los anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de inmunohistoquímica de acuerdo a los grupos experimentales.

### 3. Materiales y Métodos

potencia, 6 minutos al 40%, recarga del coplin con agua destilada, 6 minutos al 40 % y 20 minutos dentro del microondas apagado. Este tratamiento se utilizó para ciertos anticuerpos según se detalla en la tabla 2.

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 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 biotilado monoclonal o policlonal (según corresponda y en la dilución apropiada), o con el secundario Universal del kit Cytoscan HRP Detection System, durante 30 minutos a temperatura ambiente (tabla 4).

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

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

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

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

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 emplearon los anticuerpos primario anti-TGF-β3 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  $\alpha$  de dicho dímero, mientras que para activina se recurrió a un anticuerpo que se une a la fracción  $\beta A$ . 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 mediante ACTH y espontánea. Para la evaluación de los receptores se omitieron los folículos atrésicos. En los grupos de persistencia folicular se evaluaron los folículos terciarios de todos los grupos así como los folículos persistentes de los grupos de 5, 10 y 15 días de persistencia.

#### 3.4.2. Western blot

Esta técnica fue utilizada para la determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados y para la semicuantificación de las diferentes isoformas de foliculostatina. Se realizó la electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida, 29:1) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). El tamaño del poro para el gel de resolución se correspondió con una concentración de acrilamida del 12%. Se utilizaron homogeneizados de pared folicular de folículos terciarios pequeños, grandes y quísticos (Parrott y Skinner, 1998).

Se prepararon las muestras diluyendo 1:2 con buffer de muestra en condiciones reductoras para SDS-PAGE, y posteriormente se incubaron en baño termostático a 95°C por 5 minutos. Se utilizó una cuba vertical y el buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1 % de SDS, pH 8,3. Según los valores obtenidos de la cuantificación por fluorimetría, se sembraron 40  $\mu$ g de proteínas y se realizó la electroforesis a 25 mA para el gel de apilamiento, y se continuó a 50 mA hasta la visualización del frente de corrida en el borde inferior del gel de resolución. Los marcadores de peso molecular (PM) que se utilizaron se detallan en la figura 20.

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

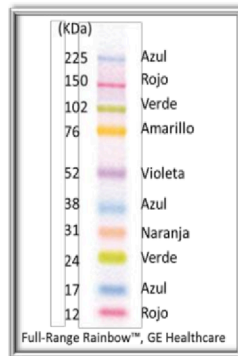


Figura 20: Marcadores de PM para SDS-PAGE, amplio espectro (Rainbow™, RPN800E, GE Healthcare).

efectividad de la transferencia. Una vez verificada, se procedió al lavado de la membrana y posterior guardado de la misma a 4-6°C hasta proceder a la inmunodetección de las proteínas detalladas en la tabla 4.

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

1. Bloqueo los sitios de unión inespecíficos con TBS-T leche 5 %, 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.
2. Lavado a temperatura ambiente con TBS-T:
  - Dos lavados rápidos
  - Un lavado de 15 minutos
  - Dos lavados de 5 minutos
3. Incubación con el anticuerpo primario durante toda la noche en heladera. Para la dilución del anticuerpo primario se utilizó buffer de bloqueo.

<b>Anticuerpos Primarios</b>	<b>Clon</b>	<b>Proveedor comercial</b>	<b>Dilución</b>
<b>Ligandos</b>			
TGF- $\beta$ 1	Policlonal	Santa Cruz (Sc-146)	1:200
TGF- $\beta$ 2	Policlonal	Santa Cruz (Sc-90)	1:200
TGF- $\beta$ 3	Policlonal	Santa Cruz (Sc-83)	1:200
Activina	Monoclonal E4	Serotec (MCA95OST)	1: 100
Inhibina	Monoclonal R1	Serotec (MCA9515T)	1: 50
Foliculostatina	Policlonal	Abcam (ab 64490)	1:100
Actina (JLA20)	Monoclonal NS1	DHSB	1:100
<b>Receptores</b>			
ARIIB	Monoclonal IgG2A	Abcam (ab 76940)	1:1000
TGF- $\beta$ RI	Policlonal	Abcam (ab 31013)	1:15
TGF- $\beta$ RIII	Policlonal	Abcam (ab28366)	1:25

Tabla 4: Detalle de los anticuerpos primarios utilizados en la técnica de western blot.

4. Lavado a temperatura ambiente con TBS-T:

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

5. Incubación con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Para la dilución se utiliza buffer de bloqueo. Los datos y las condiciones de uso de estos anticuerpos están descriptos en la tabla 5.

<b>Anticuerpos Secundarios</b>	<b>Proovedor comercial</b>	<b>Dilución</b>
<b>IgG anti-rabbit Biotinilado</b>	<b>LETHAM-B1</b>	<b>1:2000</b>
<b>IgG anti-mouse Biotinilado</b>	<b>LETHAR-B1</b>	<b>1:1000</b>

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

6. Lavado a temperatura ambiente con TBS-T:

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

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

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

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

10. Lavado con agua destilada.

11. Secado de la placa a temperatura ambiente.

Para la evaluación de posibles variaciones en la expresión de las isoformas de foliculostatina en folículos ováricos de bovinos con COD se detectaron las bandas correspondientes a las isoformas de 31, 35, 37, 41 y 65 kDa en muestras de pared de folículos terciarios controles pequeños, medianos y grandes, y de quistes de animales con COD bovina. Se procedió de la misma forma que para la determinación de especificidad detectando foliculostatina y utilizando  $\beta$ -actina como normalizador. En la tabla 4, mostrada anteriormente, se describen los anticuerpos primarios utilizados para este fin.

#### **3.4.3. Ensayo por inmunoadsorción 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 LF, de folículos terciarios y quistes foliculares, 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 del lavado, se colocó el anticuerpo conjugado con biotina y se incubó durante 1 hora. Finalmente, luego de los lavados correspondientes, se colocó estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa y se realizó una incubación durante 30 minutos. La reacción fue evidenciada mediante el revelado con una solución de TMB como cromógeno, el cual fue incubado durante 15 minutos. La reacción fue detenida por la incorporación de  $H_2SO_4$  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.

#### **3.4.4. Análisis digital de imágenes**

Las imágenes de los preparados histológicos fueron digitalizadas mediante una cámara color de video CCD (Motic 2000, Motic China Group, China) montada a un microscopio de luz convencional (Olympus BH-2, Olympus Co., Japón), utilizando un objetivo de 40× de aumento. La resolución de las imágenes fue establecida en 1200 x 1600 pixeles. 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 (Salveti y col., 2010).

### 3. Materiales y Métodos

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



#### 3.5. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

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

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 11.0.1 para Windows. La concentración sérica de hormonas en los distintos grupos de animales durante la inducción de los modelos (COD inducida mediante ACTH y persistencia en relación a sus respectivos controles) fue estudiada mediante análisis multivariante de varianza (MANOVA) para determinar los efectos del tiempo y del tratamiento y la interacción tiempo por tratamiento.

Los niveles hormonales en suero y líquido folicular en los distintos grupos de animales (COD inducida mediante ACTH, COD espontánea, persistencia, en relación a sus respectivos controles) al momento de la toma de muestras, fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan. El nivel de significancia utilizado para ANOVA fue  $p < 0,05$ .

Para evaluar en los casos de COD la expresión proteica mediante inmunohistoquímica, se realizó un análisis de la varianza de los datos aplicando pruebas paramétricas para varios grupos (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan. Se analizaron por separado las estructuras foliculares análogas (folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos). También se compararon los quistes (inducidos o espontáneos) con los folículos terciarios y atrésicos del grupo control (como estructuras similares de referencia). Para el modelo de persistencia se realizó el análisis estadístico de la inmunomarcación de folículos terciarios y persistentes de los distintos grupos planteados aplicando ANOVA y como post-test: Duncan. Además se compararon las estructuras terciarias y persistentes para cada grupo experimental mediante el t Student. Los valores se expresaron como el promedio  $\pm$  el desvío estándar (DE). Por otro lado, se realizó Dunnett para comparar los folículos terciarios controles contra el resto de las estructuras.

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

## ***4.RESULTADOS***



## 4.1. RESULTADOS DE PROCEDIMIENTOS EFECTUADOS CON ANIMALES

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

Se obtuvieron ovarios con quistes espontáneos de 10 vacas Holando Argentino en lactancia. Estos folículos quísticos presentaron un diámetro promedio de  $35\pm 6$  mm con una morfología compatible a la descrita en la bibliografía (Silvia y col., 2002; Wiltbank y col., 2002; Bartolomé y col., 2005; Vanholder y col., 2006). Esto fue definido mediante diagnóstico ecográfico y tacto rectal. 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 y col., 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 (figura 21). Estos resultados ya han sido publicados previamente (Amweg y col., 2013).

Se obtuvo información brindada por el personal de los establecimientos que colaboraron con sus animales en el ensayo: edad, número de lactancias, padre, madre, producción de leche, fecha del último parto, producción de la lactancia anterior, fecha del último celo, condición corporal, patologías, fecha de diagnóstico del quiste, época del año, intervalo parto-diagnóstico, hallazgos a la ecografía, tratamiento, respuesta al tratamiento y relación Energía/Proteína de la dieta. Dichos datos fueron destinados a estudios paralelos a la presente tesis.

Por otro lado pudieron obtenerse muestras de LF de quistes foliculares de animales con COD espontánea de 15 animales y muestras de LF de folículos preovulatorios de 10 animales controles. Estas muestras se destinaron a la evaluación de los perfiles hormonales.



Figura 21: (A) Ovarios de una vaca con COD espontánea obtenidos mediante ovariectomía bilateral. (B) Imagen ecográfica de un quiste espontáneo en el momento de la aspiración folicular guiada por ecografía.

#### 4.1.2. Inducción de la enfermedad quística ovárica mediante ACTH

Las determinaciones hormonales y la caracterización morfológica de los ovarios provenientes del modelo experimental, fueron presentadas en una tesis anterior (Salveti y col., 2010) y publicados en revistas de alto impacto (Amweg y col., 2013). La inducción exitosa de COD por ACTH fue confirmada por la morfología ovárica y la concentración hormonal. Todos los animales tratados con ACTH respondieron a dicho tratamiento con la formación de un quiste folicular con una capa completa de células de la granulosa. El día inicial de la detección del quiste fue en promedio  $26 \pm 3$  mm y el diámetro promedio al momento de la ovariectomía fue de  $25 \pm 2$  mm. Estos folículos quísticos se mostraron a la ecografía como estructuras ováricas uniformemente anecogénicas, con una pared  $\leq 3$  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 20). 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  $12 \pm 2$  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.

Se realizó una comparación del tamaño folicular entre folículos preovulatorios (grupo control), quistes inducidos mediante ACTH (grupo COD inducida) y quistes espontáneos (grupo COD espontánea) que 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 22).

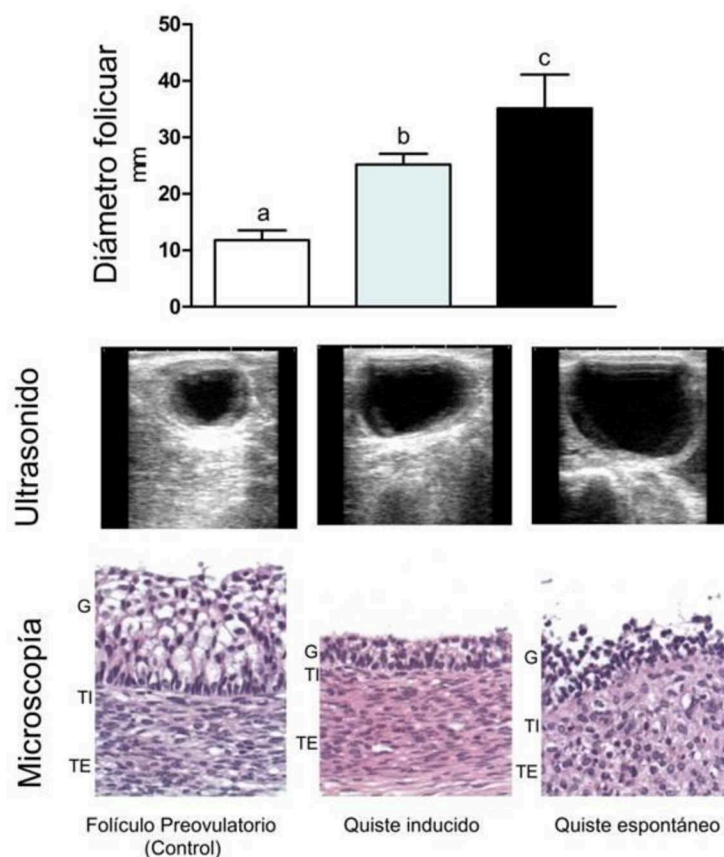


Figura 22: Características morfológicas de los folículos preovulatorios y quísticos al momento de la extracción mediante ovariectomía. Se observa el diámetro folicular promedio, imágenes de ultrasonido y características histológicas. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). G: granulosa; TI: teca interna, TE: teca externa.

Las determinaciones hormonales y la caracterización morfológica de los ovarios provenientes del modelo experimental, corroboraron la condición hormonal descrita en la bibliografía (Amweg y col., 2013).

#### 4.1.2.1 Niveles de hormonas esteroides durante la inducción

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 17  $\beta$ -estradiol, progesterona y cortisol (figura 23).

Las concentraciones de 17  $\beta$ -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.

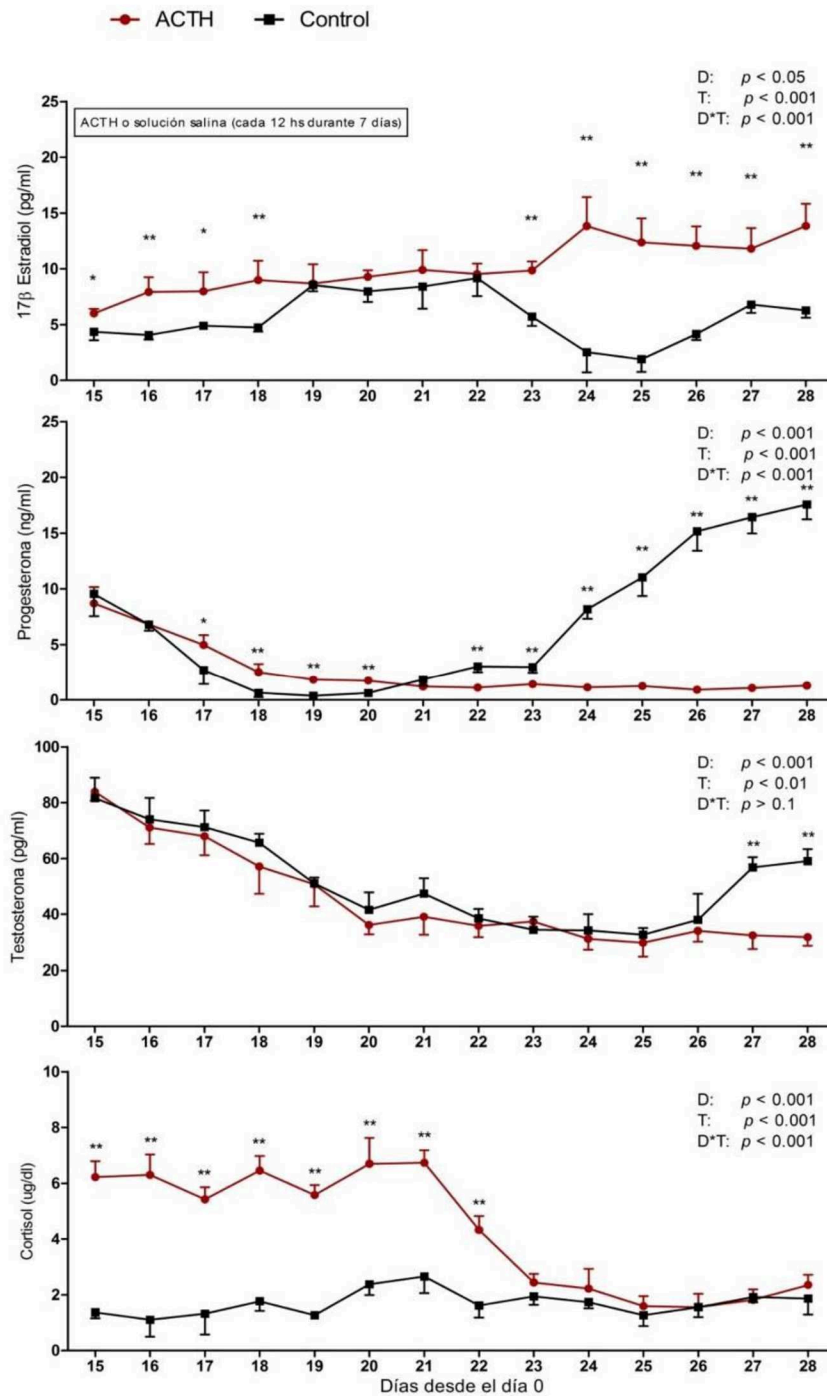


Figura 23: Concentraciones séricas de 17β-estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en animales de los grupos control y tratados con ACTH durante el protocolo experimental. Los resultados expresan la media  $\pm$  SEM. Los datos se analizaron de acuerdo al tiempo transcurrido después del día de 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.

### **4.1.2.2. Concentración de hormonas esteroides en suero y líquido folicular al momento de la ovariectomía.**

Los niveles de 17  $\beta$ -estradiol, progesterona, testosterona y cortisol, en suero y LF 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 24. 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 17  $\beta$ -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 LF, las concentraciones de 17  $\beta$ -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.

### **4.1.3. Inducción de folículos persistentes mediante dispositivos de progesterona**

Durante el protocolo descrito previamente, fue posible evidenciar el desarrollo de folículos de hasta 15 días de persistencia en el 95% de los animales tratados. Los folículos se observaron como estructuras anecogénicas presentes en la misma posición y ovario. Además, se comprobó el crecimiento de estas estructuras hasta un diámetro cercano al del folículo ovulatorio e incluso superior, considerándose éstos como quistes cuando presentaron más de 6 días de persistencia y alcanzaron un diámetro mayor a 20 mm. Asimismo, con el análisis de las imágenes ecográficas se verificó el correcto funcionamiento del protocolo hormonal, la comprobación de la ovulación (controles) y de la persistencia folicular (tratados) durante todo el protocolo. En la figura 25 se representan las características morfológicas y la relación entre espesor de granulosa y teca en folículos preovulatorios y persistentes, y en la figura 26 se demuestra la relación



entre el diámetro máximo folicular entre folículos persistentes y dominantes preovulatorios.

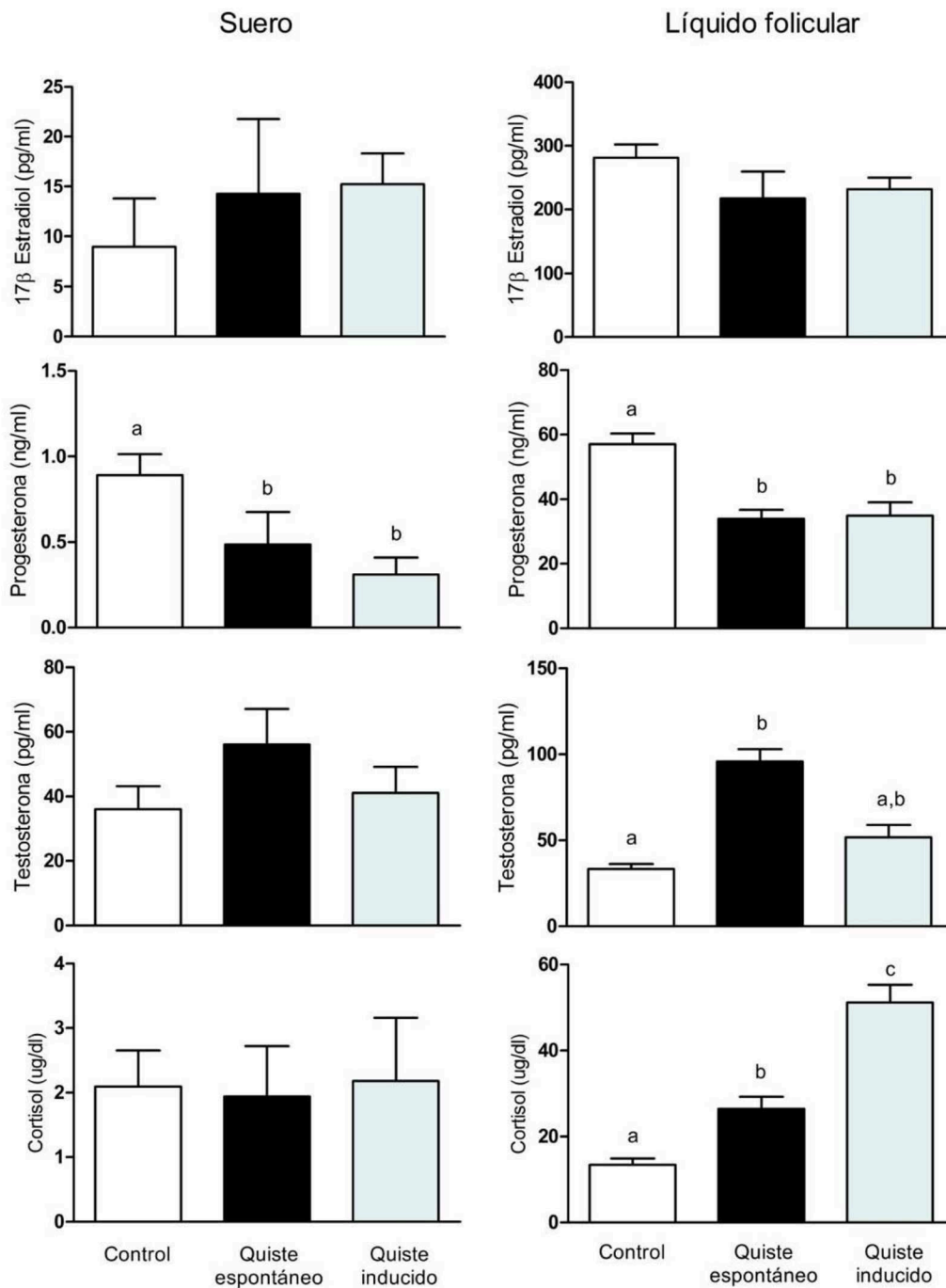


Figura 24: Concentración de 17  $\beta$ -estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en suero y líquido folicular obtenido al momento de la ovariectomía de animales control, tratados con ACTH y animales COD espontánea. Las barras representan la media  $\pm$  SEM para cada hormona en suero o líquido folicular. Barras con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

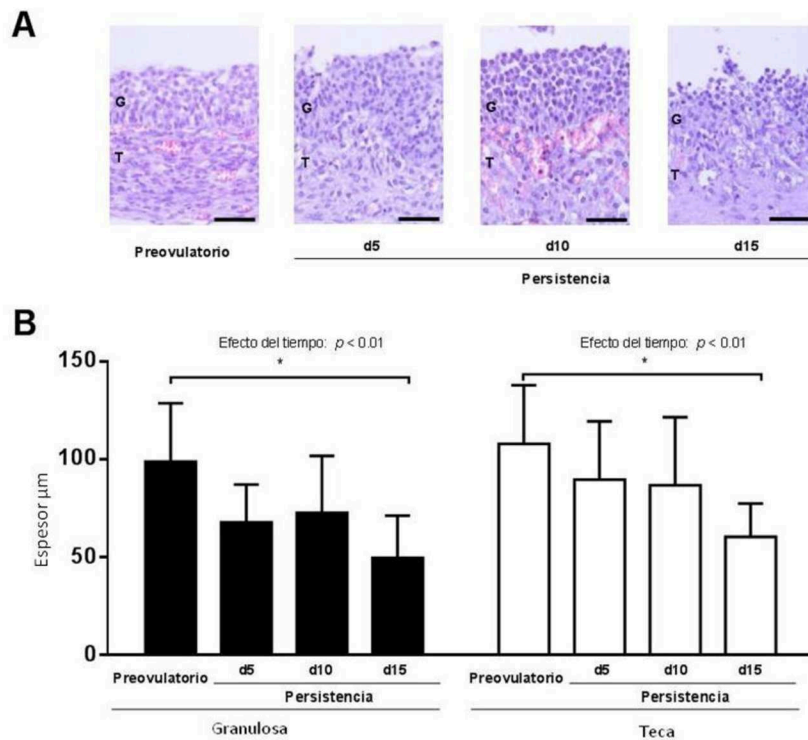


Figura 25: Características morfológicas de los folículos preovulatorios (control) y con 5, 10 y 15 días de persistencia (tratados) al momento de la ovariectomía (A). Se observa el espesor de las capas granulosa y teca interna (B). Las barras representan la media  $\pm$  DE, aquellas con asterisco son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). G: granulosa; T: teca.

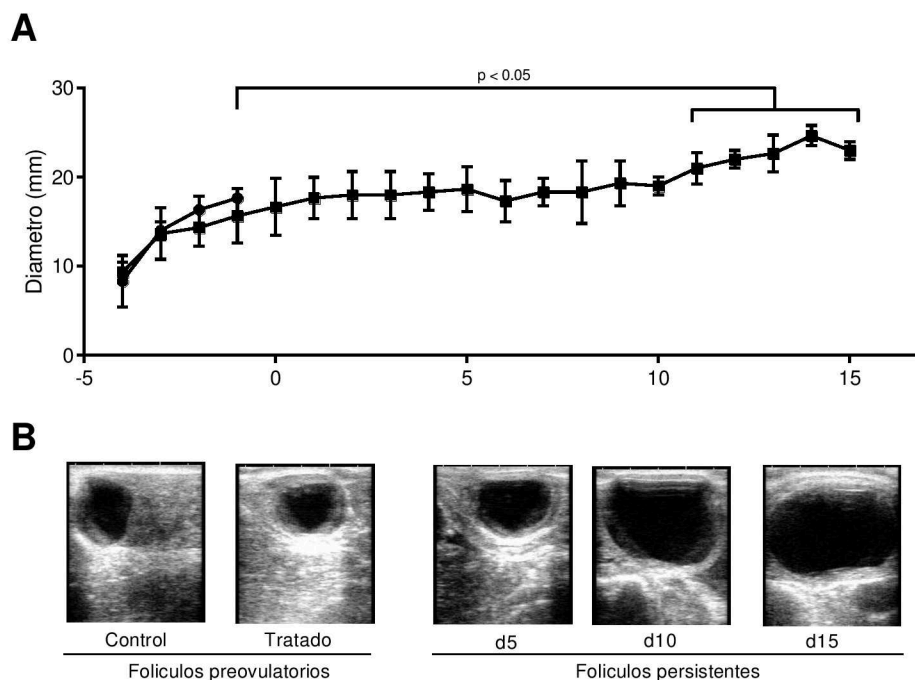


Figura 26: A: Diámetro máximo de los folículos dominantes y persistentes en vacas del grupo control ( $\bullet$ ) y tratado ( $\blacksquare$ ) respectivamente. Media ( $\pm$  SEM) del diámetro folicular interno y diferencias con el correspondiente al folículo preovulatorio en el grupo control. B: Imágenes ecográficas representativas de los folículos preovulatorios y persistentes de 5, 10 y 15 días.

#### 4.1.3.1. Perfil de LH a lo largo del modelo de inducción de folículos persistentes

En cuanto a la evaluación de la concentración de LH durante el desarrollo de los folículos persistentes, en la figura 27 se expresan los perfiles representativos de LH en el control (A, C, D) y las vacas tratadas con progesterona (B, E, F, G, H). Para el pico de LH, las muestras de sangre se recogieron cada 2 h durante 48 h, desde 56 h a 104 h posteriores a la inyección de PGF2 $\alpha$  (A, B). Para la frecuencia de pulsos de LH, las muestras de sangre se recogieron cada 12 min durante 8 h, a partir de 48 h posteriores a la inyección de PGF2 $\alpha$  para la fase folicular (C, E), en el día 5, 10 y 15 de la persistencia folicular (F, G, H, respectivamente) y en el día 10 después de la ovulación, durante la mitad de la fase lútea (D).

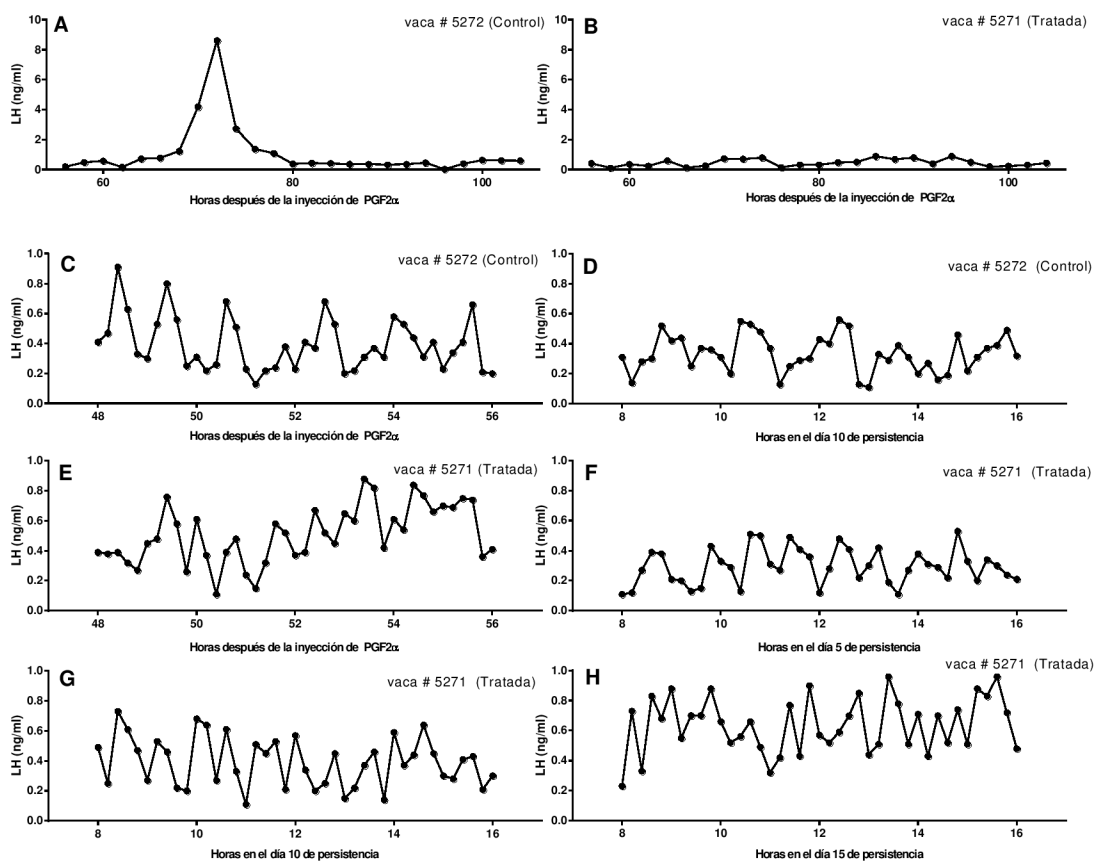


Figura 27: Perfiles representativos de LH en el control (A, C, D) y las vacas tratadas con progesterona (B, E, F, G, H).

#### 4.1.3.2. Concentración de hormonas esteroides y FSH en suero a lo largo de la inducción de folículos persistentes

En la figura 28 se representan las concentraciones medidas en suero de 17  $\beta$ -estradiol, progesterona y FSH en vacas controles (●) y tratadas (■). Se muestra la media  $\pm$  SEM. Los datos se analizaron de acuerdo con el momento de la ovulación en los controles (día 0). D: efecto del día de protocolo; T: efecto del tratamiento; D \* T: interacción día por tratamiento.

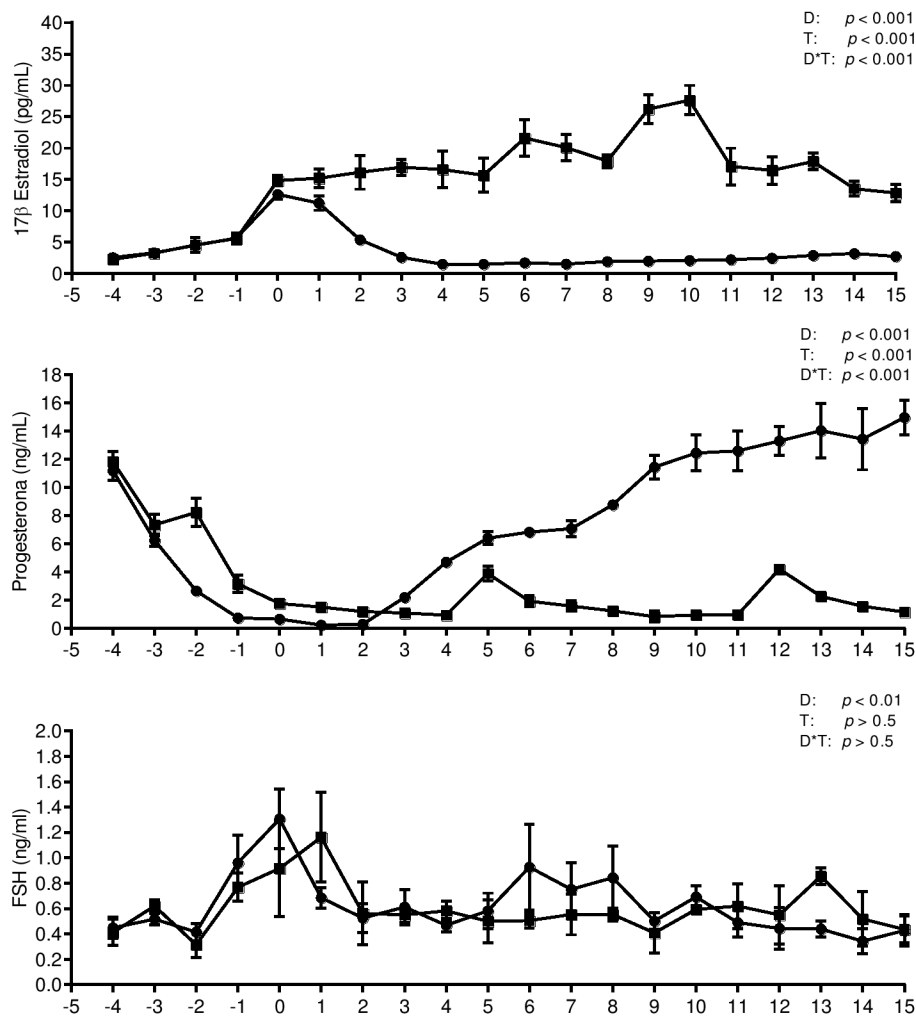


Figura 28: Concentraciones séricas de 17  $\beta$ -estradiol, progesterona y FSH en vacas controles (●) y tratadas (■).

#### 4.1.3.3. Concentración de hormonas esteroides en suero y LF en animales con folículos persistentes al momento de la ovariectomía.

A continuación, en la figura 29, se esquematiza la concentración de  $17\beta$ -estradiol, progesterona, 17-hidroxiprogesterona y testosterona en suero y LF obtenido al momento de la ovariectomía de animales control y tratados con progesterona (muestras obtenidas a los 5, 10 y 15 días de persistencia). Las barras representan la media  $\pm$  DEM para cada hormona en suero o LF ( $p < 0,05$ ).

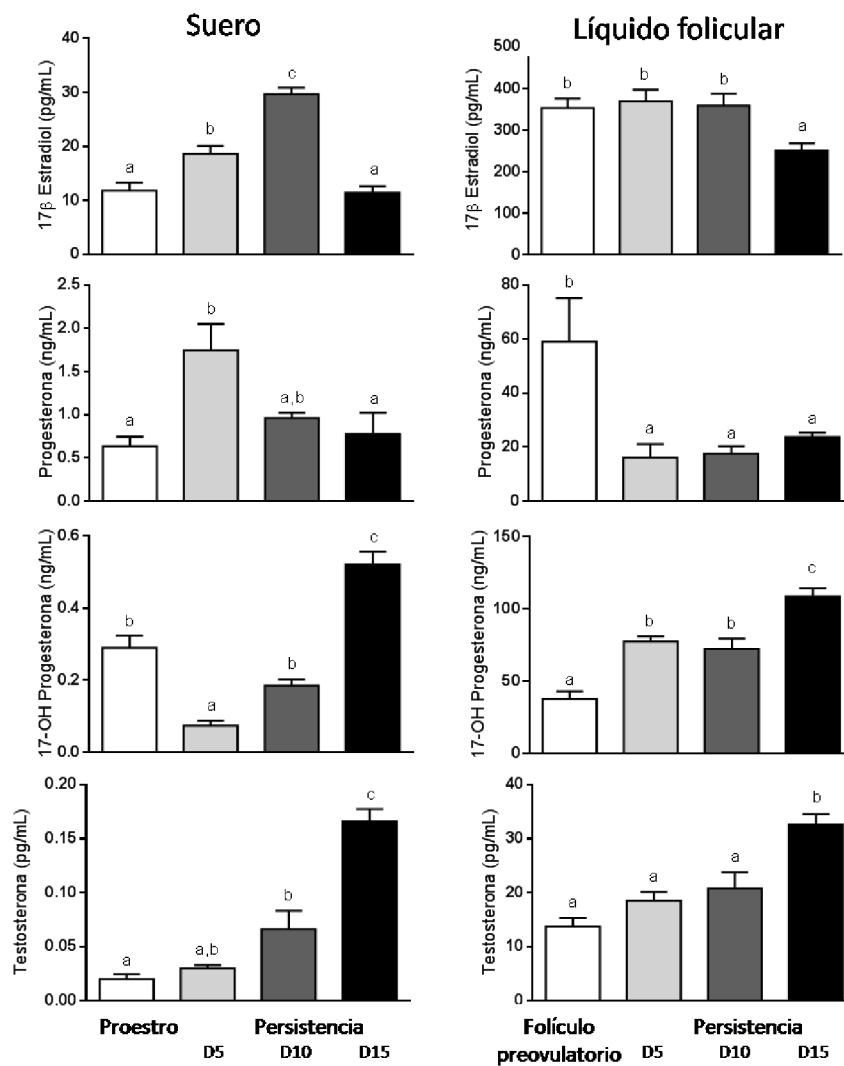


Figura 29: Concentración de hormonas esteroides en suero y líquido folicular en animales con folículos persistentes.

## **4.2. EXPRESION DE COMPONENTES DE LA SUPERFAMILIA DE TGF- $\beta$ Y PROTEINAS RELACIONADAS EN COD ESPONTANEA E INDUCIDA**

### **4.2.1. Expresión de las isoformas TGF- $\beta$**

Las diferentes isoformas de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3) fueron detectadas mediante la técnica de inmunohistoquímica simple. Esta técnica se efectuó sobre ovarios de vacas con quistes espontáneos e inducidos mediante ACTH, conjuntamente con ovarios de vacas control obtenidos mediante ovariectomía.

Por medio de estos ensayos se evaluó la expresión de dichas proteínas a lo largo de los distintos estadios del desarrollo folicular así como 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.

La corroboración de la especificidad de los anticuerpos usados para inmunohistoquímica se realizó mediante western blot. De esta manera se confirmó que los anticuerpos se unieron a proteínas específicas y no generaron reacciones cruzadas. Las isoformas de TGF- $\beta$  se expresan de manera específica con los anticuerpos utilizados, como se muestra en las figuras 30, 36 y 42.

#### **4.2.1.1. TGF- $\beta$ 1**

El TGF- $\beta$ 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 interna (figura 30).

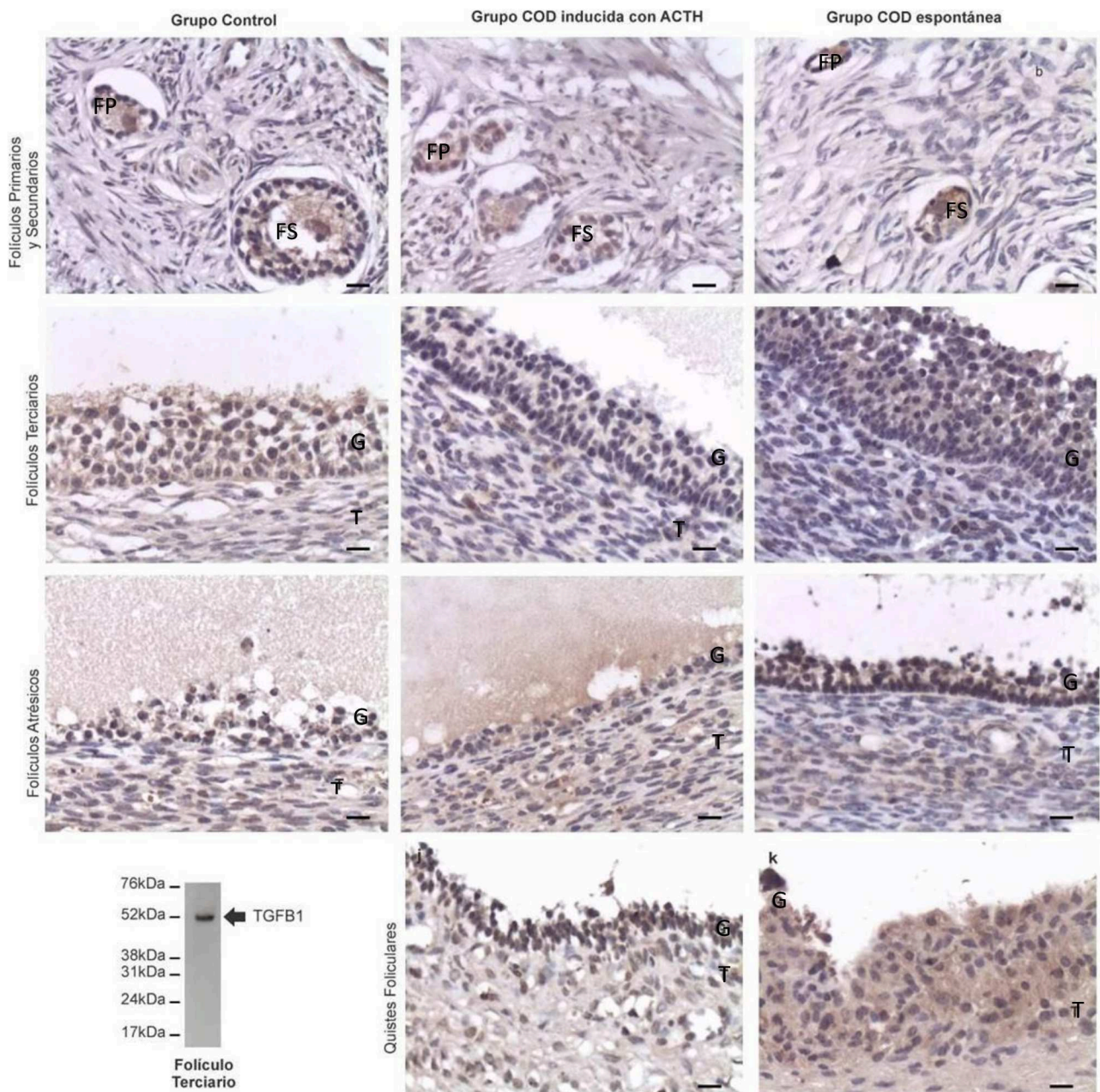


Figura 30: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **TGF-β1** en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea. La barra indica 25µm. G: granulosa, T: Teca interna, FP: folículo primario, FS: folículo secundario. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular del TGF-β1 (52 kDa).

La figura 31 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, para una misma categoría folicular. Cuando

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

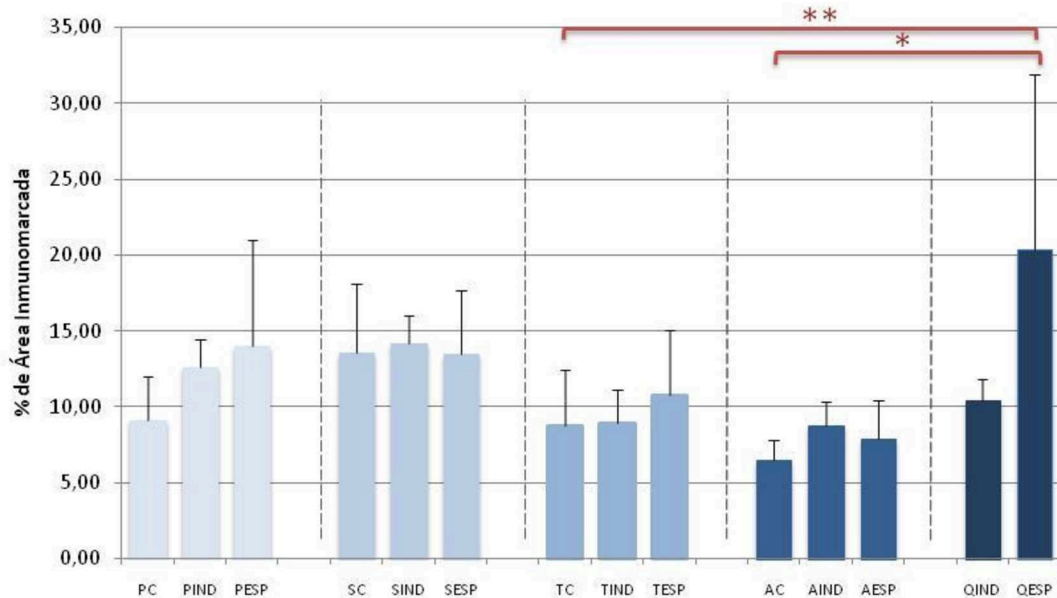


Figura 31: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF- $\beta$ 1** en células de la **granulosa** de varios tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (PC: Primarios Controles, PIND: Primarios Inducidos, PESP: Primarios Espontáneos; SC: Secundarios Controles, SIND: Secundarios Inducidos, SESP: Secundarios Espontáneos; TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos, TESP: Terciarios Espontáneos; AC: Atrésicos Controles, AIND: Atrésicos Inducidos, AESP: Atrésicos Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos). Los asteriscos indican diferencias significativas entre las diferentes estructuras indicadas por los extremos de los corchetes ( $p < 0,05$ ).

Con respecto a las células de la teca interna (figura 32), 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 ( $p < 0,05$ ).



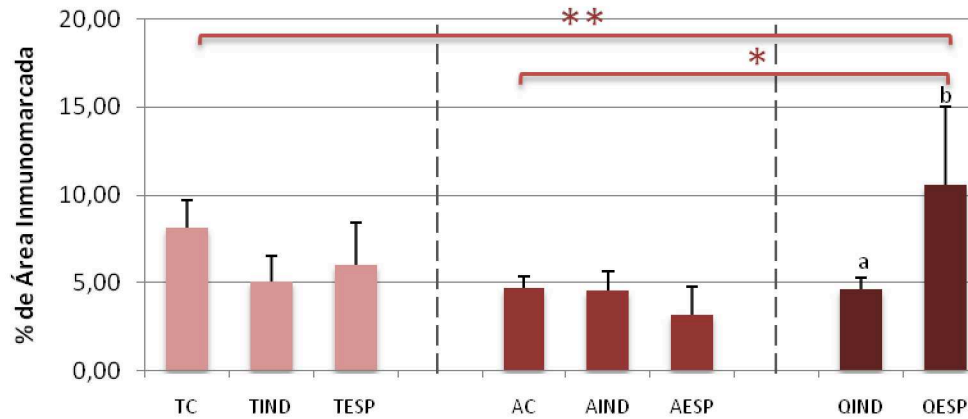


Figura 32: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β1** en células de la **teca interna** de diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos; TESP: Terciarios Espontáneos; AC: Atrésicos Controles, AIND: Atrésicos Inducidos, AESP: Atrésicos Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos). Los asteriscos indican diferencias significativas entre las diferentes estructuras señaladas por los extremos de los corchetes ( $p < 0,05$ ).

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 el grupo control (figura 33) se observó una moderada expresión de esta proteína en la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares evidenciándose la menor marcación en la teca interna de los folículos atrésicos respecto a 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 una marcación intermedia, sin diferenciarse de los dos tipos de estructuras previamente mencionadas.

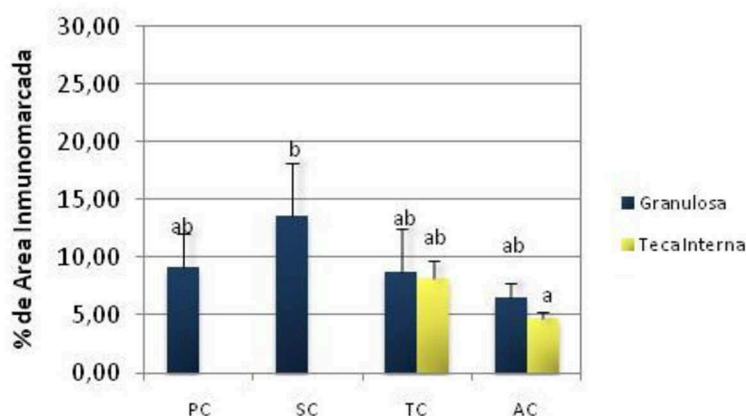


Figura 33: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β1** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo **control (C)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En el caso del grupo con COD inducida mediante ACTH (figura 34), la menor marcación fue observada en la teca interna de folículos terciarios, atrésicos y quísticos,

seguidos por la granulosa de los mismos, y finalmente por los folículos primarios y secundarios, quienes mostraron el mayor porcentaje de área inmunomarcada.

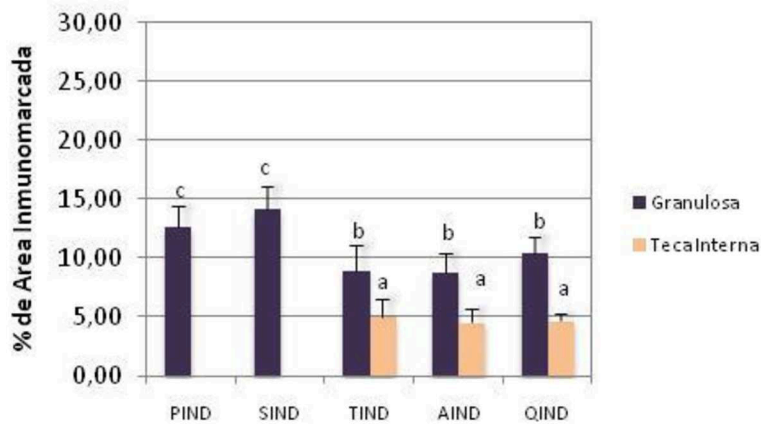


Figura 34: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β1** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con **COD inducida (IND)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Por último, el análisis de la expresión de TGF-β1 en el grupo con COD espontánea mostró que este factor de crecimiento tuvo mayor expresión en las células de la granulosa de los quistes que en el resto de las categorías, sin detectarse diferencias entre las diferentes poblaciones celulares (figura 35).

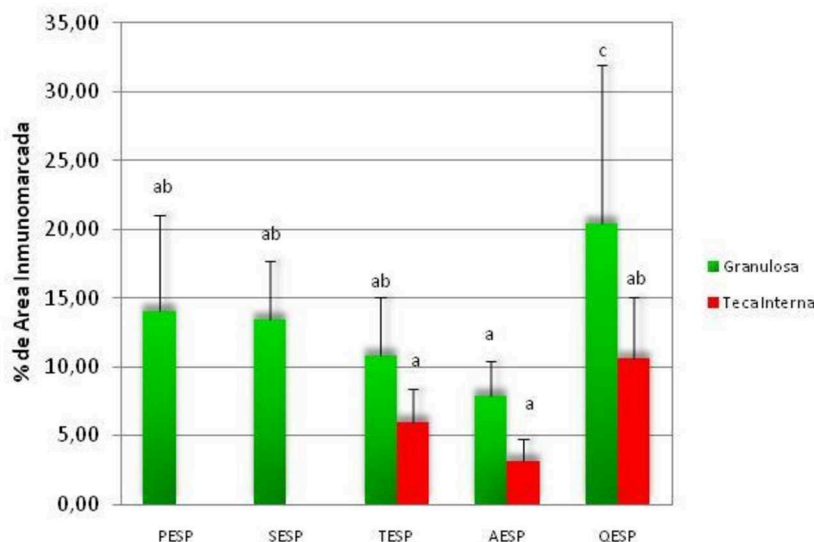


Figura 35: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β1** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con **COD espontánea (ESP)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.2. TGF-β2

La inmunodetección de TGF-β2 permitió corroborar su expresión citoplasmática en células de la granulosa y de la teca interna de las estructuras foliculares estudiadas (figura 36).

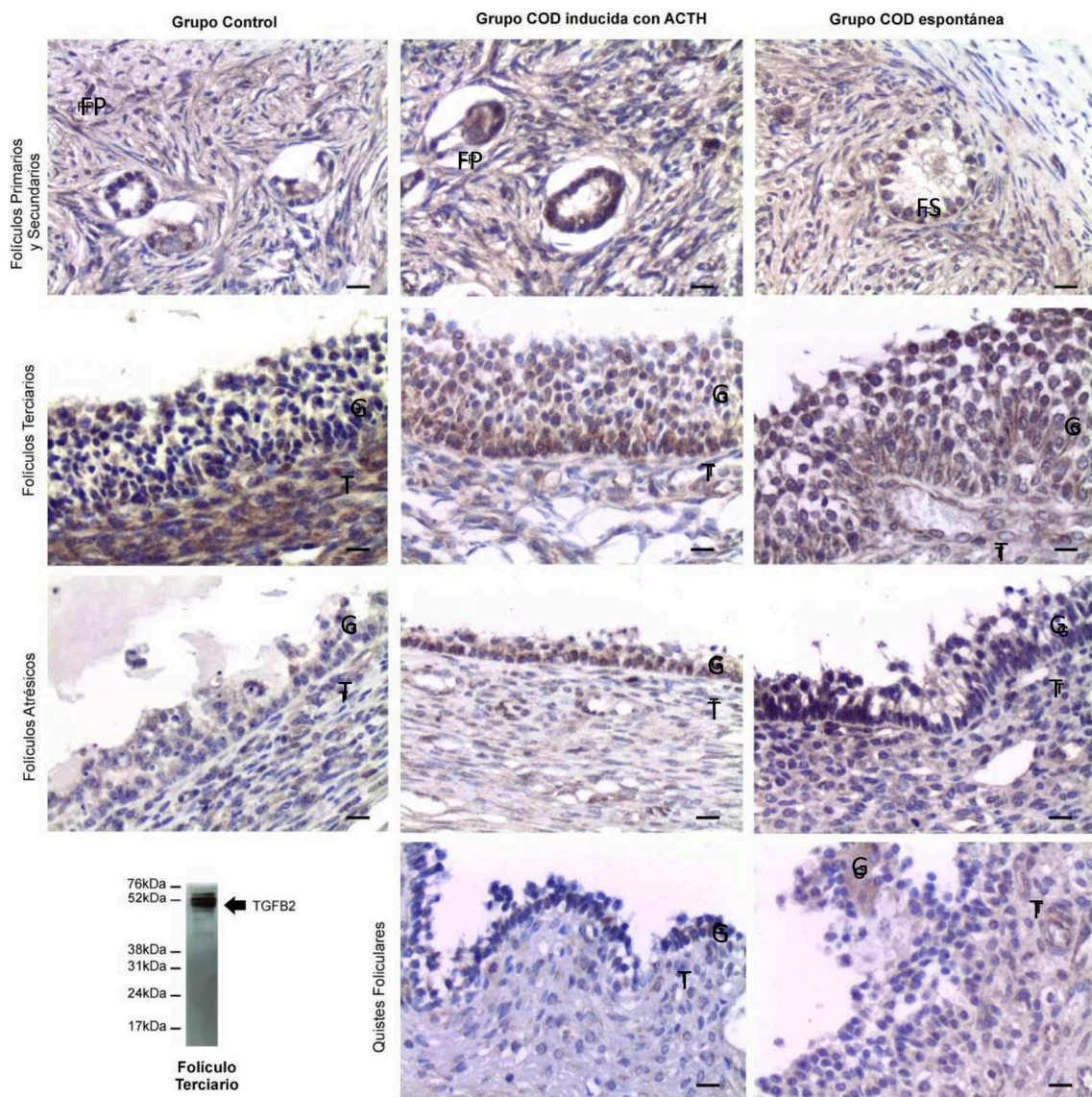


Figura 36: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **TGF- $\beta$ 2** en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea. La barra indica 25  $\mu$ m. G: granulosa, T: Teca interna, FP: folículo primario, FS: folículo secundario. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular del TGF- $\beta$ 2 (52 kDa).

Como se observa en la figura 37, el porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ 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 38), no se hallaron diferencias significativas entre las categorías foliculares estudiadas.

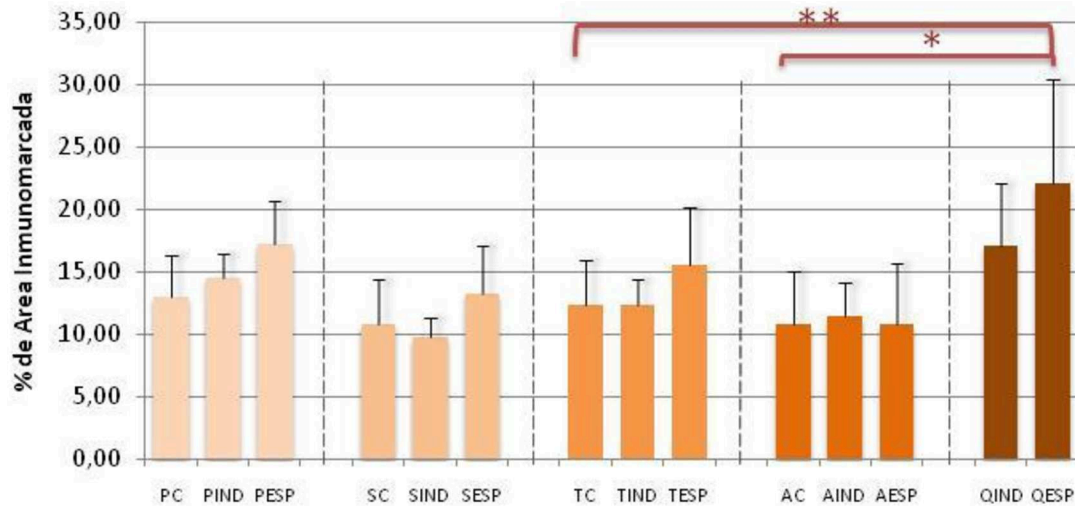


Figura 37: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β2** en células de la **granulosa** de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (PC: Primarios Controles, PIND: Primarios Inducidos, PESP: Primarios Espontáneos; SC: Secundarios Controles, SIND: Secundarios Inducidos, SESP: Secundarios Espontáneos; TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos; TESP: Terciarios Espontáneos; AC: Atrésicos Controles, AIND: Atrésicos Inducidos, AESP: Atrésicos Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos). Los asteriscos indican diferencias significativas entre las estructuras indicadas por los extremos de los corchetes ( $p < 0,05$ ).

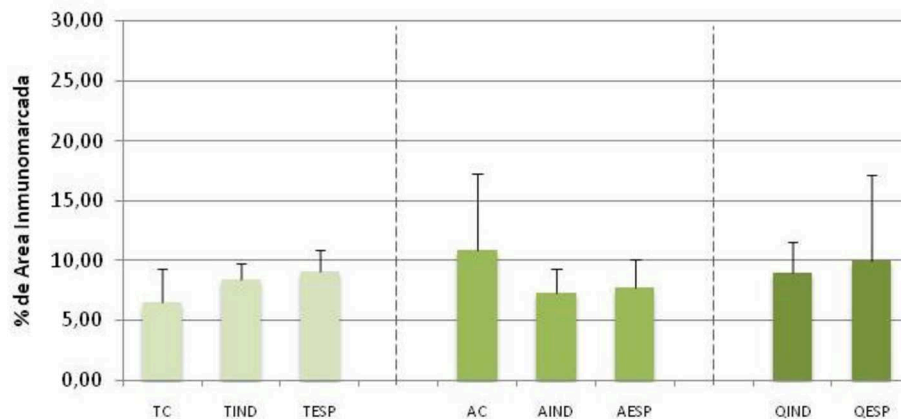


Figura 38: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β2** en células de la **teca interna** de diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos; TESP: Terciarios Espontáneos; AC: Atrésicos Controles, AIND: Atrésicos Inducidos, AESP: Atrésicos Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos).

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 39), que la menor marcación se obtuvo en la teca interna de los folículos terciarios en comparación con todas las estructuras estudiadas, mientras que no existieron diferencias significativas en el resto.

#### 4. Resultados

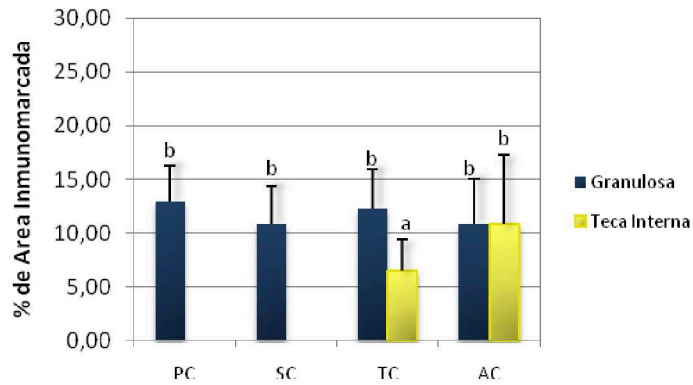


Figura 39: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β2** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo **control (C)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Para el grupo de animales con COD inducida (figura 40), la mayor expresión se observó en la granulosa de los folículos quísticos y primarios (sin diferencias entre ellos).

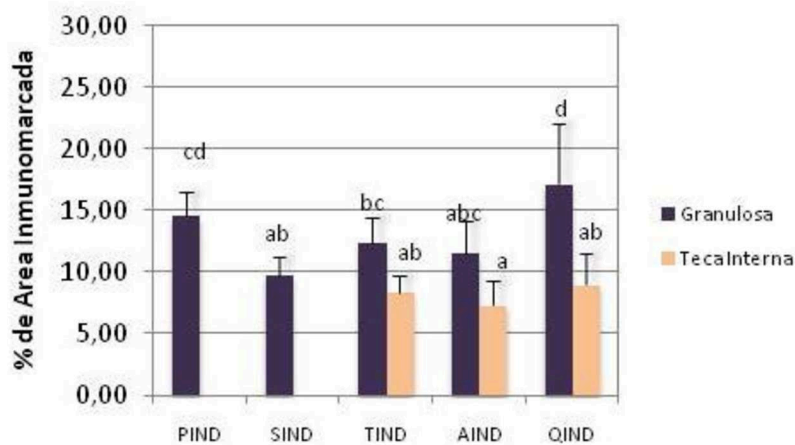


Figura 40: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β2** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con **COD inducida (IND)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Finalmente, para aquellos animales con COD diagnosticada a campo (figura 41), sólo se encontraron diferencias significativas en la expresión de TGF-β2 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 (primarios, secundarios, terciarios y atrésicos).

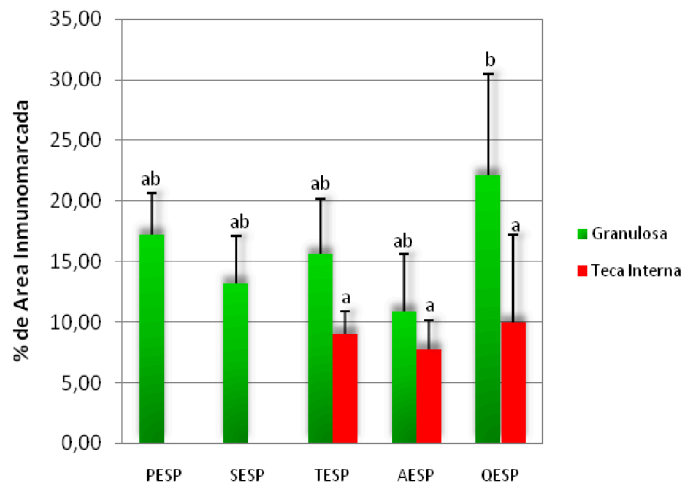


Figura 41: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β2** de los diferentes tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con **COD espontánea (ESP)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.3. TGF-β 3

El TGF-β3 mostró inmunomarcación citoplasmática en todos los estadios de desarrollo folicular. Tanto las células de la granulosa como las de la teca interna mostraron expresión de dicha proteína (figura 42).

No se observaron diferencias significativas en la expresión de TGF-β3 en las células de la granulosa para los folículos secundarios y terciarios entre los grupos estudiados, ( $p < 0,05$ ; figura 43). 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. En los folículos atrésicos, la mayor expresión fue evidenciada en el grupo control y la menor en el grupo inducido con ACTH, y finalmente dentro de los folículos quísticos, los pertenecientes al grupo con COD espontánea mostraron mayor expresión de TGF-β3 que el grupo con COD inducida. No se encontraron diferencias significativas de expresión cuando se compararon los quistes con las estructuras antrales de ovarios controles (terciarios y atrésicos).

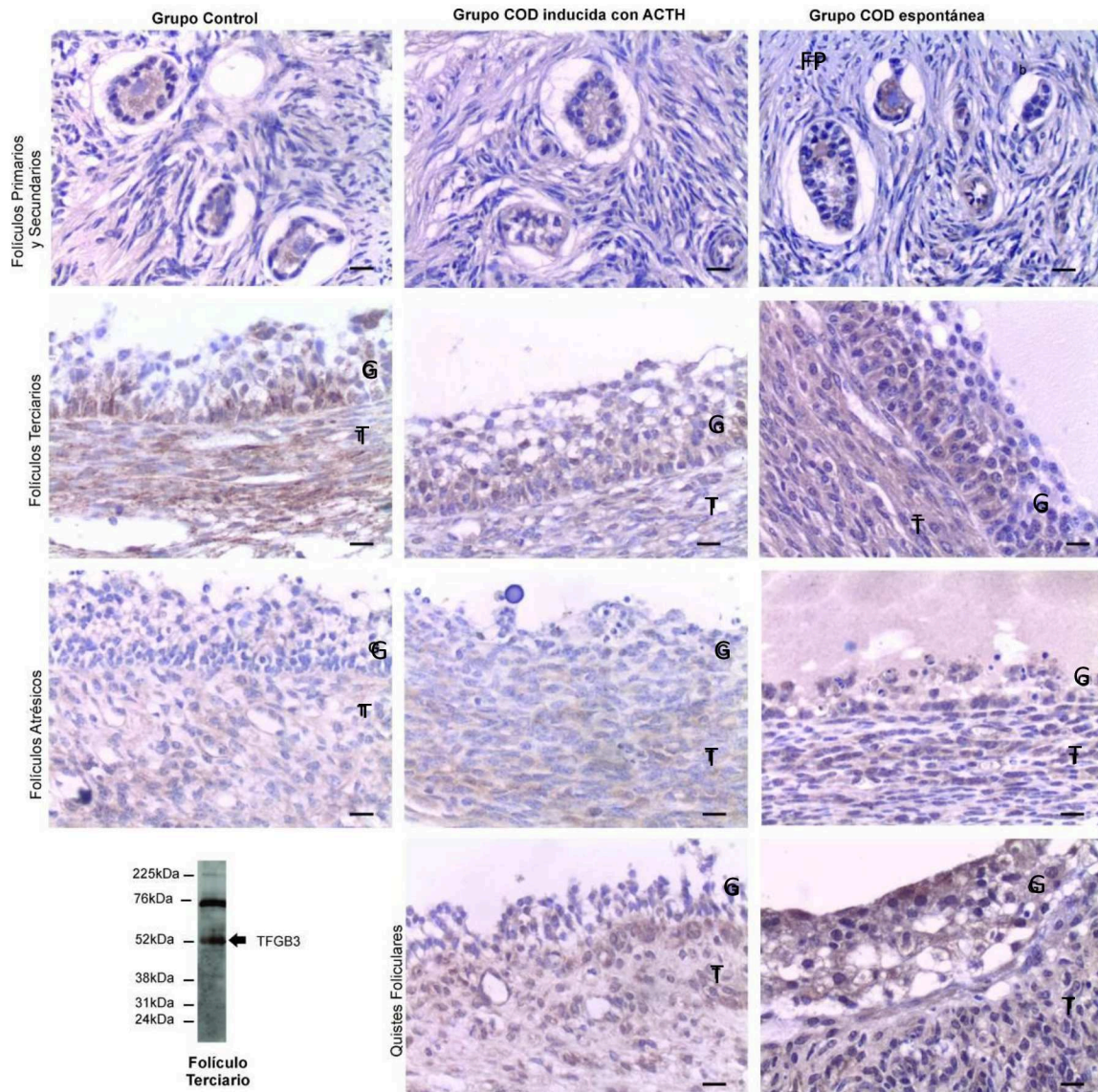


Figura 42: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **TGF- $\beta$ 3** en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea. La barra indica 25  $\mu$ m. G: granulosa, T: Teca interna, FP: folículo primario, FS: folículo secundario. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular correspondiente a TGF- $\beta$ 3 (52 kDa).

A su vez, en células de la teca interna (figura 44), los folículos terciarios fueron los únicos que mostraron diferencias significativas, siendo mayores los niveles de TGF- $\beta$ 3 en el grupo con COD inducida y menores en el grupo con COD espontánea ( $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas cuando se contrastaron los quistes con los folículos terciarios y atrésicos del grupo control.

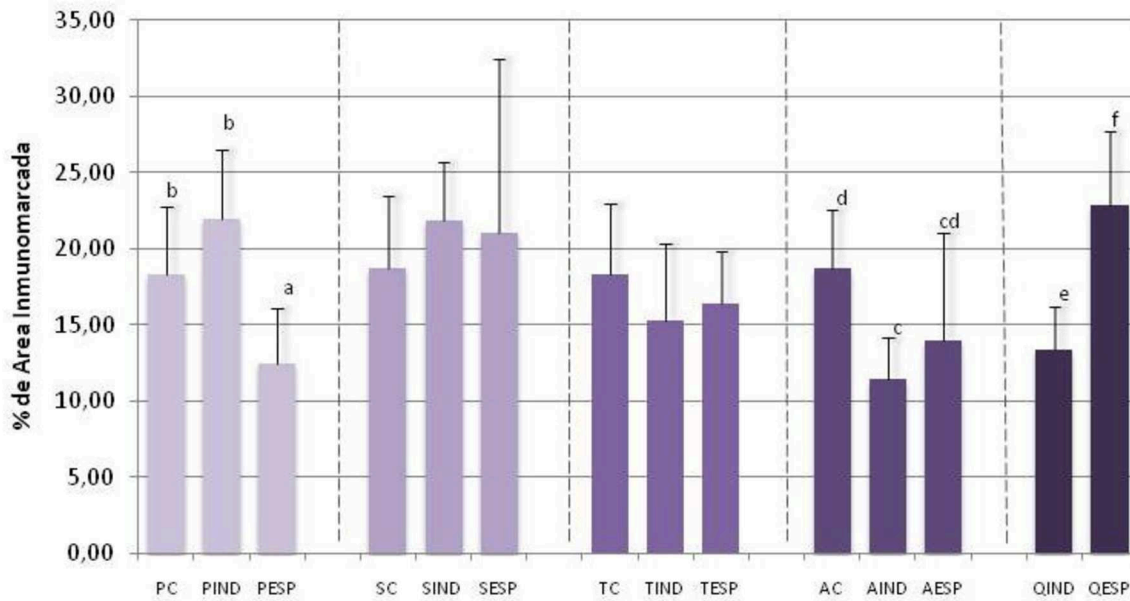


Figura 43: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β3** en células de la **granulosa** de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (PC: Primarios Controles, PIND: Primarios Inducidos, PESP: Primarios Espontáneos; SC: Secundarios Controles, SIND: Secundarios Inducidos, SESP: Secundarios Espontáneos; TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos; TESP: Terciarios Espontáneos; AC: Atrésicos Controles, AIND: Atrésicos Inducidos, AESP: Atrésicos Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos dentro de un mismo tipo de estructura folicular ( $p < 0,05$ ).

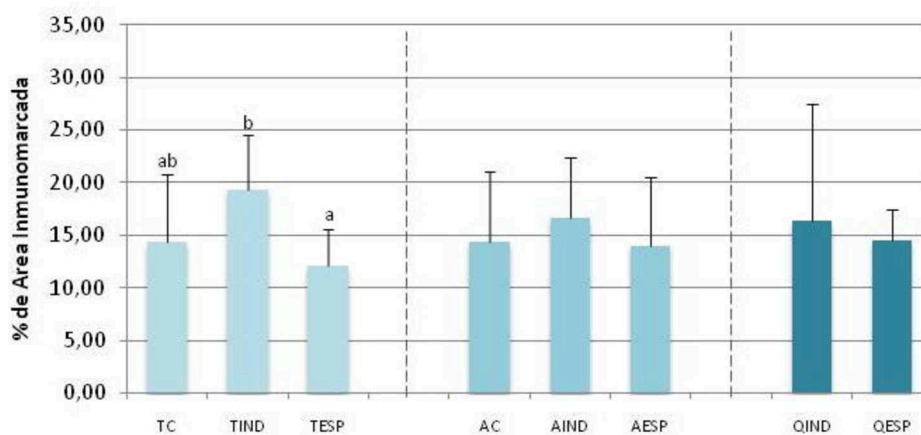


Figura 44: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β3** en células de la **teca interna** de de diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos; TESP: Terciarios Espontáneos; AC: Atrésicos Controles, AIND: Atrésicos Inducidos, AESP: Atrésicos Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos).

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 en el grupo control ( $p > 0,05$ ) (figura 45). En el grupo de COD inducida, las células de la granulosa mostraron una expresión similar en



#### 4. Resultados

folículos primarios, secundarios y terciarios, y una menor expresión en atrésicos y folículos quísticos que no difirió de la expresión detectada de folículos terciarios ( $p < 0,05$ ), mientras que las células de la teca mostraron los niveles de expresión similares a los encontrados en la granulosa (figura 46). En el grupo de COD espontánea, las células de la granulosa de folículos primarios mostraron expresión más baja, mientras que folículos secundarios, terciarios y quísticos mostraron similares niveles de expresión encontrándose diferencias entre los atrésicos y quísticos ( $p < 0,05$ ). En células de la teca, la expresión fue similar a la de las células de la granulosa de folículos primarios (figura 47).

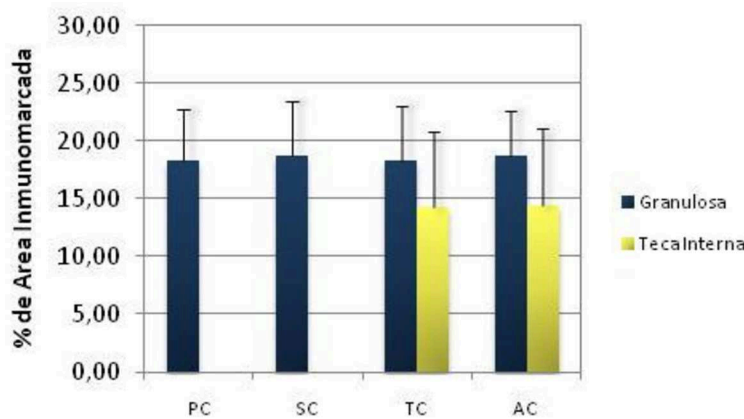


Figura 45: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β3** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del grupo **control (C)**.

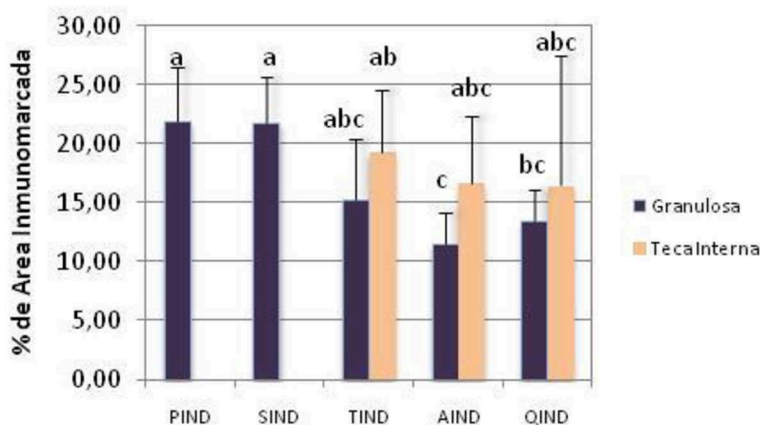


Figura 46: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β3** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con **COD inducida (IND)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

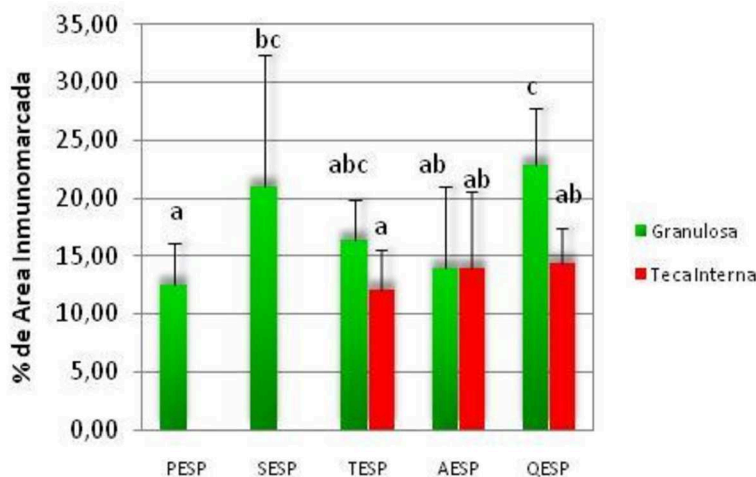


Figura 47: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β3** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con **COD espontánea (ESP)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2. Expresión de activina, inhibina y foliculostatina

La inmunodetección de estas proteínas fue llevada a cabo manera similar a lo realizado para las isoformas de TGF- $\beta$ . De la misma manera que para la subfamilia TGF- $\beta$ , se corroboró para activina, inhibina y foliculostatina mediante inmunoblot que los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica detectaran la proteína de manera específica.

##### 4.2.2.1. Activina

La inmunomarcación de activina se observó en el citoplasma de todos los estadios foliculares estudiados (figura 48).

En la figura 49 se muestra la expresión de activina en células de la granulosa en las estructuras analizadas (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) con los folículos terciarios y atrésicos del grupo control.

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

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

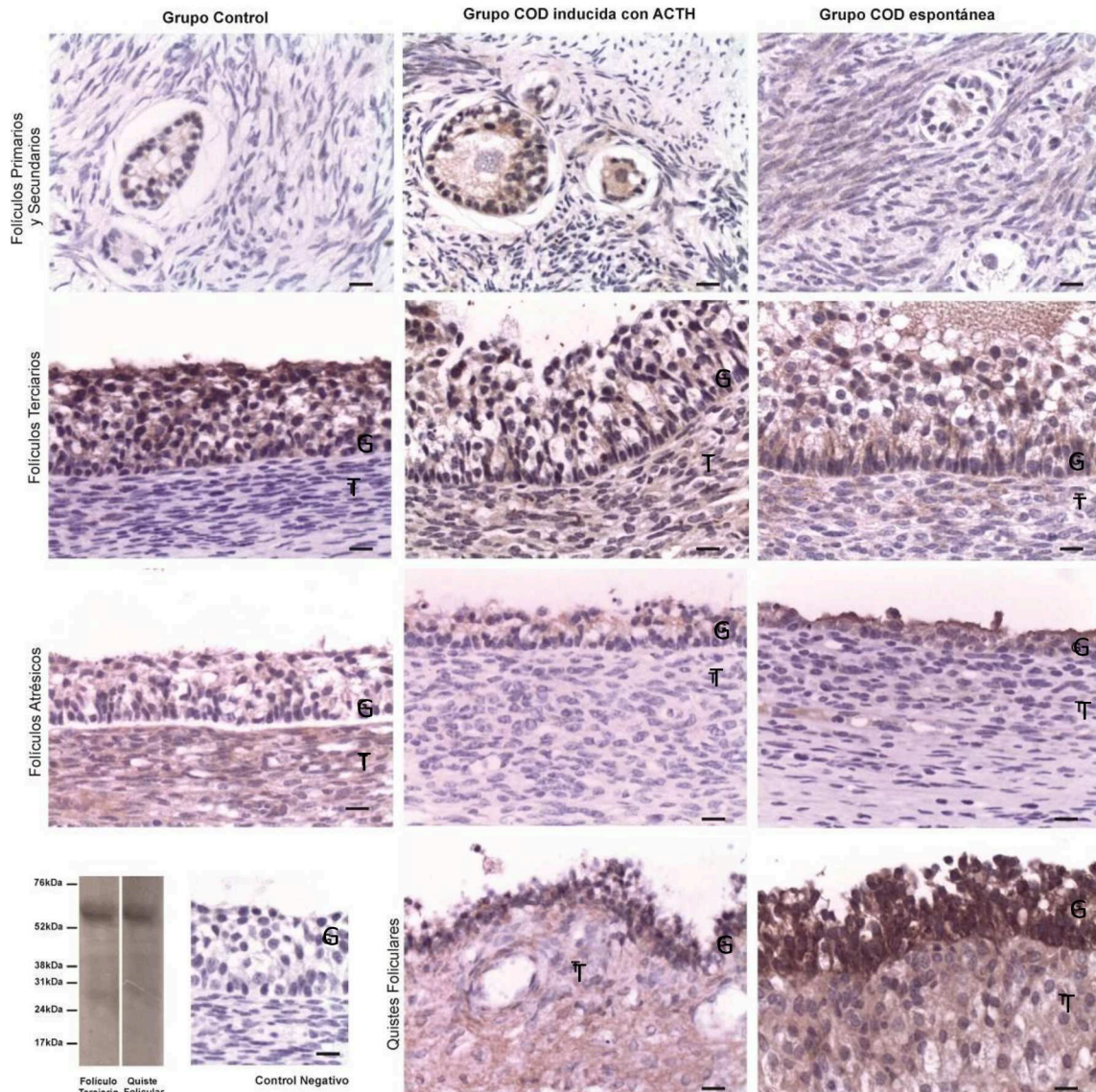


Figura 48: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **Activina** en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea. La barra corresponde a 25  $\mu$ m. El inmunoblot muestra la especificidad del anticuerpo utilizado, se observa una banda correspondiente al peso molecular de activina (58 kDa).

Con respecto a la expresión de activina en la teca interna de las diferentes estructuras foliculares (figura 50), se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) solamente en los folículos atrésicos, donde el mayor porcentaje de expresión se encontró en el grupo con COD espontánea respecto a la expresión de los animales control. En este caso, no existieron diferencias cuando se compararon quistes con folículos antrales (terciarios y atrésicos) del grupo control.

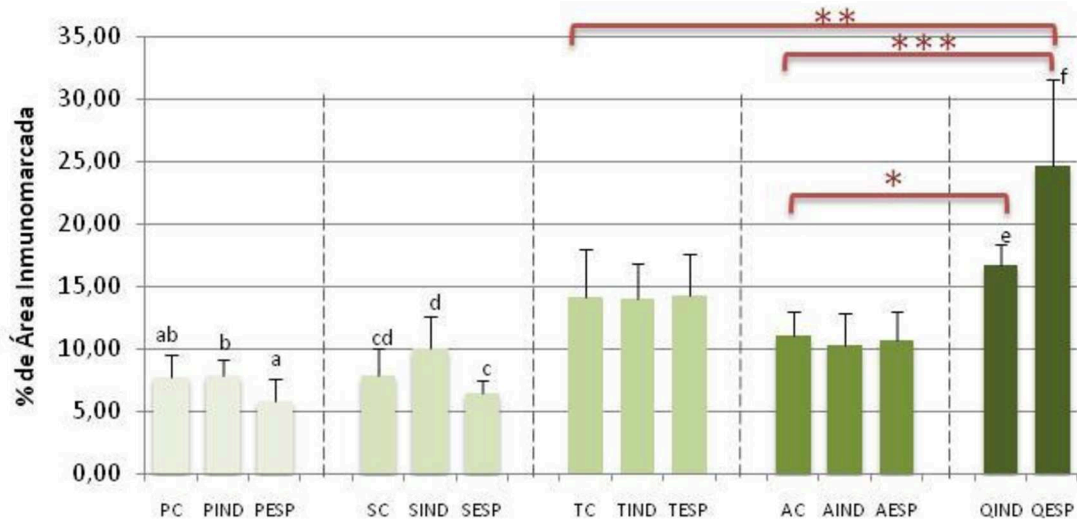


Figura 49: Porcentaje de área inmunomarcada para **Actvina** en células de la **granulosa** de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (PC: Primarios Controles, PIND: Primarios Inducidos, PESP: Primarios Espontáneos; SC: Secundarios Controles, SIND: Secundarios Inducidos, SESP: Secundarios Espontáneos; TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos; TESP: Terciarios Espontáneos; AC: Atrésicos Controles, AIND: Atrésicos Inducidos, AESP: Atrésicos Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos para una misma categoría folicular. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las estructuras indicadas por los extremos de los corchetes (quistes inducidos y atrésicos (\*) del grupo control; folículos quísticos 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 granulosa y teca interna. Los resultados se muestran en las figuras 51, 52 y 53.

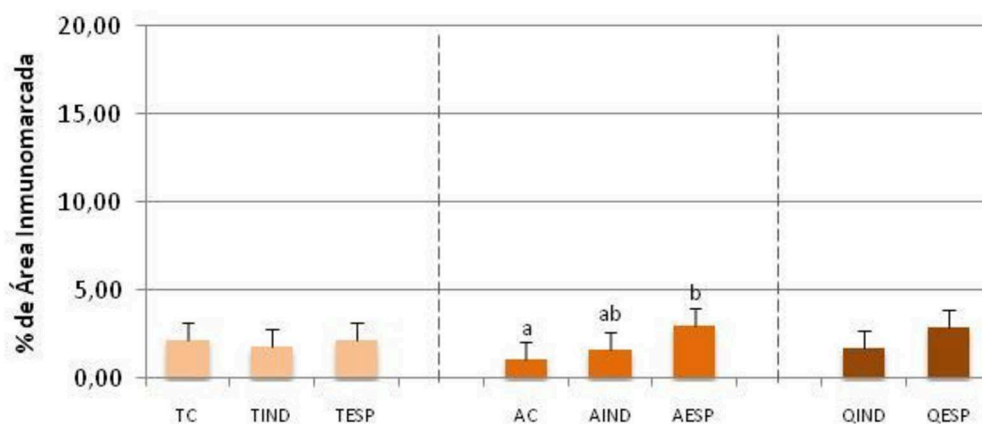


Figura 50: Porcentaje de área inmunomarcada para **Actvina** en células de la **teca interna** de diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos; TESP: Terciarios Espontáneos; AC: Atrésicos Controles, AIND: Atrésicos Inducidos, AESP: Atrésicos Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos dentro de un mismo tipo de estructura folicular.

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 entre ésta capa y las células de la granulosa en todas las categorías foliculares ( $p < 0,05$ ).

Con respecto a la granulosa del grupo control (figura 51), 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 sin diferencias con los folículos atrésicos.

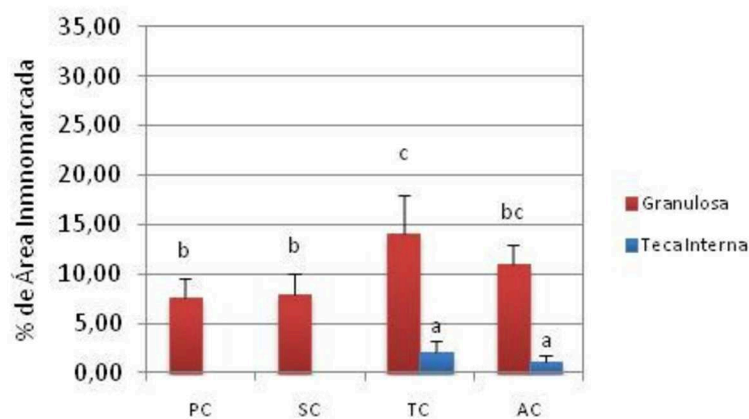


Figura 51: Porcentaje de área inmunomarcada para **Activina** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del **grupo control (C)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En el grupo COD inducida (figura 52), 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 se comportaron igual que los primarios y secundarios.

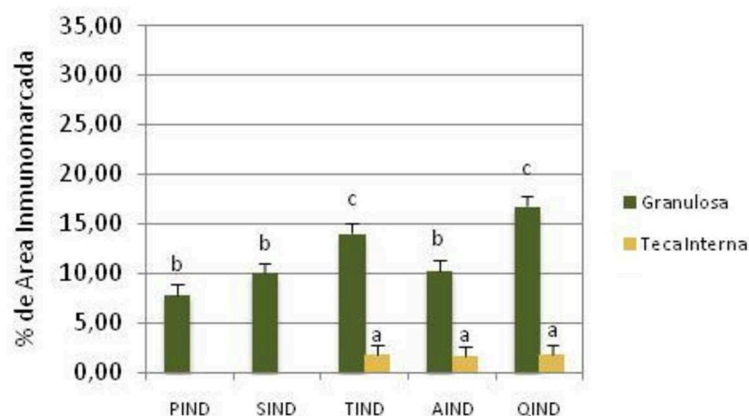


Figura 52: Porcentaje de área inmunomarcada para **Activina** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con **COD inducida (IND)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Por último, en las células de la granulosa del grupo con COD espontánea (figura 53), 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 ( $p < 0,05$ ), siendo mayor en los terciarios, presentando los atrésicos una expresión intermedia entre esas estructuras sin diferencias significativas con ninguna. Los folículos terciarios presentaron una mayor expresión que los primarios y secundarios pero menor que los quísticos ( $p < 0,05$ ).

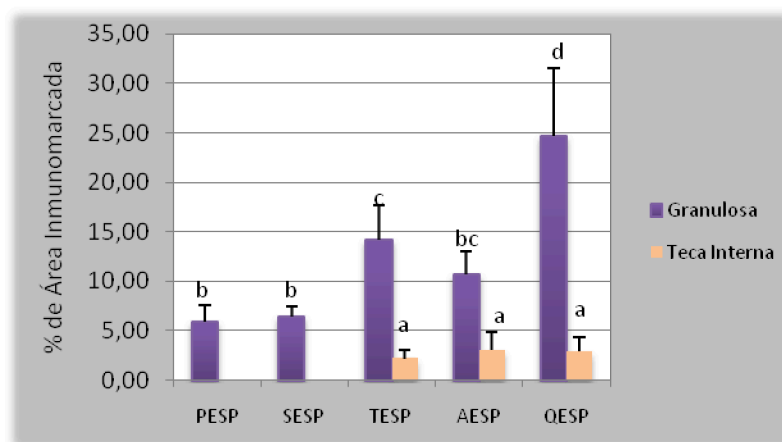


Figura 53: Porcentaje de área inmunomarcada para **Activina** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con **COD espontánea (ESP)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2.2. Inhibina

Sólo las células de la granulosa de los folículos terciarios de mayor tamaño y de los quísticos presentaron marcación positiva para inhibina (figura 54). Los folículos primarios, secundarios, terciarios pequeños y atrésicos no expresaron inmunomarcación para dicha proteína.

Como se puede observar en la figura 55, 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 la mayor expresión de inhibina cuando se los comparó con el resto de las estructuras analizadas, mostrando el mismo patrón presentado en granulosa para activina y foliculostatina.

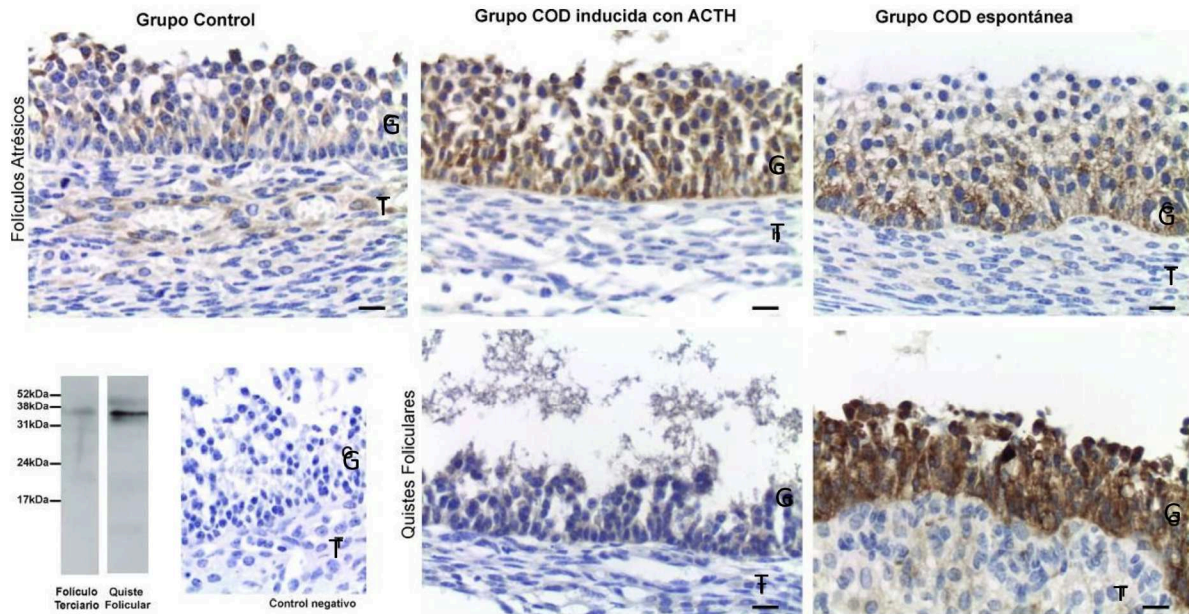


Figura 54: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **Inhibina** en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea. La barra indica 25  $\mu$ m. G: granulosa, T: Teca interna, FP: folículo primario, FS: folículo secundario. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de inhibina (32 kDa).

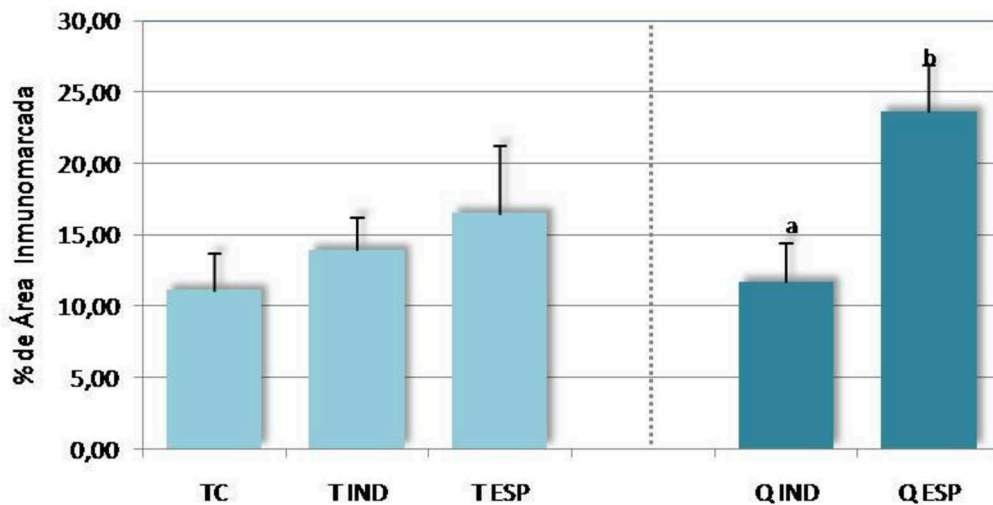


Figura 55: Porcentaje de área inmunomarcada para **Inhibina** en células de la **granulosa** de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos; TESP: Terciarios Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 4.2.2.3. Concentración de Inhibina en líquido folicular y suero

Se evaluó la concentración folicular y sérica de inhibina B en muestras de los grupos control y COD espontánea. Como se puede observar en la figura 56, 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.

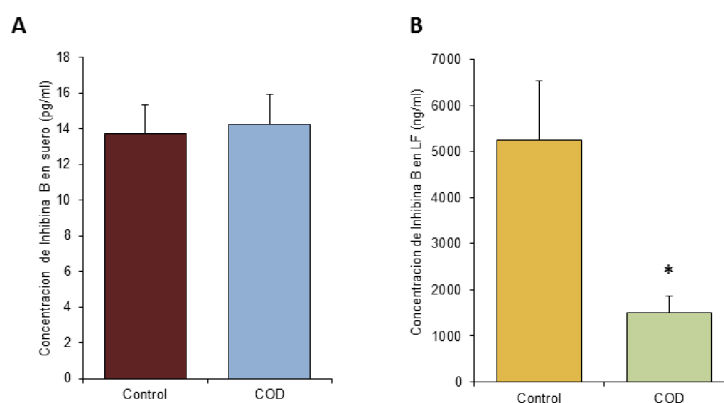


Figura 56: Concentración de **Inhibina B**: A en suero y B: en líquido folicular de animales control (proestro) y con COD espontánea. El asterisco indica diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

### 4.2.2.4. 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 valores mayores en el citoplasma de las primeras (figura 57). Con respecto a su expresión en las células de la granulosa (figura 58) se observa que, dentro de los folículos primarios, hubo una menor marcación en el grupo control respecto a la obtenida en el grupo con COD espontánea ( $p<0,05$ ). 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 ( $p<0,05$ ).



Dentro de los folículos terciarios, el grupo con COD espontánea mostró la mayor expresión ( $p < 0,05$ ). El mismo patrón de expresión se presentó en los folículos atrésicos, donde los folículos del grupo con COD espontánea mostraron la mayor inmunomarcación. Finalmente, los folículos quísticos también difirieron entre ellos, observándose mayores porcentajes de inmunomarcación en quistes espontáneos ( $p < 0,05$ ).

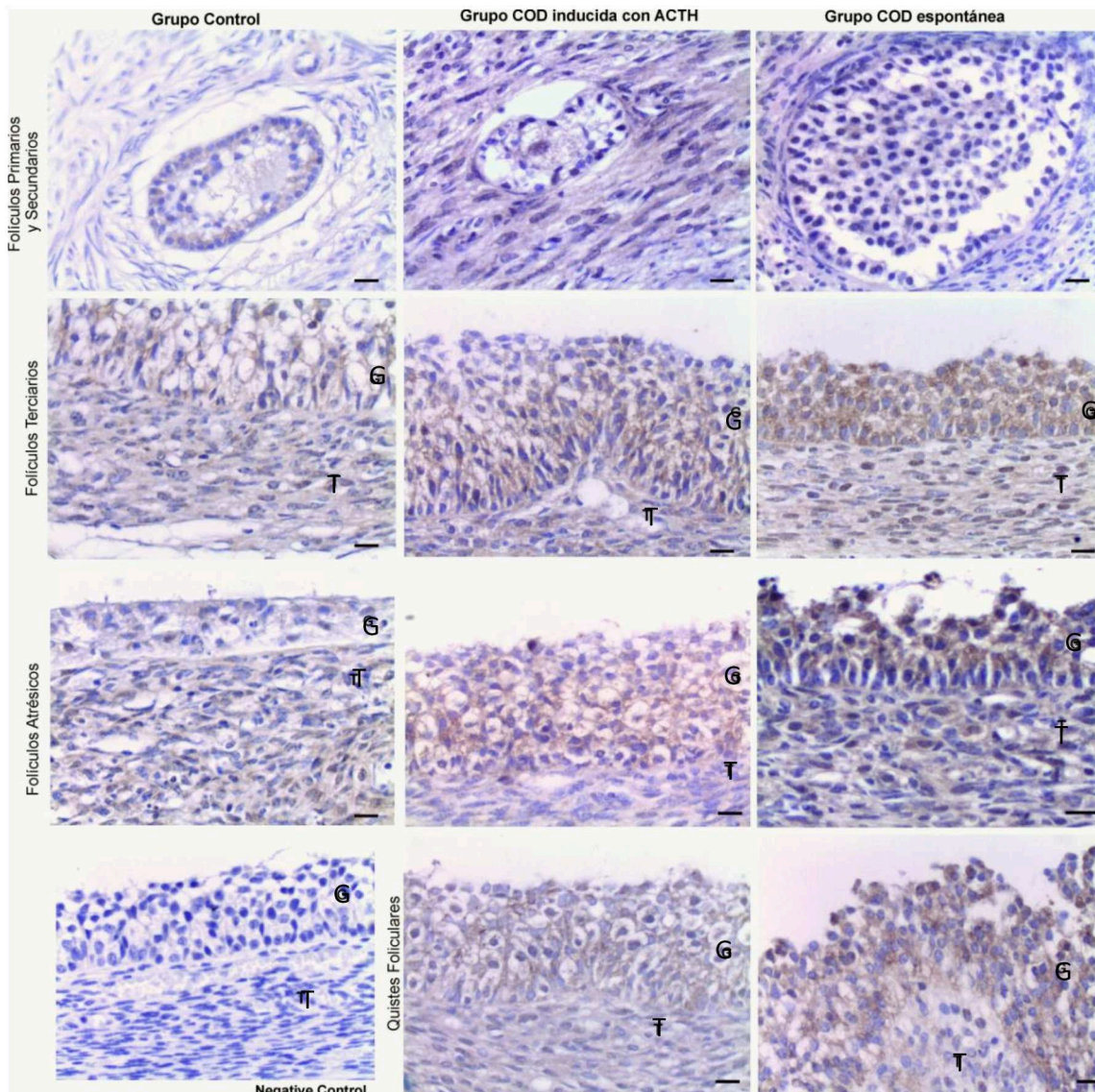


Figura 57: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **Foliculostatina** en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea. La barra indica 25  $\mu$ m. G: granulosa, T: teca interna, FP: folículo primario, FS: folículo secundario.

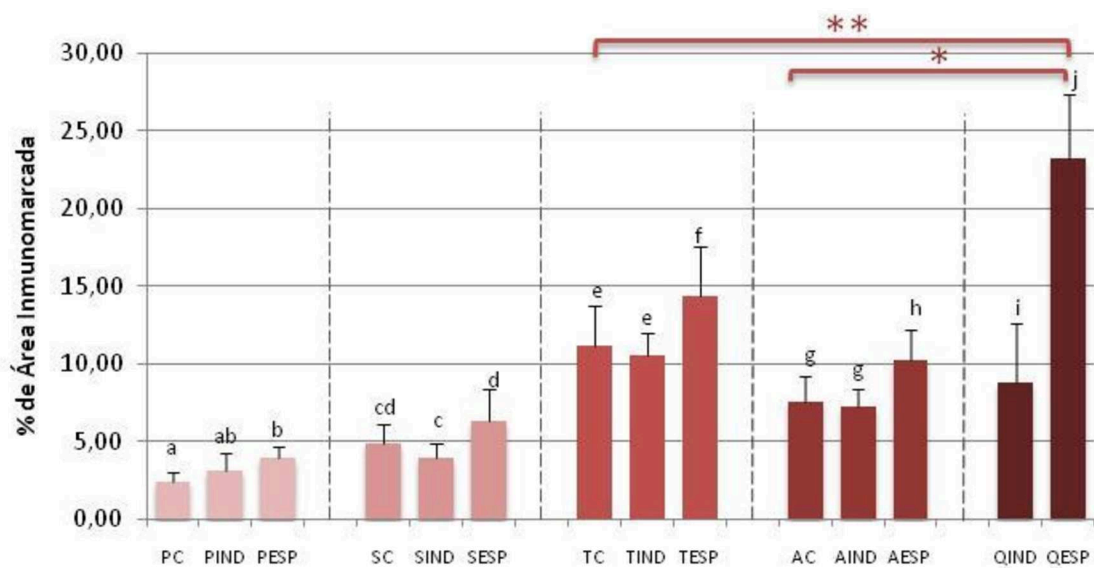


Figura 58: Porcentaje de área inmunomarcada para **Foliculostatina** en células de la **granulosa** de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (PC: Primarios Controles, PIND: Primarios Inducidos, PESP: Primarios Espontáneos; SC: Secundarios Controles, SIND: Secundarios Inducidos, SESP: Secundarios Espontáneos; TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos; TESP: Terciarios Espontáneos; AC: Atrésicos Controles, AIND: Atrésicos Inducidos, AESP: Atrésicos Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos). 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 las categorías foliculares estudiadas (primarios, secundarios, terciarios, atrésicos y quísticos), la mayor expresión de foliculostatina fue obtenida en todos los casos en los folículos pertenecientes al grupo con COD espontánea. Por último, cuando se compararon los quistes (inducidos y espontáneos) con las estructuras de referencia del grupo control (folículos terciarios y atrésicos), la mayor expresión se encontró en los quistes espontáneos ( $p < 0,05$ ) no existiendo diferencias entre los quistes inducidos y dichas estructuras.

Para la teca interna (figura 59) no se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos grupos dentro de cada categoría folicular ni tampoco cuando se compararon los folículos quísticos con las estructuras de referencia del grupo control.

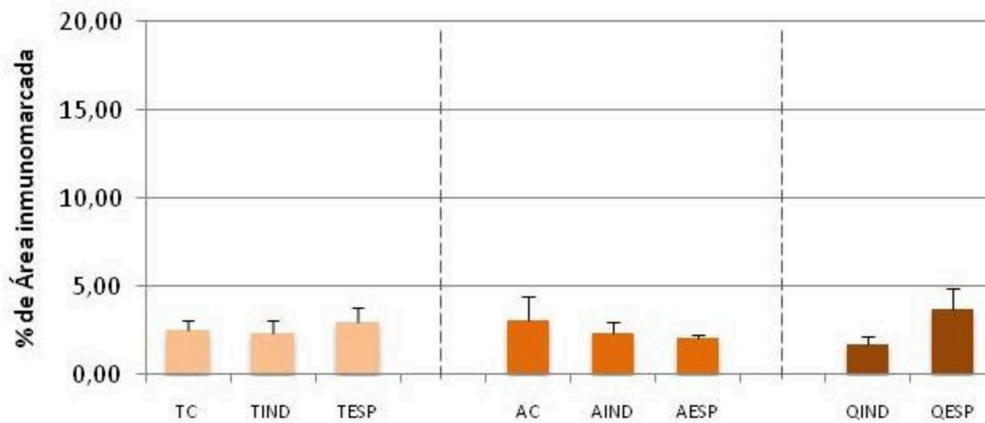


Figura 59: Porcentaje de área inmunomarcada para **Foliculostatina** en células de la **teca interna** de diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos; TESP: Terciarios Espontáneos; AC: Atrésicos Controles, AIND: Atrésicos Inducidos, AESP: Atrésicos Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos).

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 60), del grupo con COD inducida (figura 61) y del grupo con COD espontánea (figura 62). En los tres casos, se observó 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 aumenta de categoría (primario – secundario – terciario) para luego descender a valores intermedios (menores que los terciarios pero mayores a los preantrales) cuando se atresian. Las células de la teca interna de todas las estructuras foliculares expresaron la menor marcación, similar a la expresión de la granulosa de los folículos primarios. 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, mientras que los quistes espontáneos presentaron una marcación superior a todas las demás estructuras dentro de su grupo.

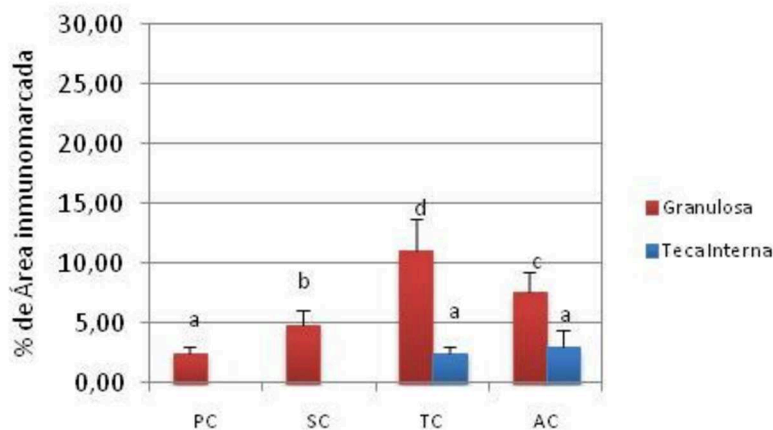


Figura 60: Porcentaje de área inmunomarcada para **Foliculostatina** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios y A: Atrésicos) del **grupo Control (C)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

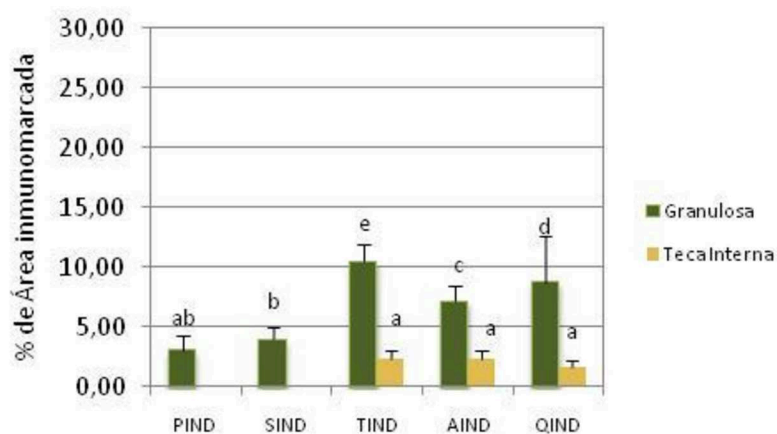


Figura 61: Porcentaje de área inmunomarcada para **Foliculostatina** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con **COD inducida (IND)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

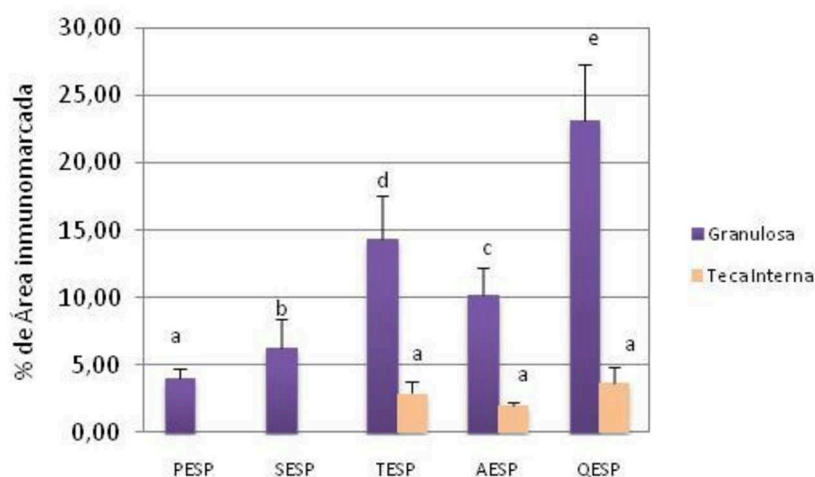


Figura 62: Porcentaje de área inmunomarcada para **Foliculostatina** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios, A: Atrésicos y Q: Quísticos) del grupo con **COD espontánea (ESP)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2.5. Expresión de isoformas de foliculostatina en pared folicular completa de folículos terciarios y quísticos provenientes de frigorífico.

Se detectaron bandas correspondientes a las isoformas de 31, 35, 37, 41 y 65 kDa observándose una tendencia ( $p=0,086$ ) a aumentar la expresión de la isoforma de 31 kDa en los quistes en relación a los folículos antrales grandes y una tendencia ( $p=0,097$ ) a aumentar en la isoforma de 41 kDa en los folículos medianos en relación a los quistes y folículos pequeños. La figura 63 demuestra la expresión de cada una de las isoformas detectadas.

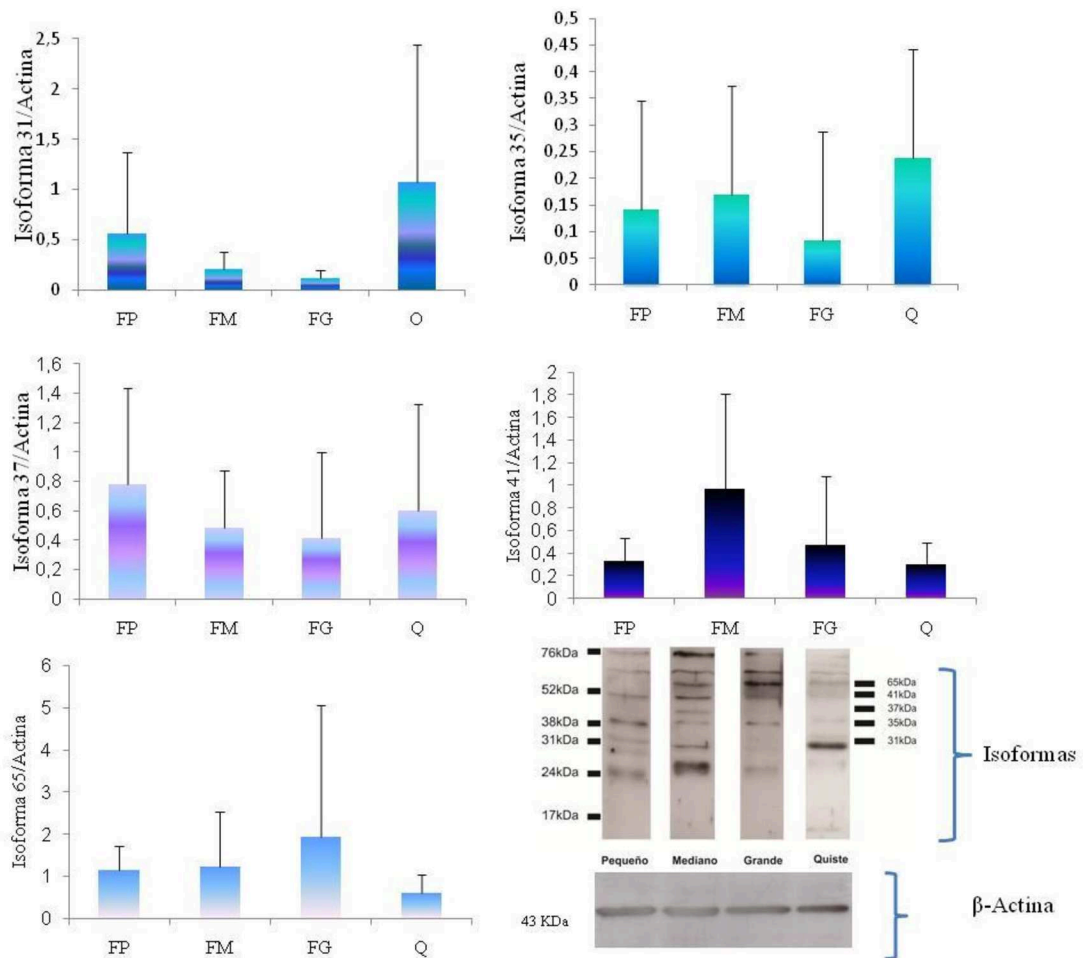


Figura 63: Porcentaje de expresión detectada por western blot en pared completa para cada una de las isoformas de **Foliculostatina** en diferentes folículos terciarios (FP: Folículo Pequeño, FM: Folículo Mediano, FG: Folículo Grande) y quistes (Q: Quistes).

#### 4.2.3. Localización y expresión de receptores de miembros de la superfamilia de TGF $\beta$ en COD espontánea e inducida

La inmunodetección de los receptores se efectuó en concordancia con la ejecutada para los ligandos y la proteína de relación foliculostatina. Los receptores evaluados en este estudio fueron: TGF $\beta$ -RI, TGF $\beta$ RIII (betaglicano) y ACVR1IB. La especificidad de los anticuerpos fue corroborada por western blot como se muestra en las figuras correspondientes a cada receptor.

#### 4.2.3.1. Localización y expresión de TGF- $\beta$ RI

El TGF- $\beta$ RI mostró inmunomarcación citoplasmática en todos los estadios de desarrollo folicular tanto las células de la granulosa como las de la teca interna (figura 64).

Se hallaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la expresión del receptor en la granulosa entre folículos terciarios controles y quistes espontáneos que evidenciaron la mayor marcación. Además, hubo diferencias entre folículos primarios del grupo COD inducida que mostraron menos expresión que los del grupo COD espontánea, y entre folículos terciarios espontáneos con los del grupo COD inducido y controles. Los folículos secundarios no evidenciaron diferencias significativas (figura 65).

En cuanto a la teca interna, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre folículos terciarios inducidos y espontáneos, con la menor marcación en los del grupo COD inducida, y en cuanto a los quistes no se detectaron diferencias significativas (figura 66).

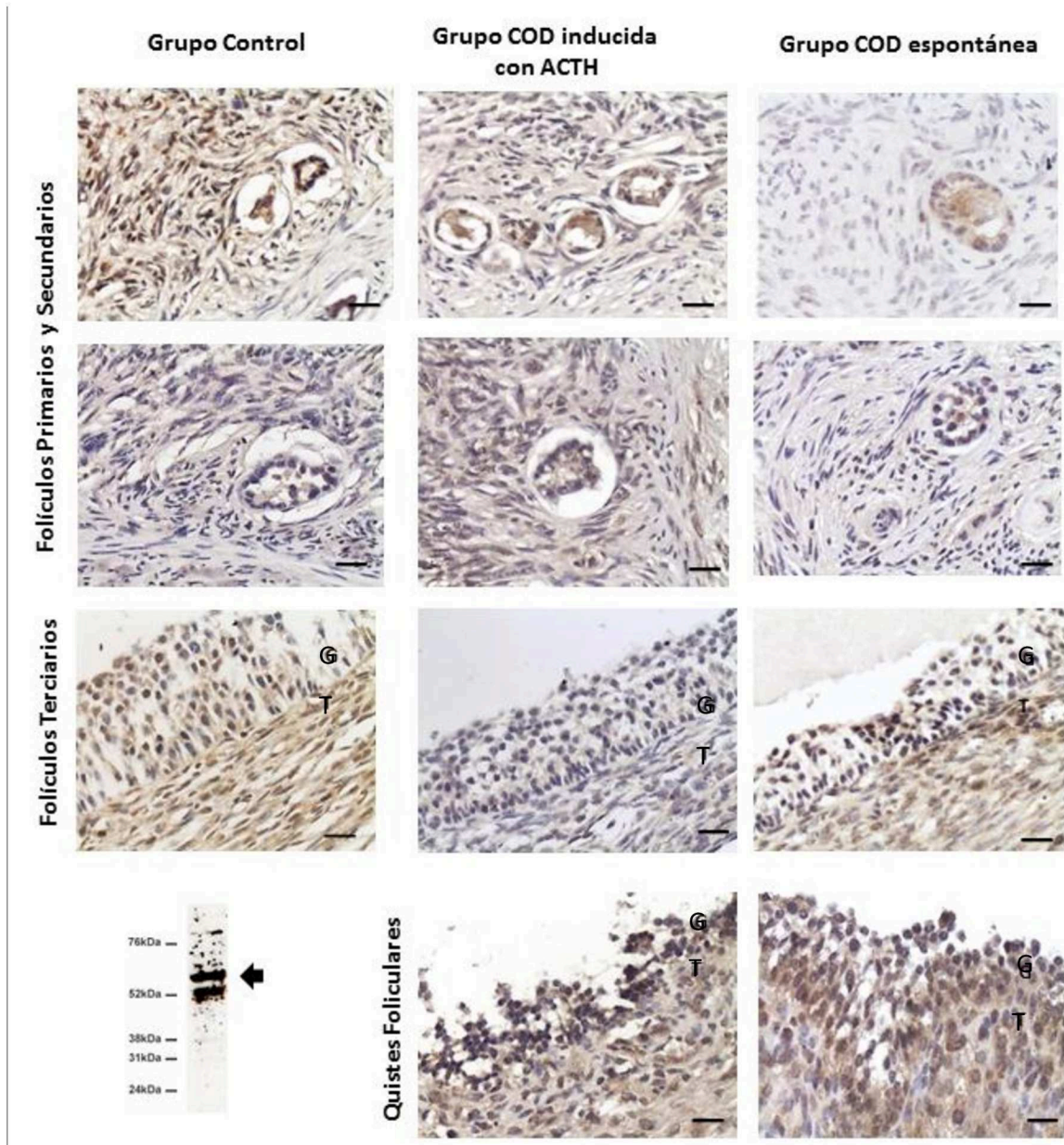


Figura 64: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para el **TGF-βRI** en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea. La barra indica 25 μm. G: granulosa, T: Teca interna, FP: folículo primario, FS: folículo secundario. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de TGFβ-RI (56 kDa).

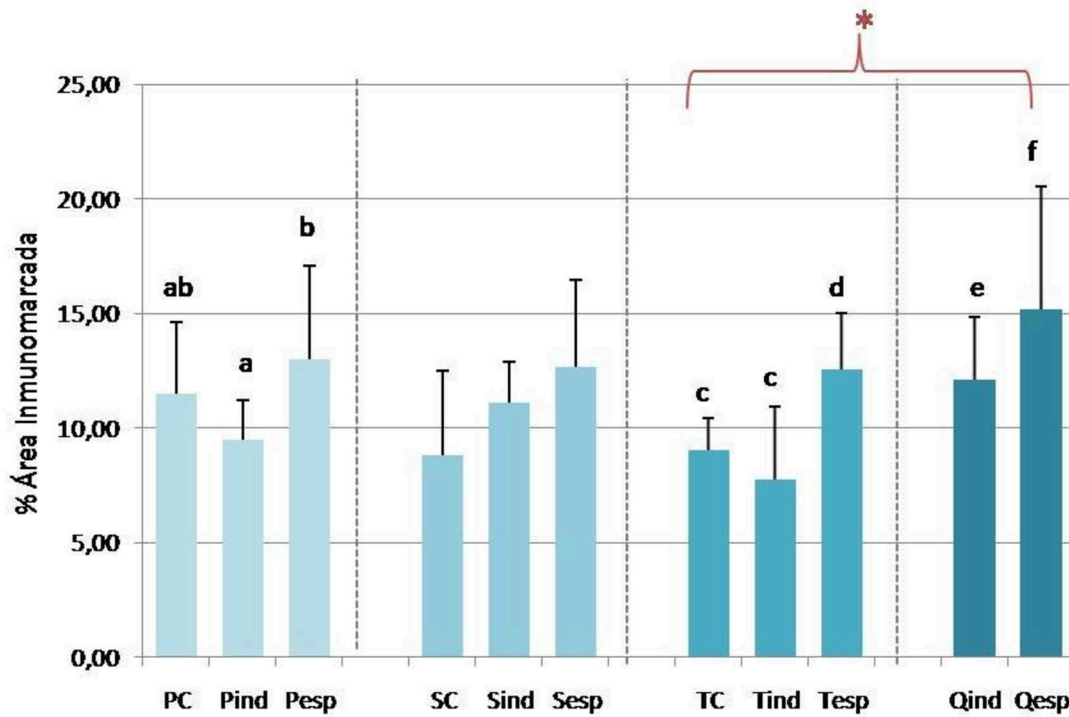


Figura 65: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-βRI** en células de la **granulosa** de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (PC: Primarios Controles, Pind: Primarios Inducidos, Pesp: Primarios Espontáneos; SC: Secundarios Controles, Sind: Secundarios Inducidos, Sesp: Secundarios Espontáneos; TC: Terciarios Controles, Tind: Terciarios Inducidos; Tesp: Terciarios Espontáneos; Qind: Quistes Inducidos, Qesp: Quistes Espontáneos). Los asteriscos indican diferencias significativas entre las estructuras indicadas por los extremos de las llaves (folículos quísticos espontáneos y los folículos terciarios (\*);  $p < 0,05$ ).

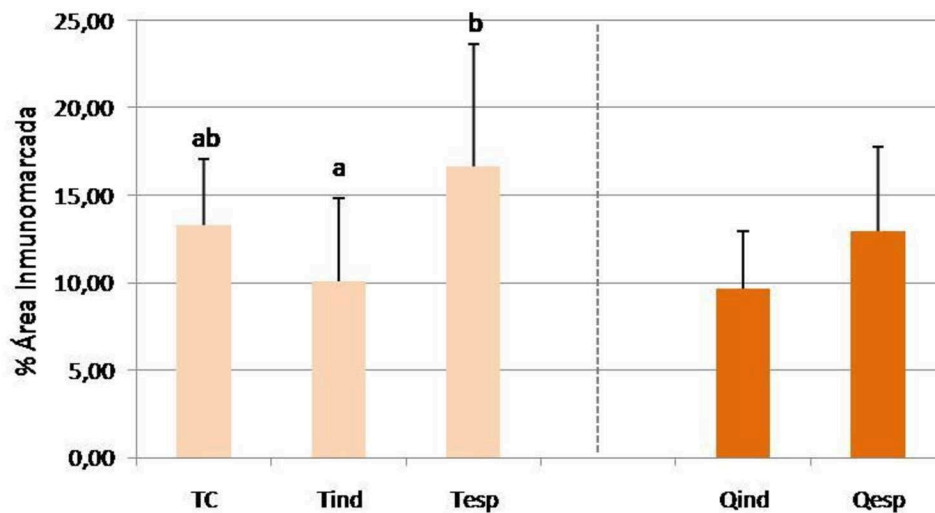


Figura 66: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-βRI** en células de la **teca interna** de diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (TC: Terciarios Controles, Tind: Terciarios Inducidos; Tesp: Terciarios Espontáneos; Qind: Quistes Inducidos, Qesp: Quistes espontáneos). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos dentro de un mismo tipo de estructura folicular ( $p < 0,05$ ).



#### 4. Resultados

También se comparó el porcentaje de área inmunomarcada en granulosa y teca interna de las diferentes estructuras foliculares dentro del grupo control, del grupo con COD inducida y del grupo con COD espontánea.

En el grupo control, el mayor porcentaje de área inmunomarcada se presentó en la teca de los folículos terciarios, presentando diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con las capa de la granulosa de estos folículos terciarios (figura 67).

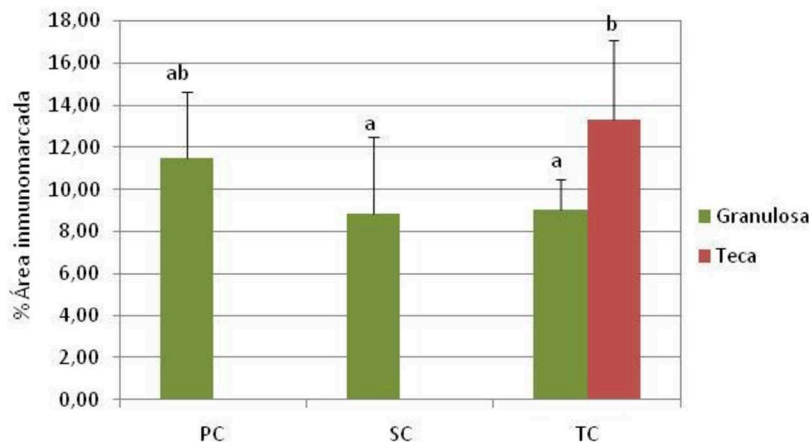


Figura 67: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-βRI** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo **control (C)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En el grupo de COD inducida (figura 68), se observó una expresión similar de TGF-βRI dentro de la capa de células de la granulosa de todas las categorías foliculares evaluadas. Los niveles de expresión de la teca interna fueron similares a los de la granulosa sin observar diferencias significativas entre los grupos analizados (figura 68).

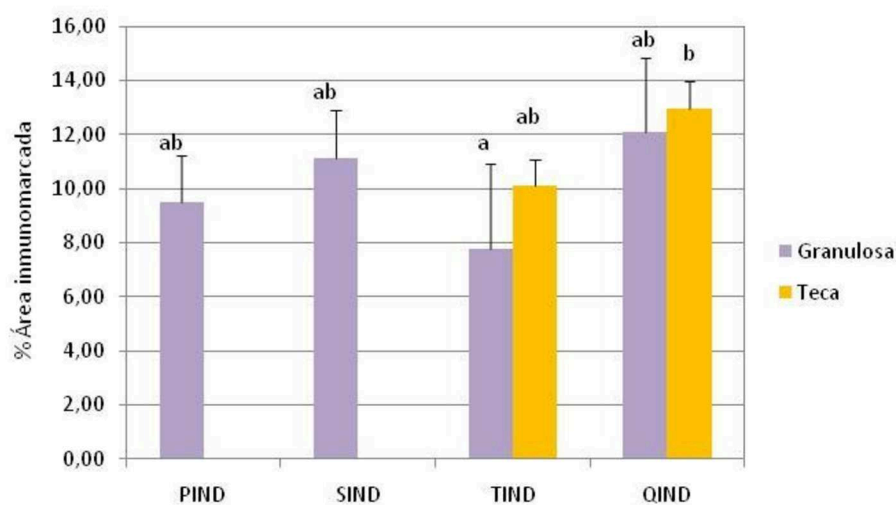


Figura 68: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-βRI** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo **Inducido (Ind)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Por último, en el grupo de COD espontánea (figura 69) no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre capas foliculares ni entre las estructuras evaluadas (figura 69).

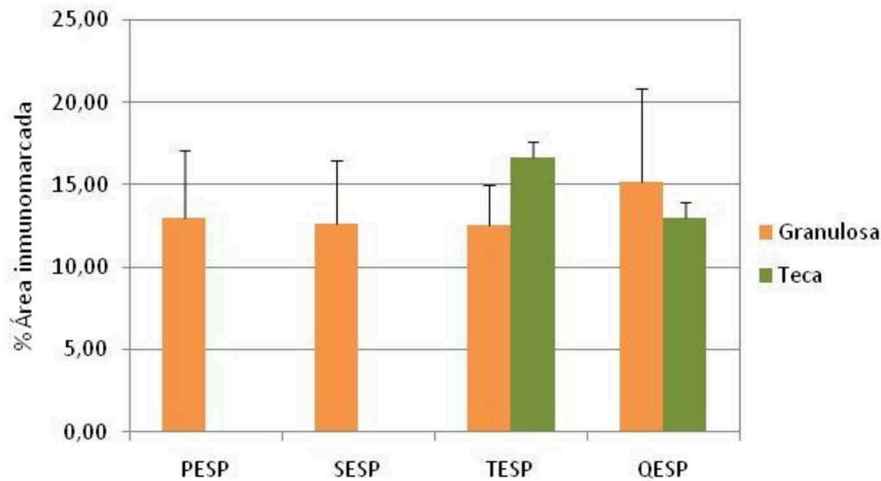


Figura 69:  
Porcentaje de área inmunomarcada para TGF- $\beta$ RI de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo Espontáneo (ESP).

#### 4.2.3.2. Localización y expresión de TGF- $\beta$ RIII

Se visualizó inmunomarcación para TGF- $\beta$ RIII en el citoplasma en todos los estadios de desarrollo folicular y tanto en las células de la granulosa como en las de la teca (figura 70). Se hallaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la granulosa entre folículos quísticos inducidos y terciarios controles, sin diferencias significativas entre el resto de las estructuras evaluadas (figura 71). En cuanto a la teca interna, se hallaron diferencias significativas entre los folículos terciarios ( $p < 0,05$ ), los que mostraron una menor marcación en el grupo de inducción de la COD. Además, los quistes inducidos experimentalmente mostraron menor marcación que los folículos terciarios control (figura 72).

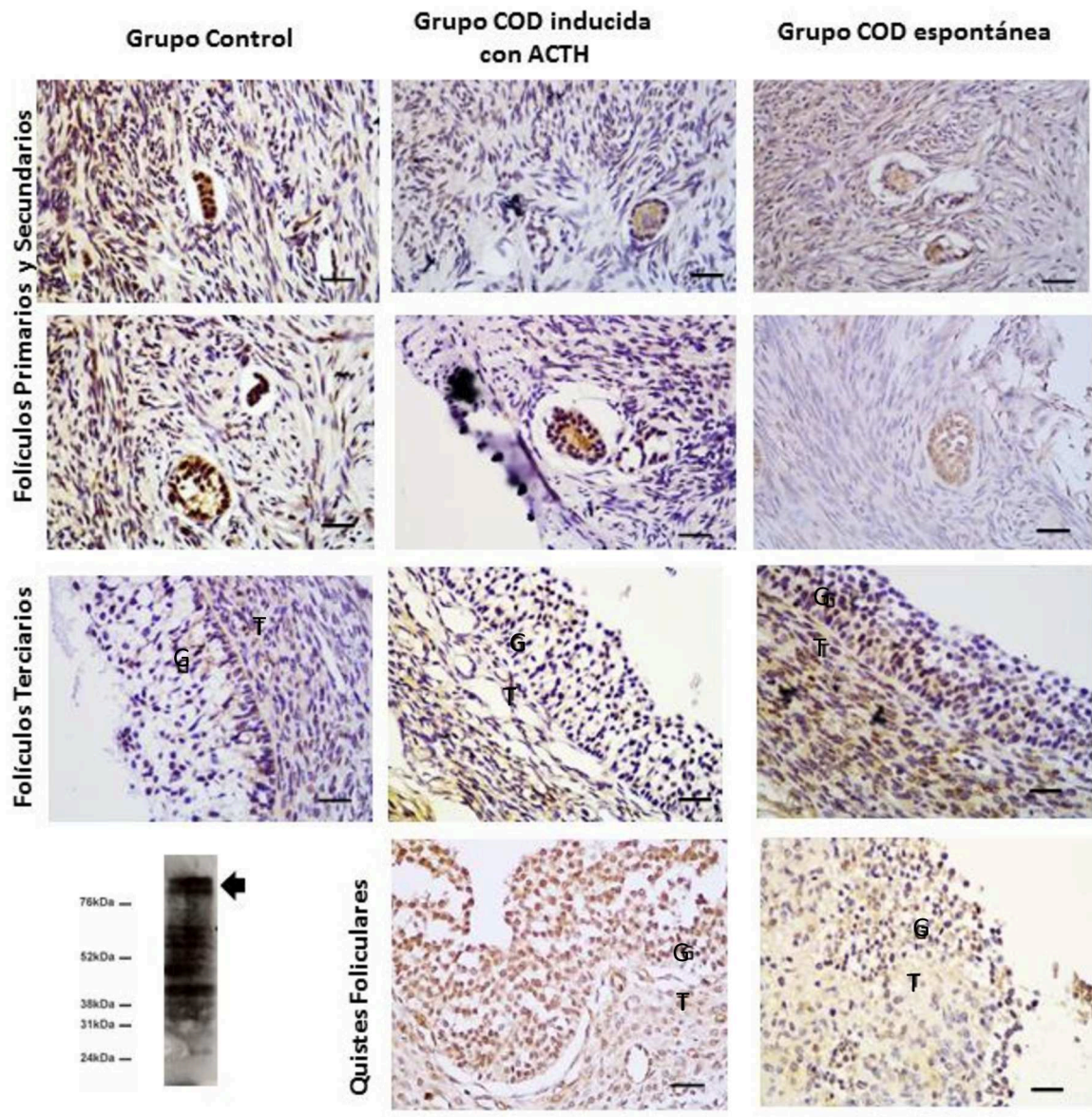


Figura 70: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para el **TGF- $\beta$ RIII** en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea. La barra corresponde a 25  $\mu$ m. El inmunoblot muestra la especificidad del anticuerpo utilizado, se observa una banda correspondiente al peso molecular de **TGF- $\beta$ RIII** (93 kDa).

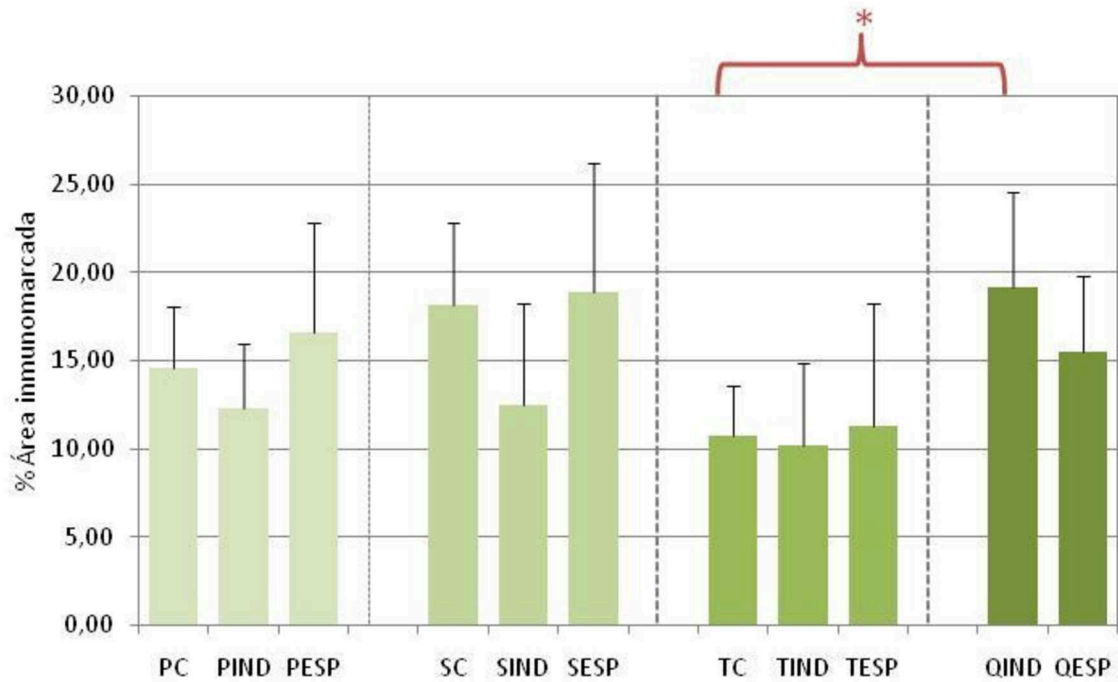


Figura 71: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-βRIII** en células de la **granulosa** de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (PC: Primarios Controles, PIND: Primarios Inducidos, PESP: Primarios Espontáneos; SC: Secundarios Controles, SIND: Secundarios Inducidos, SESP: Secundarios Espontáneos; TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos; TESP: Terciarios Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos). El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las estructuras indicadas en los extremos de la llave ( $p < 0,05$ ).

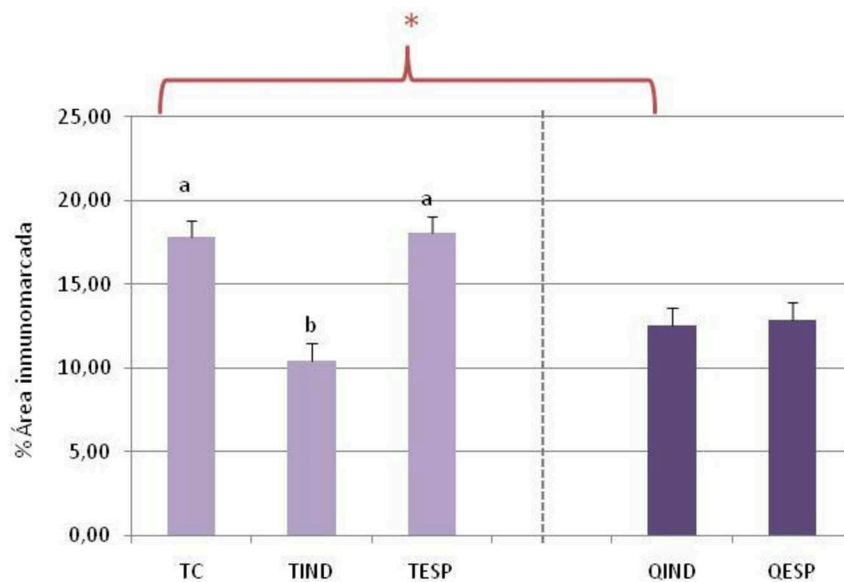


Figura 72: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-βRIII** en células de la **teca interna** de diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos; TESP: Terciarios Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos). El asterisco muestra diferencias significativas entre las estructuras indicadas en los extremos de la llave ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Resultados

Se evaluó el porcentaje de inmunomarcación en granulosa y teca interna de las diferentes estructuras foliculares dentro del grupo control, del grupo con COD inducida y del grupo con COD espontánea.

La granulosa del grupo control presentó la mayor inmunomarcación en folículos secundarios, presentando diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con la misma capa de células de los folículos terciarios. Los folículos primarios mostraron una marcación similar a la observada en la teca de los folículos terciarios (figura 73).

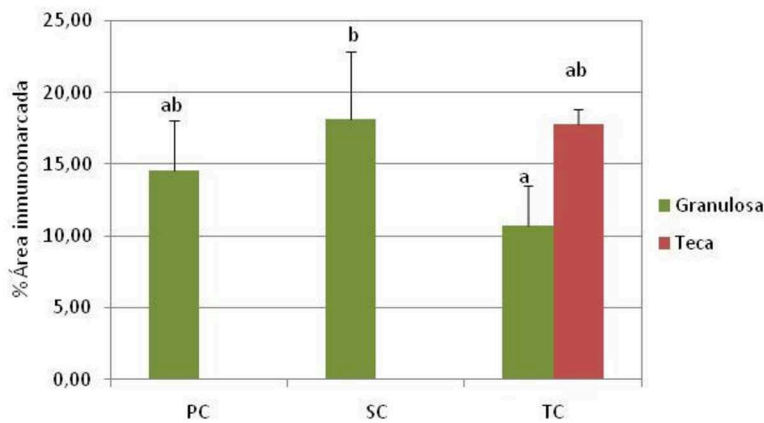


Figura 73: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-βRIII** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo **control (C)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En cuanto al modelo de COD inducida (figura 68), la expresión de TGF-βRIII dentro de la capa de células de la granulosa fue mayor en los quistes respecto a los folículos terciarios, ( $p < 0,05$ ). En la capa de células de la teca interna se registró igual porcentaje de marcación para las estructuras evaluadas (figura 74).

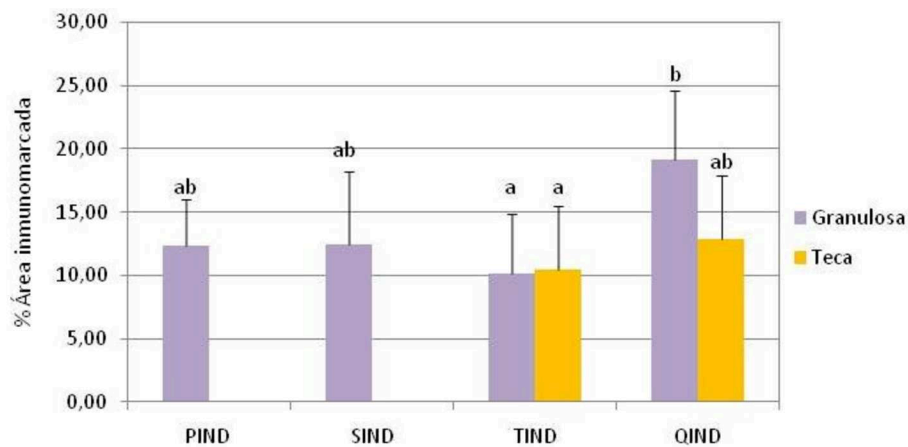


Figura 74: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-βRIII** de diferentes categorías foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo **COD inducida (IND)**. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El grupo de COD espontánea no mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las diferentes estructuras, tanto para teca interna como para granulosa (figura 75).

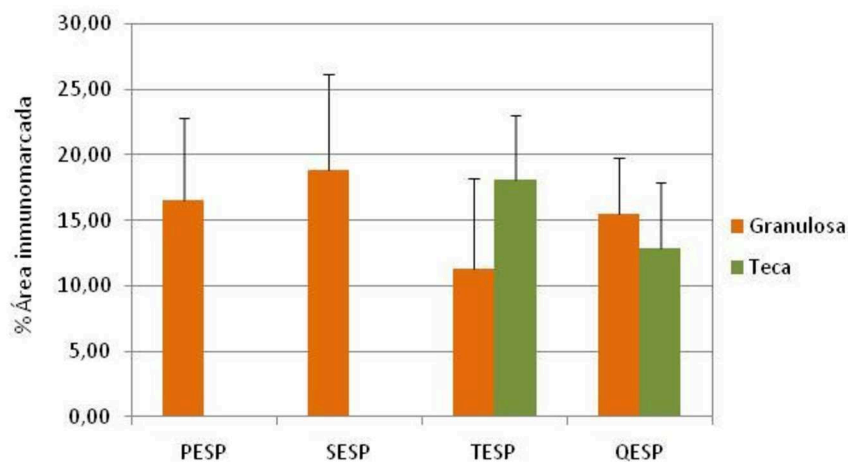


Figura 75: Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-βRIII** de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo con **COD Espontánea (ESP)**.

#### 4.2.3.3. Localización y expresión de ACVR1IB

La inmunomarcación de este receptor se detectó en el citoplasma de todas las células de la granulosa y de la teca interna de las diferentes estructuras evaluadas (figura 76).

Se hallaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión hallada en la granulosa entre folículos primarios controles comparado con espontáneos. Además, se pudo detectar una mayor marcación en folículos quísticos espontáneos cuando se los comparó con los folículos terciarios controles (figura 77).

La inmunomarcación de las células de la teca interna mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre folículos terciarios, en los que se determinó una mayor expresión en los terciarios de animales con COD espontánea en relación a los terciarios de animales controles. Por otro lado, los folículos quísticos presentaron menor inmunomarcación en los folículos provenientes de casos inducidos en relación a los de casos espontáneos (figura 78). Además, los folículos quísticos espontáneos presentaron mayor inmunomarcación que los terciarios controles.

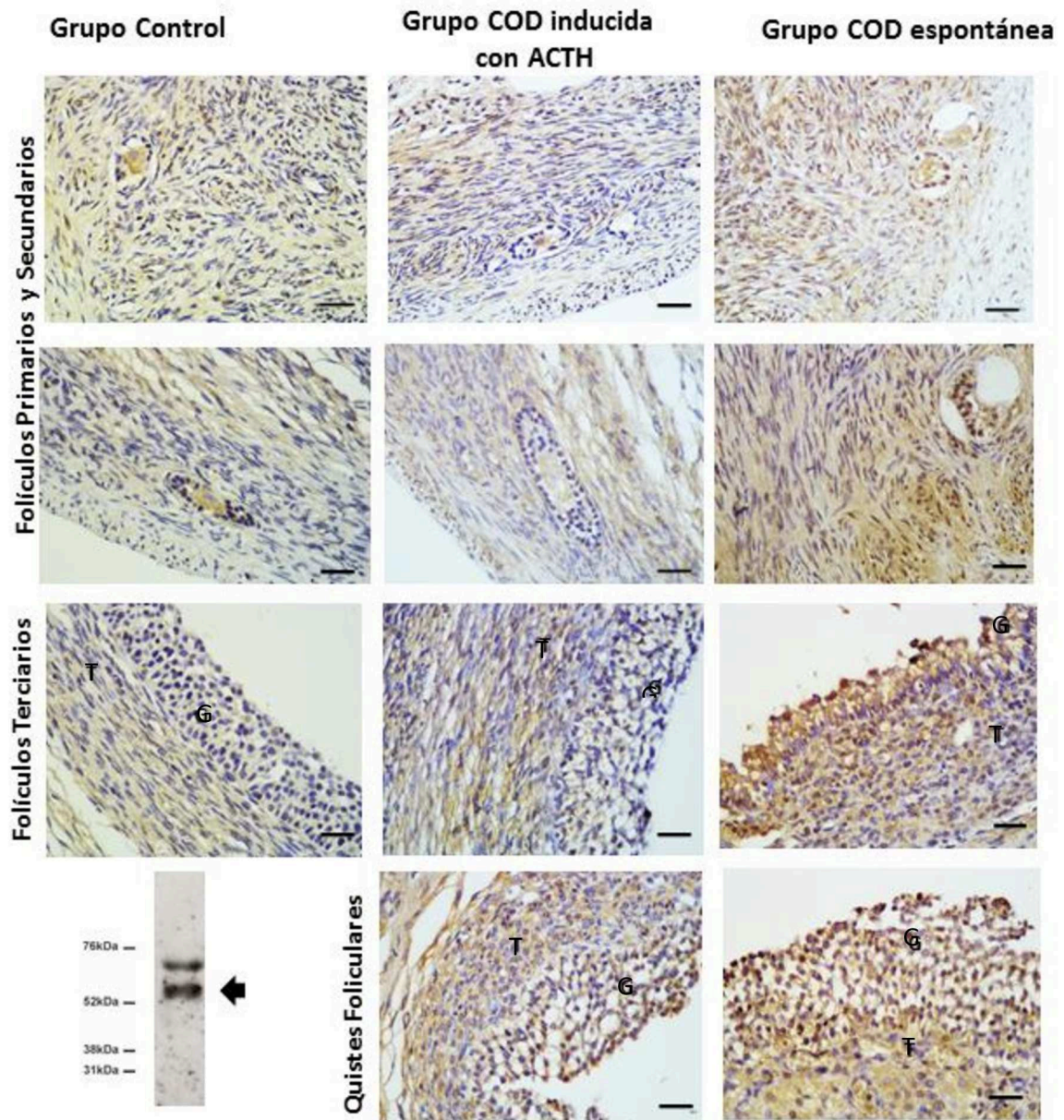


Figura 76: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para el **ACVRIIB** en animales de los grupos control, COD inducida y COD espontánea. La barra corresponde a 25 µm. G: granulosa; T: Teca interna. El inmunoblot muestra la especificidad del anticuerpo utilizado, se observa una banda correspondiente al peso molecular de **ACVRIIB** (58kDa)

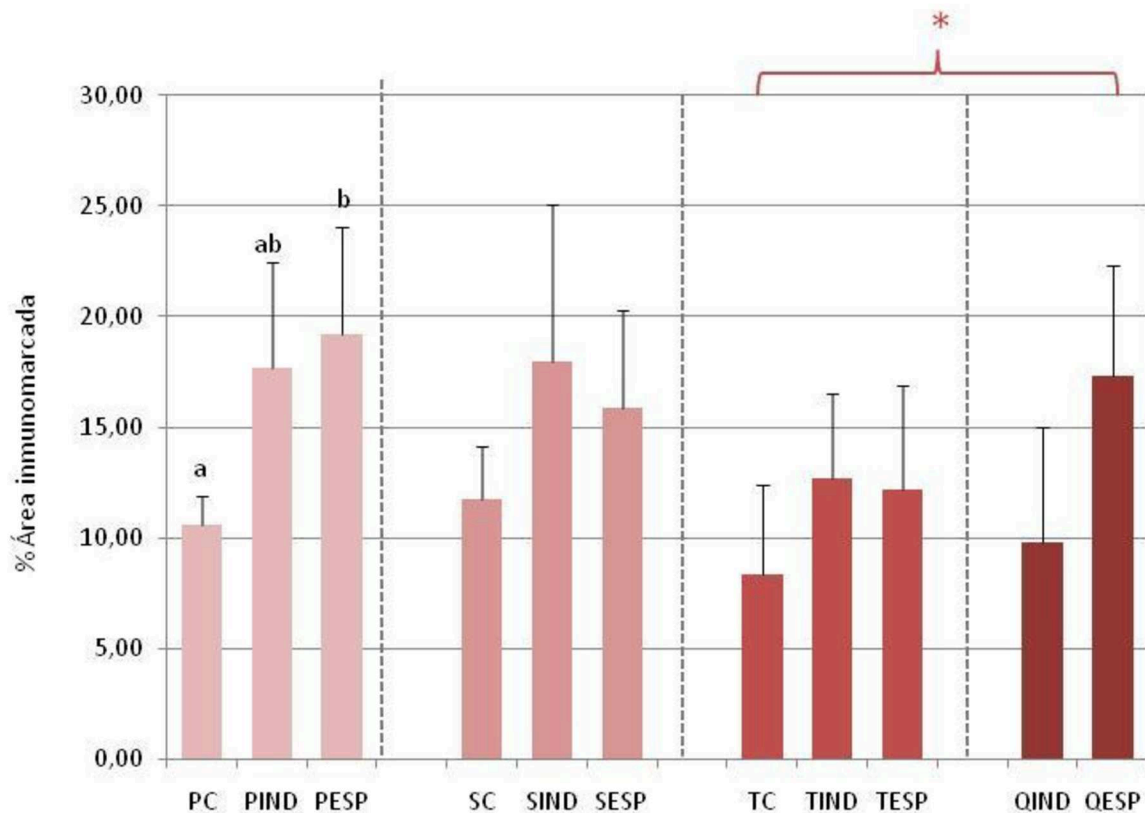


Figura 77: Porcentaje de área inmunomarcada para **ACVRIIB** en células de la **granulosa** de los diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (PC: Primarios Controles, PIND: Primarios Inducidos, PESP: Primarios Espontáneos; SC: Secundarios Controles, SIND: Secundarios Inducidos, SESP: Secundarios Espontáneos; TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos; TESP: Terciarios Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos para una misma categoría folicular y el asterisco (\*) indica diferencias significativas entre las estructuras indicadas por los extremos de la llave.

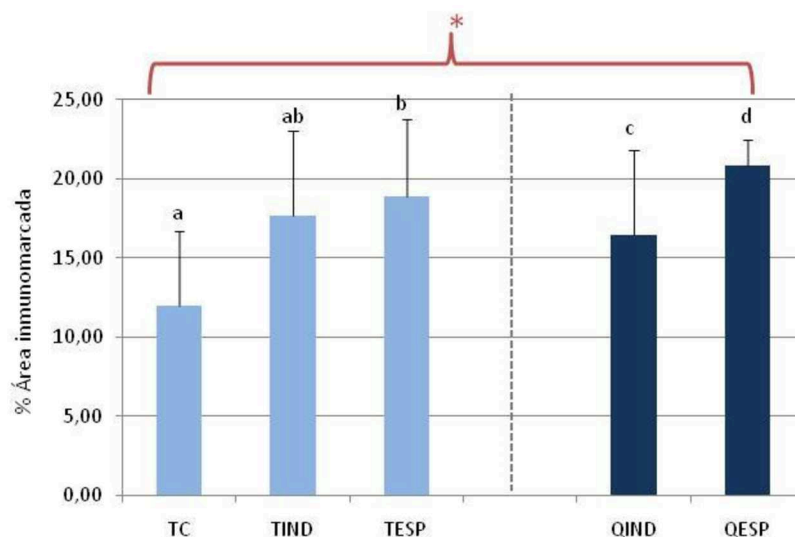


Figura 78: Porcentaje de área inmunomarcada para **ACVRIIB** en células de la **teca interna** de diferentes de diferentes tipos foliculares y de los diferentes grupos analizados (TC: Terciarios Controles, TIND: Terciarios Inducidos; TESP: Terciarios Espontáneos; QIND: Quistes Inducidos, QESP: Quistes Espontáneos). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos dentro de un mismo tipo de estructura folicular. El asterisco indica diferencias significativas entre las estructuras indicadas por los extremos de la llave ( $p < 0,05$ ).



#### 4. Resultados

En lo que respecta a la inmunomarcación evaluada en células de la granulosa y teca interna de las diferentes estructuras foliculares dentro del grupo control, con COD inducida y con COD espontánea, en el grupo control no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las categorías foliculares, tanto en células de la teca interna como en células de la granulosa (figura 79).

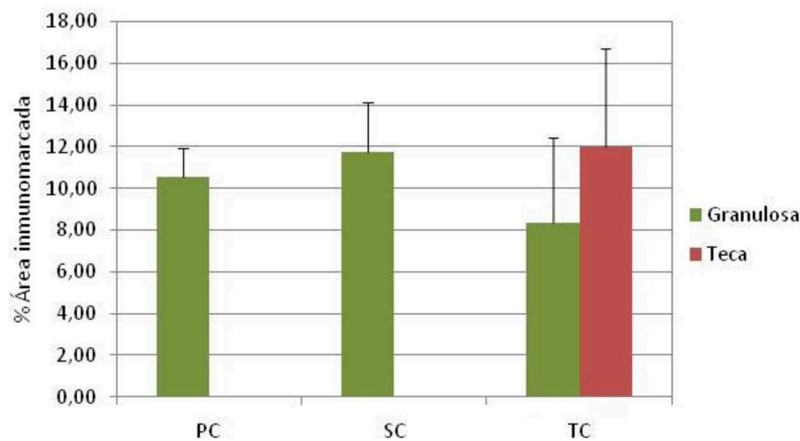


Figura 79: Porcentaje de área inmunomarcada para ACVRIIB de varios tipos foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo control (C).

En el grupo de COD inducida, se detectó una expresión de ACVRIIB similar entre las células de la granulosa de las diferentes categorías foliculares. Además, se observó que la expresión del receptor en células de la granulosa de quistes fue menor ( $p < 0,05$ ) que la detectada en células de la teca interna de folículos terciarios (figura 80).

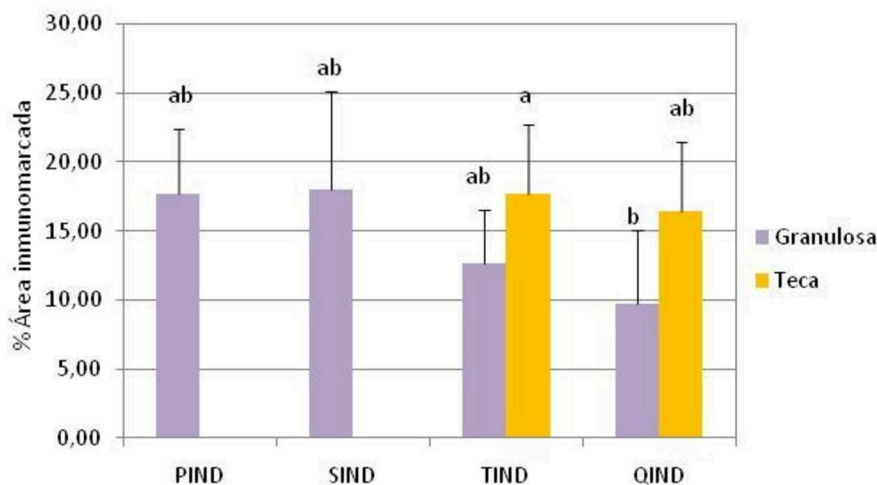


Figura 80: Porcentaje de área inmunomarcada para ACVRIIB de diferentes categorías foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciarios) del grupo Inducido (IND). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Para concluir, en el grupo con COD espontánea (figura 81), se determinó una mayor marcación en las células de la teca de los folículos quísticos ( $p < 0,05$ ) con respecto a la marcación observada en las células de la granulosa de folículos terciarios.

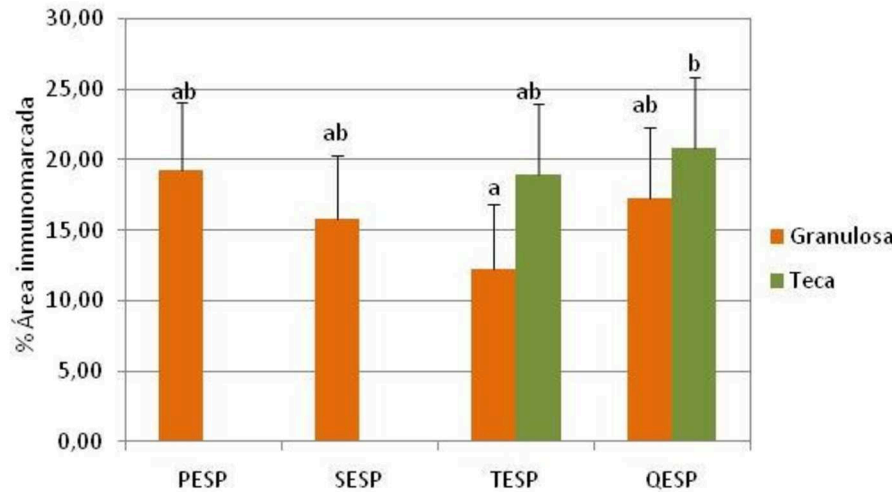


Figura 81:  
Porcentaje de área inmunomarcada para ACVRIIB de diferentes categorías foliculares (P: Primarios, S: Secundarios, T: Terciario) del grupo Espontáneo (ESP). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. EXPRESIÓN DE COMPONENTES DE LA SUPERFAMILIA TGF- $\beta$ EN LA PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA

En esta sección evaluamos la expresión de aquellas proteínas que modificaron su expresión en la COD espontánea, en el modelo de persistencia folicular. Los ligandos y la proteína de unión evaluados en ovarios con folículos persistentes, conjuntamente con los ovarios control, fueron seleccionados por haber demostrado resultados trascendentes en el modelo experimental de inducción de quistes mediante ACTH y en ovarios de animales con COD de presentación espontánea. Se evaluó la expresión de las proteínas de interés en las categorías de folículos terciarios y folículos con 5, 10 y 15 días de persistencia. Para ello se compararon, para cada día de persistencia, folículos terciarios y persistentes; se realizó la comparación con la estructura de referencia, los folículos terciarios controles y además se realizó el análisis a lo largo del tiempo para las categorías de folículos terciarios (considerando como cero persistencia a los folículos terciarios control) y persistentes.

### 4.3.1. Expresión de Activina

La inmunomarcación de activina se observó en el citoplasma de los estadios foliculares estudiados, tanto en células de la teca interna como en células de la granulosa (figura 82).

En la figura 83, se muestra la expresión de activina en células de la granulosa. Se encontraron diferencias entre las estructuras del día 10 de persistencia, siendo los folículos terciarios los que mostraron el menor porcentaje de área inmunomarcada ( $p < 0,05$ ), sin diferencias en los otros puntos de muestreo. Al comparar estas estructuras contra el folículo terciario control (estructura de referencia) se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con los folículos persistentes de 15 días (figura 83A). Cuando se evaluó a lo largo del periodo de persistencia cada categoría folicular solo se encontró una tendencia a aumentar en los folículos persistentes de 15 días en relación a los de 5 días ( $p = 0,75$ ).

En cuanto a las células de la teca no se obtuvieron diferencias significativas en la relación entre folículos terciarios y persistentes de los diferentes grupos (figura 84), ni con la estructura de referencia ni a lo largo del tiempo de persistencia por categoría evaluada.

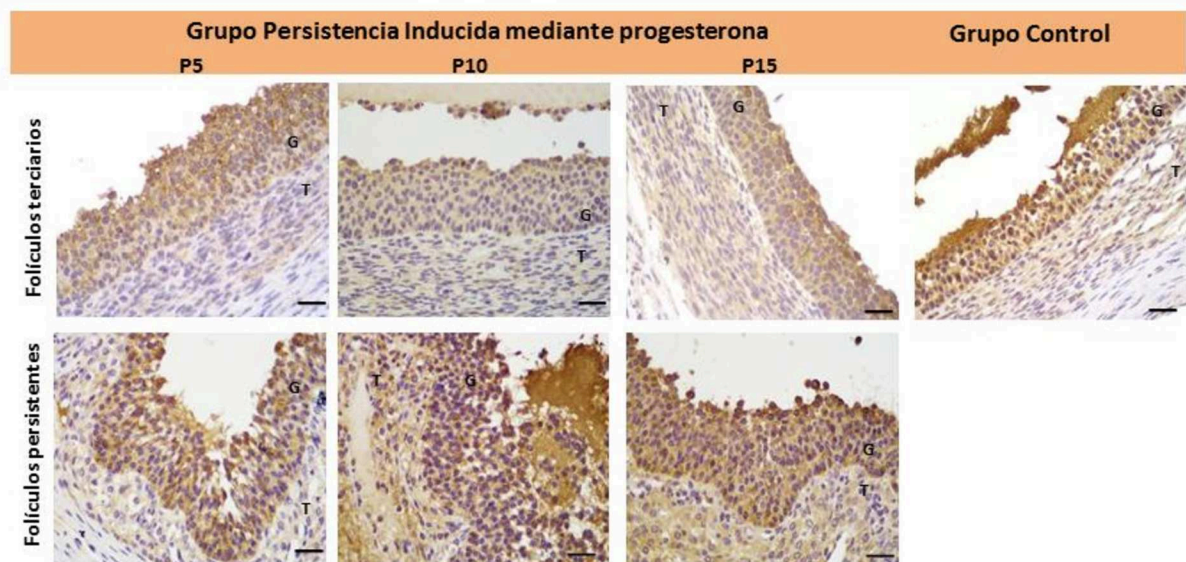


Figura 82: Folículos terciarios y persistentes inmunomarcados para **Activina** en animales de los grupos control y persistencia inducida a los 5, 10 y 15 días. La barra corresponde a 25  $\mu\text{m}$ . G: granulosa; T: Teca interna.

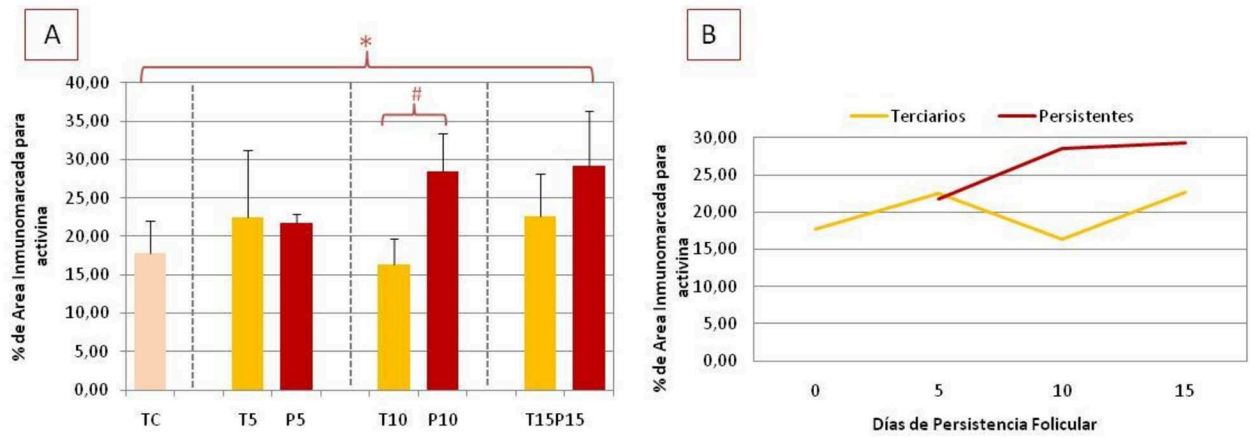


Figura 83: **A:** Porcentaje de área inmunomarcada para **Actívina** en células de la **granulosa** de diferentes categorías foliculares y pertenecientes a diferentes grupos (TC: Terciarios Controles; T5: Terciarios de 5 días de Persistencia, T10: Terciarios de 10 días de Persistencia, T15: Terciarios de 15 días de Persistencia; P5: Persistentes de 5 días, P10: Persistentes de 10 días, P15: Persistentes de 15 días). **B:** Evolución de la inmunomarcación a lo largo de la persistencia. El asterisco (\*) y el numeral (#) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las estructuras señaladas según corresponda.

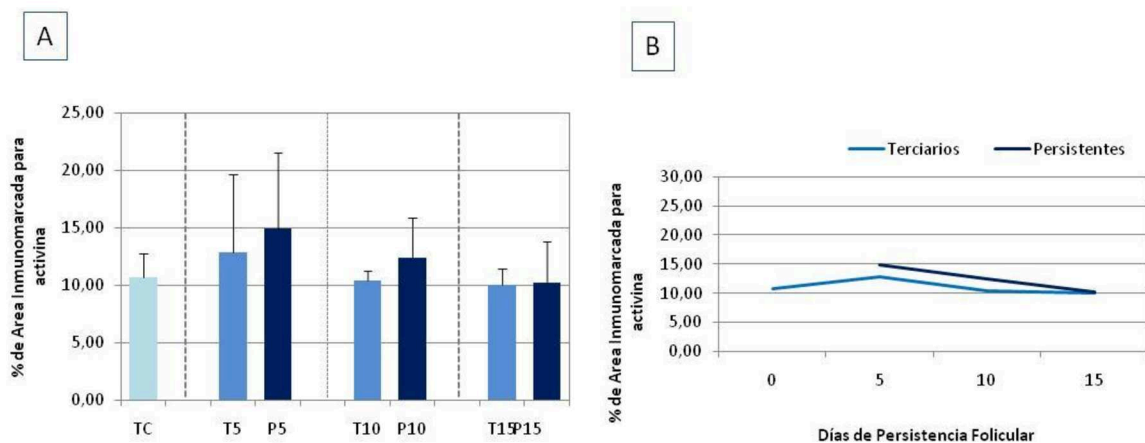


Figura 84: **A:** Porcentaje de área inmunomarcada para **Actívina** en células de la **teca interna** de diferentes tipos foliculares y pertenecientes a distintos grupos (TC: Terciarios Controles; T5: Terciarios de 5 días de Persistencia, T10: Terciarios de 10 días de Persistencia, T15: Terciarios de 15 días de Persistencia; P5: Persistentes de 5 días, P10: Persistentes de 10 días, P15: Persistentes de 15 días) **B:** Evolución de la inmunomarcación a lo largo de la persistencia.

#### 4.3.2. Expresión de Inhibina en pared folicular

Al igual que lo observado con el modelo de inducción y en casos espontáneos de la COD, así como en grupos control, en este modelo de persistencia sólo las células de la granulosa de los folículos terciarios de mayor tamaño y de los folículos persistentes presentaron marcación positiva para inhibina. Las células de la teca no mostraron esta marcación (figura 85). No se detectaron diferencias entre folículos terciarios y

persistentes para cada grupo de persistencia ni con la estructura de referencia (figura 86A). Se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre folículos persistentes del día 5 y del día 10, estos últimos evidenciaron la marcación más intensa (figura 86B).

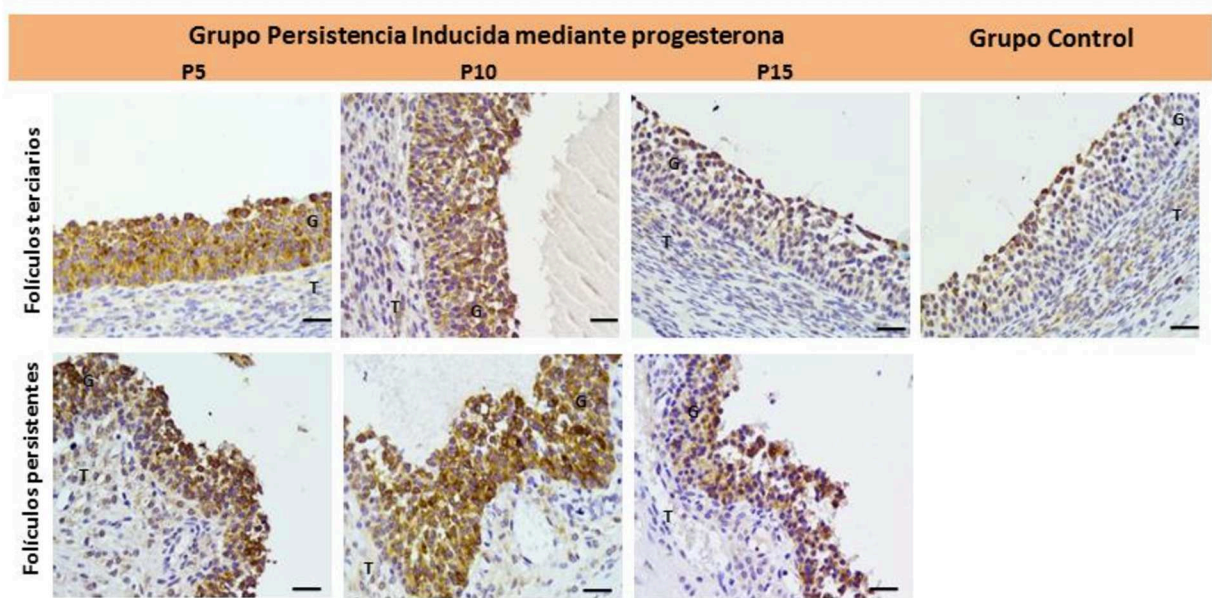


Figura 85: Folículos terciarios y persistentes inmunomarcados para **Inhibina** en animales de los grupos control y persistencia inducida a los 5, 10 y 15 días. La barra corresponde a 25  $\mu\text{m}$ . G: granulosa; T: Teca interna.

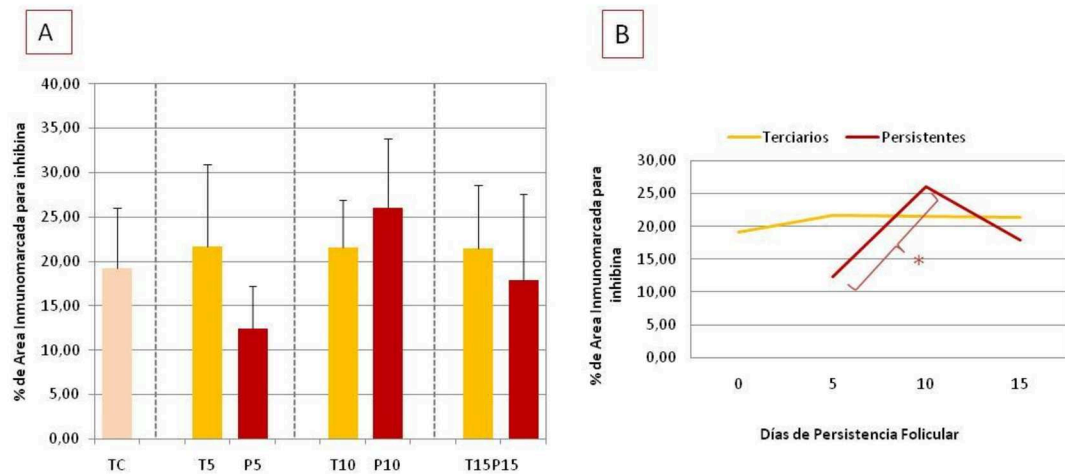


Figura 86: **A:** Porcentaje de área inmunomarcada para **Inhibina** en células de la **granulosa** de varios tipos foliculares y pertenecientes a diferentes grupos (TC: Terciarios Controles; T5: Terciarios de 5 días de Persistencia, T10: Terciarios de 10 días de Persistencia, T15: Terciarios de 15 días de Persistencia; P5: Persistentes de 5 días, P10: Persistentes de 10 días, P15: Persistentes de 15 días). **B:** Evolución de la inmunomarcación a lo largo de la persistencia. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en este caso, entre estructuras de un mismo tipo folicular.

### 4.3.3. Concentración de Inhibina B en líquido folicular y suero

Se evaluó la concentración folicular y sérica de inhibina B en muestras de los grupos control y con 5, 10 y 15 días de persistencia. Como se puede observar en la figura 87, la concentración de inhibina en LF fue similar entre grupos, sin embargo, se detectaron diferencias a nivel sérico, donde la mayor concentración de inhibina fue obtenida en los folículos con 15 días de persistencia ( $p < 0,05$ ).

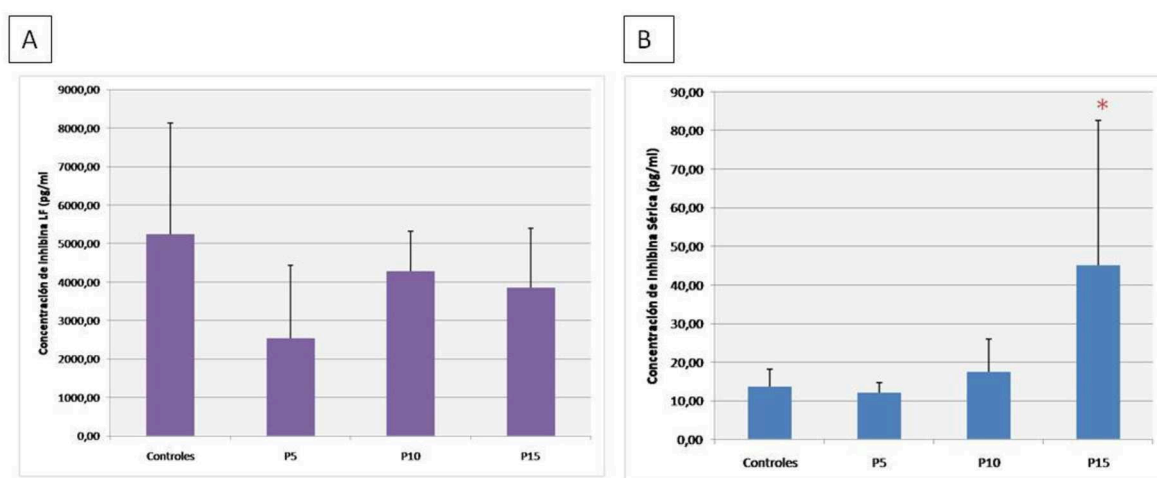


Figura 87: Representación de la concentración de **Inhibina B**. **A:** en líquido folicular y **B:** en suero proveniente de folículos controles y con persistencia inducida a los 5, 10 y 15 días. El asterisco indica diferencias significativas con el resto de los grupos ( $p < 0,05$ ).

### 4.3.3. Expresión de Foliculostatina

La foliculostatina en este modelo ha sido localizada en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna evaluadas (figura 88). En las primeras se han observado diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los folículos persistentes y terciarios de animales con 10 días de persistencia (Figura 89A). A lo largo del tiempo se observó una tendencia ( $p = 0,1$ ) de los folículos persistentes de 5 días a expresar menores niveles de foliculostatina en relación a los de 10 días de persistencia (figura 89B).

En las células de la teca interna, la menor inmunomarcación se detectó en los folículos terciarios de ovarios con folículos persistentes de 10 días, determinando diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con los folículos con igual persistencia. Cuando se realizó la

#### 4. Resultados

evaluación por tiempo de persistencia se encontró una tendencia a aumentar la expresión en los folículos persistentes de 15 días en relación a los de 10 días ( $p=0,1$ ) (figura 90).

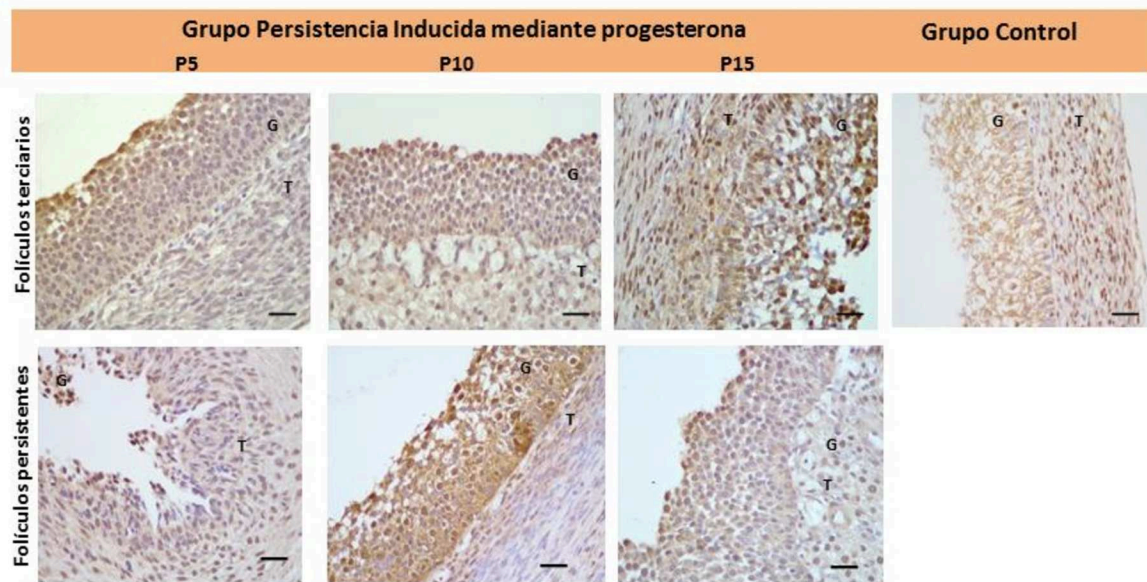


Figura 88: Folículos terciarios y persistentes inmunomarcados para **Folliculostatina** en animales de los grupos control y persistencia inducida a los 5, 10 y 15 días. La barra corresponde a 25  $\mu$ m. G: granulosa; T: teca interna.

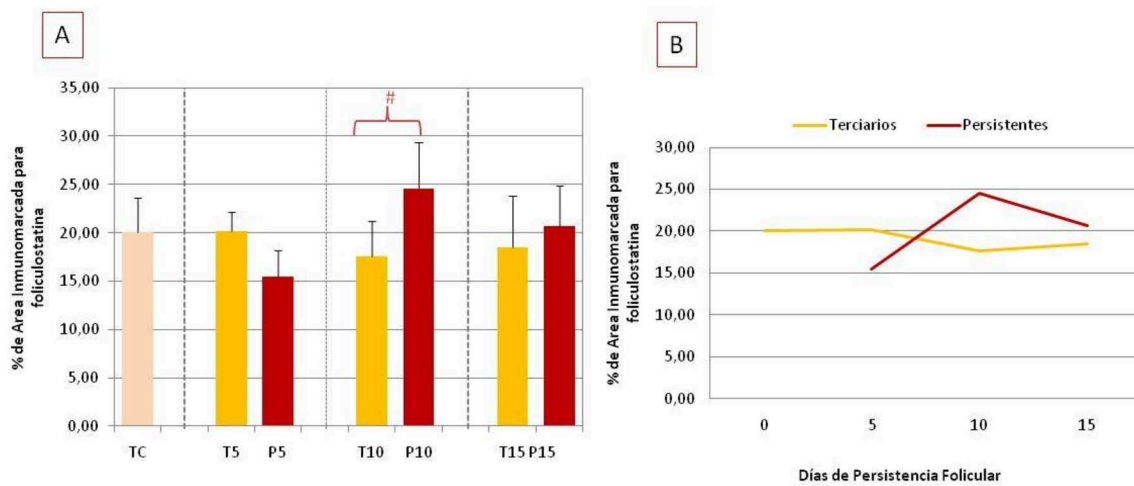


Figura 89: **A:** Porcentaje de área inmunomarcada para **Folliculostatina** en células de la **granulosa** de los tipos foliculares pertenecientes a distintos grupos (TC: Terciarios Controles; T5: Terciarios de 5 días de Persistencia, T10: Terciarios de 10 días de Persistencia, T15: Terciarios de 15 días de Persistencia; P5: Persistentes de 5 días, P10: Persistentes de 10 días, P15: Persistentes de 15 días). El numeral (#) indica diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre las estructuras señaladas según corresponda. **B:** Evolución de la inmunomarcación a lo largo de la persistencia.

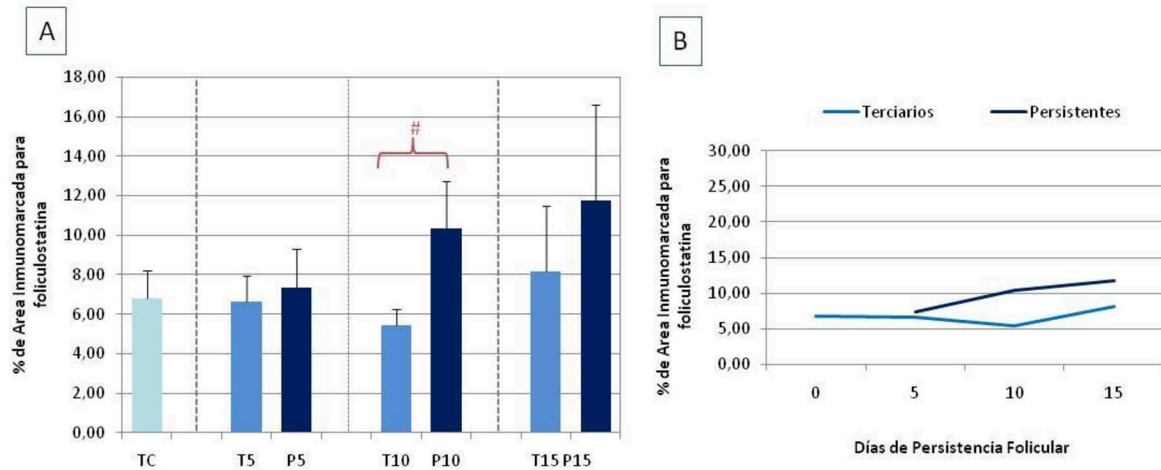


Figura 90: **A:** Porcentaje de área inmunomarcada para **Foliculostatina** en células de la **teca interna** de los tipos foliculares pertenecientes a diferentes grupos y a diferentes estructuras foliculares (TC: Terciarios Controles; T5: Terciarios de 5 días de Persistencia, T10: Terciarios de 10 días de Persistencia, T15: Terciarios de 15 días de Persistencia; P5: Persistentes de 5 días, P10: Persistentes de 10 días, P15: Persistentes de 15 días). El numeral (#) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las estructuras señaladas. **B:** Evolución de la inmunomarcación a lo largo de la persistencia.

#### 4.3.4. Expresión de TGF- $\beta$ 1

En cuanto a la isoforma 1 del TGF- $\beta$ , fue detectada en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna (figura 91). En las células de la granulosa, la inmunomarcación de los folículos terciarios fue mayor a la detectada en folículos persistentes del día 5 ( $p < 0,05$ ) (figura 92A). Cuando se evaluó a lo largo de la persistencia pudo observarse una disminución en la expresión de esta proteína en los folículos con 15 días de persistencia en relación a los de 5 días ( $p < 0,05$ ) (figura 92B).



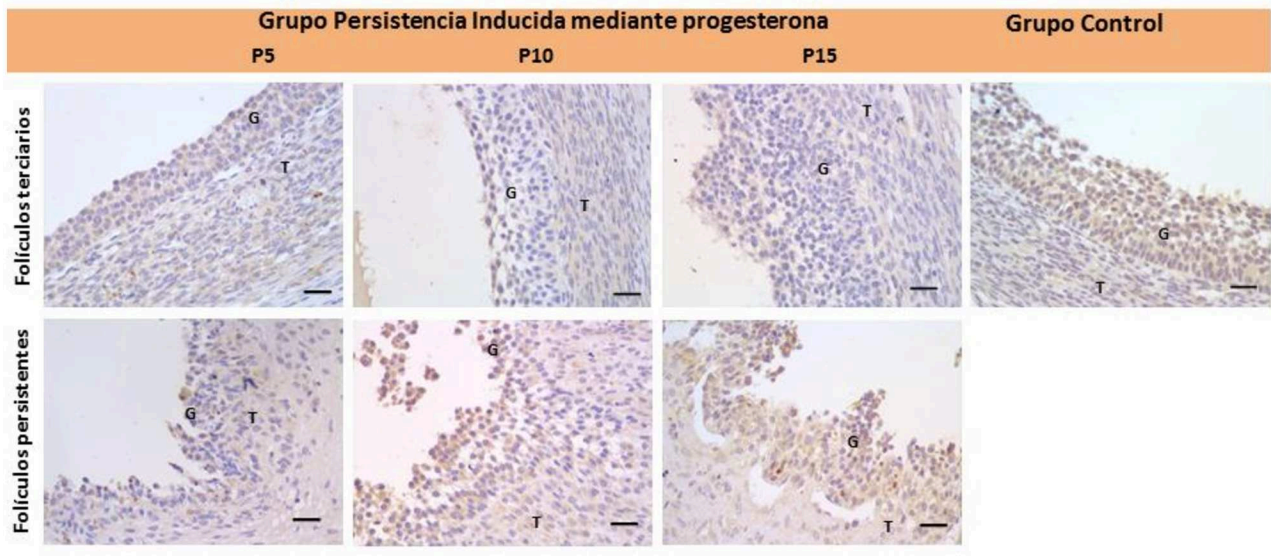


Figura 91: Folículos terciarios y persistentes inmunomarcados para **TGF-β1** en animales de los grupos control y persistencia inducida a los 5, 10 y 15 días. La barra corresponde a 25 μm. G: granulosa; T: teca interna.

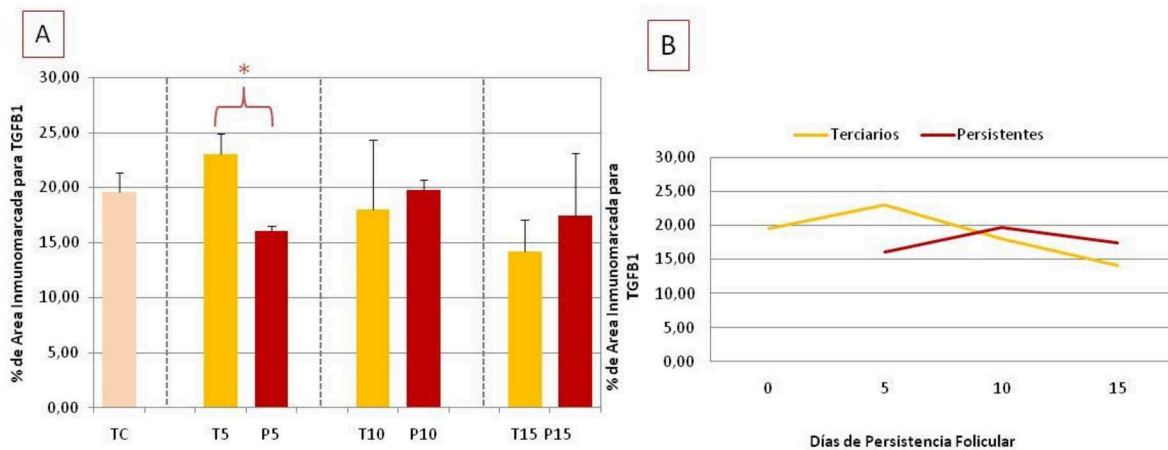


Figura 92: **A:** Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β1** en células de la **granulosa** de los tipos foliculares pertenecientes a diferentes estructuras y a los distintos grupos (TC: Terciarios Controles; T5: Terciarios de 5 días de Persistencia, T10: Terciarios de 10 días de Persistencia, T15: Terciarios de 15 días de Persistencia; P5: Persistentes de 5 días, P10: Persistentes de 10 días, P15: Persistentes de 15 días). El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las estructuras señaladas. **B:** Evolución inmunomarcación a lo largo de la persistencia.

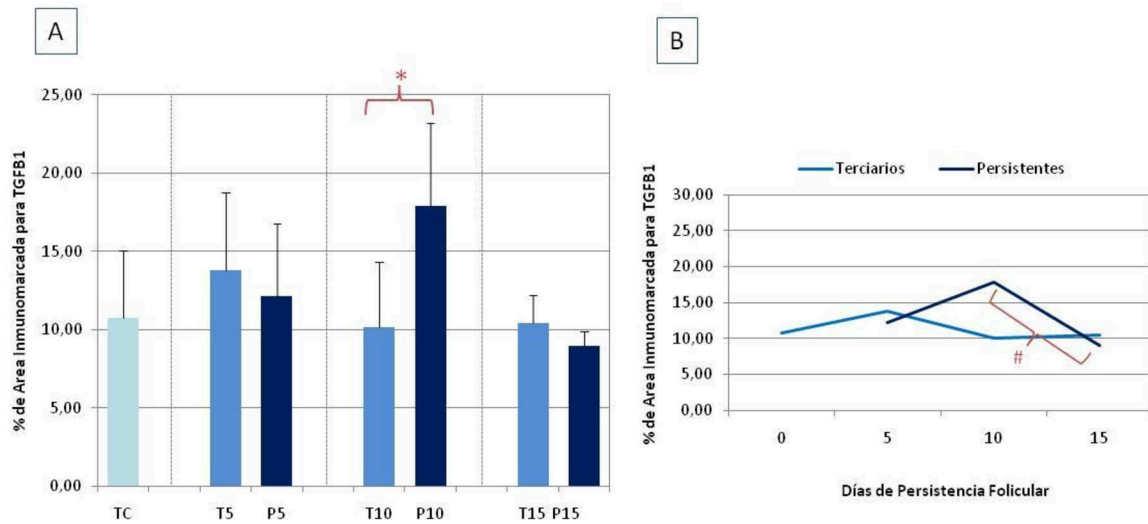


Figura 93: **A:** Porcentaje de área inmunomarcada para **TGF-β1** en células de la **teca interna** de los tipos foliculares pertenecientes a diferentes grupos (TC: Terciarios Controles; T5: Terciarios de 5 días de Persistencia, T10: Terciarios de 10 días de Persistencia, T15: Terciarios de 15 días de Persistencia; P5: Persistentes de 5 días, P10: Persistentes de 10 días, P15: Persistentes de 15 días). **B:** Evolución de la inmunomarcación a lo largo de la persistencia. El asterisco (\*) y el numeral (#) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las estructuras señaladas.

## ***5. DISCUSIÓN***



### **5.1. INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA: RELACIONES CON HALLAZGOS EN LA ENFERMEDAD ESPONTÁNEA EN BOVINOS**

Ha sido claramente documentado que la mayor dificultad a la hora de estudiar la COD en bovinos es que la formación de quistes sólo puede ser abordada luego de que el folículo haya atravesado numerosos cambios morfológicos y fisiológicos desconocidos (Roth y col., 2012). El tratamiento con ACTH determinó cambios en las concentraciones de las hormonas esteroides en suero. Los niveles de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y cortisol aumentaron durante el tratamiento con ACTH mientras que la testosterona no mostró cambios. Después del tratamiento, el  $17\beta$ -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 descritos por Dobson y col. (2000), quienes mostraron que los niveles de estrógenos permanecen elevados hasta el día 30 aproximadamente. Es por ello que proponen que dicha hormona junto a la inhibina (pero no la ACTH, cortisol o progesterona) ejercen un fuerte efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH (Baird y col., 1991), que impide que se inicie una nueva onda de crecimiento folicular. Sin embargo, estos autores no analizaron los niveles de testosterona. En nuestro estudio, la testosterona aumentó en el grupo control hacia el final del muestreo (días 26 a 28), lo que presumiblemente se deba a uno o varios de los folículos de la primera onda de crecimiento folicular post-ovulación. Para esos días (alrededor del día 6-7 del nuevo ciclo estral a partir de la ovulación), suelen ser de un tamaño mayor a 10 mm (Bo y Caccia, 2002), son capaces de producir una importante cantidad de andrógenos en la teca que luego serán aromatizados en la granulosa.

Al momento de la ovariectomía, se encontró una clara asociación entre los niveles en suero y líquido folicular de  $17\beta$ -estradiol y progesterona, tanto en folículos control como en quistes inducidos y espontáneos. 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 y col., 2011; 2013). En este sentido, no han sido descritas alteraciones en la función adrenal ni en el cortisol sérico entre vacas cíclicas normales y vacas con COD (Silvia y col., 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 esto podríamos sugerir que no existe evidencia que indique una alteración en la función adrenal en vacas con la enfermedad. Debido a que los glucocorticoides sólo serían sintetizados en la corteza adrenal y viajan sistémicamente por todo el organismo, la presencia de una ruta enzimática local es crucial para modular las concentraciones de la forma activa de dicha hormona (Krozowski y col., 1999; Tetsuka y col., 2003).

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

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 y Yoshimura, 2007; Salvetti y col., 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. En este contexto, la capacidad de los glucocorticoides para inhibir la apoptosis de células de la granulosa (Sasson y col., 2001) también puede ser importante en la limitación de atresia de folículos antrales persistentes (y pueden incluso prevenir la degeneración apoptótica de quistes ováricos) (Amsterdam, 2002; Sunak y col. 2007, Komiyama y col. 2008).

Las vacas con quistes presentan altas concentraciones de LH en relación a vacas que ovulan normalmente, particularmente durante los últimos días, críticos en la maduración folicular (Hamilton y col., 1995). Los quistes foliculares ováricos tienen niveles altos de ARNm que codifica para receptores de LH, particularmente en células de la granulosa de acuerdo a lo descrito por Calder y col. (2001). Sin embargo, estos

resultados no coinciden por lo encontrado por Marelli y col. (2014) quienes detectaron baja expresión de receptores para LH así como una disminución en la expresión de los receptores de FSH en los quistes en relación s los folículos controles. Las discrepancias posiblemente se deban a la clasificación de los folículos quísticos en dominantes y no dominantes que realizaron Calder y col. (2001). Las modificaciones en los receptores de gonadotrofinas probablemente influyan en las acciones de las mismas a nivel folicular alterando la esteroidogénesis ovárica. Los folículos destinados a la formación de quistes secretan más  $17\beta$ -estradiol que los que ovulan normalmente (Kittok y col. 1974; Hamilton y col., 1995) posiblemente debido a su exposición a altos niveles de LH. El principal responsable de la formación de quistes, parece ser la falta del pico de  $17\beta$ -estradiol para estimular la liberación de una oleada de GnRH de los centros hipotalámicos, responsable de inducir el pico preovulatorio de LH. Este concepto se ve apoyado además, por la observación de que los tratamientos que bloquean el pico preovulatorio de LH en vacas con ciclos normales da lugar a la formación de folículos persistentes y en consecuencia quistes (Lee y col., 2001).

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

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 y col., (2010), a medida que avanza la persistencia en el tiempo de los folículos, se van perdiendo una gran cantidad células de la granulosa, las que, como consecuencia cambian o pierden la capacidad de producir ciertas hormonas. Dichas células son las encargadas de transformar los andrógenos provenientes de la teca interna en estrógenos, mediante un proceso de aromatización (Hafez y 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.

## 5.2. PERSISTENCIA FOLICULAR: MODELO DE INDUCCIÓN

Hemos comprobado que el desarrollo de un modelo que reproduce de manera fiel la situación *in vivo* o la identificación de criterios que permiten la clasificación de un folículo como un quiste futuro, antes de su transformación, es muy valioso en el estudio de cambios celulares y moleculares que preceden la formación del quiste ovárico. El estudio de los eventos tempranos en la formación de los quistes es fundamental si se pretende arribar a medidas que ayuden a un diagnóstico precoz y a tratamientos efectivos.

El modelo de inducción de persistencia folicular desarrollado en este trabajo permitió evidenciar cambios en las concentraciones de gonadotrofinas manifestados por la ausencia del pico preovulatorio de LH con la consiguiente falla en la ovulación. Siguiendo la conclusión de Hatler y colaboradores (2008) de que las concentraciones bajas de progesterona pueden reducir la capacidad del  $17\beta$ -estradiol, endógeno o exógeno, de inducir un pico preovulatorio de LH y la ovulación, el modelo fue congruente. Se vio modificada la pulsatilidad de LH, apareciendo en los grupos tratados una frecuencia pulsátil durante los 5, 10 y 15 días de persistencia, similar a la observada en el proestro de los animales controles pero de menor amplitud. Estas modificaciones en los perfiles plasmáticos de LH sumadas a concentraciones de FSH basales a través del tiempo, permitieron en los animales tratados, la persistencia y el crecimiento continuo del folículo dominante hasta los 15 días. De esta manera, se corrobora lo descrito por Bridges y Fortune (2003), que concentraciones subluteales de progesterona son capaces de inducir un incremento en la frecuencia de los pulsos de LH, inhibiendo su pico preovulatorio y así la ovulación.

Si evaluamos los valores de hormonas esteroides en suero y en líquido folicular, obtenidos al final del experimento, en la ovariectomía, la progesterona sérica presentó mayor concentración en los animales con folículos persistentes de 5 días mientras que en aquellos con folículos de 15 días disminuyó de manera análoga a lo observado en los quistes espontáneos. En cuanto al líquido folicular, la concentración de esta hormona fue baja en todos los animales con folículos persistentes en relación a los folículos preovulatorios controles. Los datos referentes a esta hormona concuerdan con lo hallado en el modelo de inducción de quistes mediante ACTH y en los casos espontáneos. En cambio, la concentración de 17-hidroxiprogesterona se incrementó de manera

proporcional al aumento de días en persistencia, tanto en suero como en líquido folicular.

Al parecer los folículos dominantes pueden desarrollarse de manera normal durante la exposición a corto plazo de niveles subluteales de progesterona y es necesaria una exposición más prolongada a una frecuencia elevada de LH para provocar los cambios en la esteroidogénesis folicular (Bigelow y Fortune, 1998; Shaham-Albalancy y col., 2000) y en la maduración del ovocito (Mihm y col., 1994). Esto ha sido asociado con una reducción de la fertilidad (Bridges y Fortune, 2003).

Se ha descrito además, que el aumento de  $17\beta$ -estradiol en plasma que acompaña la prolongada dominancia folicular puede ser atribuido a un aumento de la masa de tejido folicular. El aumento de la capacidad secretora de  $17\beta$ -estradiol de folículos dominantes persistentes en un ambiente hormonal de progesterona subluteal se puede atribuir a un aumento de la masa de tejido con capacidad esteroidogénica por recibir mayor frecuencia de estimulación con LH. En ausencia de los efectos inhibidores normales correspondientes a las concentraciones de progesterona luteales, estos folículos dominantes persistentes desarrollan un mayor volumen de teca interna que puede producir relativamente mayores niveles de andrógenos tras la estimulación frecuente por parte de LH. Un número normal de células de la granulosa entonces aromatiza estos andrógenos a  $17\beta$ -estradiol, y los resultados son concentraciones mayores de  $17\beta$ -estradiol en plasma en el ganado vacuno con folículos persistentes frente a aquellos con folículos dominantes normales. El aumento de la capacidad de producir la progesterona sugiere que una prematura luteinización de estos folículos puede ser un factor implicado en la disminución de la fertilidad de los ovocitos provenientes de estos folículos (Bigelow y col., 1998). Esto se condice con los resultados hallados que demuestran que la concentración de  $17\beta$ -estradiol en suero y en líquido folicular aumentó en la persistencia hasta el día 10, para decaer hasta el día 15.

Por otra parte, investigaciones previas aseguran que los folículos persistentes poseen una mayor capacidad de producción de progesterona lo que sugiere una luteinización prematura (Bigelow y col., 1998).

Sumados a los cambios en los niveles de gonadotrofinas, también se observaron cambios a nivel morfológico, ya que los folículos persistentes en los distintos días de persistencia, mostraron una pérdida de espesor en las capas de la granulosa y teca, a medida que avanzaba el tiempo de persistencia. La sumatoria de hallazgos, permiten postular que podría desencadenarse una maduración prematura de los ovocitos



pertenecientes a folículos dominantes persistentes según lo descrito por Revah y Butler (1996), y como consecuencia generar alteraciones en la fecundación o aumento en la mortalidad embrionaria.

En función de estos resultados, podemos inferir que este modelo de inducción de folículos persistentes reproduce diversos aspectos endocrinos de la COD y de la persistencia folicular asociada, característica que lo convierte en una herramienta de gran utilidad para el estudio de factores involucrados en los mecanismos etiopatogénicos iniciales de la enfermedad quística ovárica bovina.

### **5.3. EXPRESIÓN DE TGF- $\beta$ EN LA FOLICULOGÉNESIS NORMAL Y EN ANIMALES CON COD ESPONTÁNEA E INDUCIDA Y EN LA PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA**

En este estudio encontramos diferencias en la expresión de las tres isoformas del TGF- $\beta$  en las estructuras foliculares entre animales control y aquellos con COD espontánea e inducida. Hallamos una elevada expresión de TGF- $\beta$ 1 y 2 en quistes en relación a los folículos atrésicos y terciarios control.

Los resultados para la expresión proteica de la isoforma TGF- $\beta$ 1 en el ovario normal difieren de los descritos anteriormente en el ganado bovino, probablemente debido a diferencias metodológicas. Nilsson y col. (2003) no encontraron expresión proteica de TGF- $\beta$ 1 en la teca interna y sí en la granulosa de folículos terciarios de hasta 2 mm de diámetro. Aunque el anticuerpo utilizado fue el mismo, las diferencias en el proceso de fijación y en los fijadores tisulares utilizados son probablemente la causa de estas discrepancias. Sin embargo, los mismos autores encontraron la expresión de ARNm para todas las isoformas TGF- $\beta$  en todas las estructuras foliculares estudiadas tanto en la granulosa como en la teca interna, que apoyan los resultados de nuestro estudio. Por otro lado, los resultados previamente obtenidos por estos autores (Nilsson y col., 2003) en relación con TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 son consistentes con los que aquí se presentan, con una alta expresión en las células de la granulosa y teca en todas las estructuras estudiadas en los animales control.

En cuanto a la regulación de la expresión de TGF- $\beta$ s, los experimentos realizados por Nilsson y colaboradores (2003) determinaron que la expresión TGF- $\beta$ 1 está regulada por gonadotrofinas en el ovario bovino. Estos resultados muestran que el tratamiento con FSH disminuye la expresión del ARNm de TGF- $\beta$ 1 en células de la granulosa. Además, no provocó cambios cuando se realizó el tratamiento con hCG, y no se observaron efectos en la expresión de las otras isoformas. Los resultados obtenidos por PCR en tiempo real han demostrado que el ARNm para el receptor de FSH en células de la granulosa es menor en los quistes foliculares que en folículos terciarios controles pequeños, medianos y grandes (Marelli y col., 2014). Estos menores niveles indicarían que esta hormona tiene menos influencia en los quistes, conduciendo a una desregulación en el nivel intracelular que podría tener un impacto en la expresión de varios factores de crecimiento y hormonas, incluyendo TGF- $\beta$ 1. Es lógico sugerir que un entorno endocrino alterado podría conducir a una alteración en el medio ovárico local y por lo tanto, en la expresión de importantes reguladores como TGF- $\beta$ s.

Las acciones de TGF- $\beta$  sobre la función de las células de la granulosa se sabe que varían entre especies. En roedores, los TGF- $\beta$ s son potentes estimuladores de la proliferación de éstas células (Dorrington y col., 1988; Roy, 1993; Saragüeta y col., 2002). Sin embargo, en especies de interés zootécnico, tales como el ganado bovino (TGF- $\beta$ 2), ovino (TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2) y porcino (TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2), estos factores de crecimiento tienen una acción levemente estimulante o incluso actúan como inhibidores en la proliferación y supervivencia de las células de la granulosa (Skinner y col., 1987; May y col., 1988; Gangrade y May, 1990; Gilchrist y col., 2003; Juengel y col., 2004; Juengel y McNatty, 2005). Además bajo condiciones in vitro, los TGF- $\beta$ s estimulan la síntesis de progesterona partir de células de la granulosa de roedores (Dodson y Schomberg, 1987; Hutchinson y col., 1987; Knecht y col., 1987), mientras que muestran efectos inhibidores en células de la granulosa de bovinos, ovinos (TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2) y cerdos (Mondschein y col., 1988.; Kubota y col., 1994; Gilchrist y col., 2003; Juengel y col., 2004; Juenguel y Mc Natty, 2005). Mediante el uso de un modelo de cultivo in vitro de células de la granulosa estimuladas con FSH, Zheng y col. (2008, 2009) observaron diferencias en la esteroidogénesis al agregar TGF- $\beta$ 1. Estos autores demostraron que en las células de la granulosa estimuladas con FSH, el 17  $\beta$ -estradiol y el TGF- $\beta$ 1 inhiben la secreción de progesterona y que, en ausencia de FSH, el 17  $\beta$ -estradiol estimula y el TGF- $\beta$ 1 inhibe la secreción de progesterona (Zheng y col., 2008, 2009). En contraste con los efectos de TGF- $\beta$  sobre células de la granulosa, los efectos

relacionados con la esteroidogénesis en las células teco/intersticiales parecen ser similares entre especies. El TGF- $\beta$  suprime la producción de andrógenos estimulada por LH o forskolina las células de teco-intersticiales en la rata (Magoffin y col., 1989; Hernández y col., 1990), porcinos (Caubo y col., 1989; Engelhardt y col., 1992), bovinos (Demeter-Arlotto y col., 1993) y humanos (Attia y col., 2000) (Juenguel y Mc Natty, 2005). La expresión de una proteína clave de control de la producción de andrógenos que cataliza la conversión de progestágenos a andrógenos, CYP17A1, y de la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis, (StAR), que facilita el transporte del colesterol en la mitocondria para la síntesis de esteroides, son reguladas por TGF- $\beta$  en células de la teca, indicando algunos de los mecanismos subyacentes comunes en la regulación de la producción de andrógenos entre las especies (Demeter-Arlotto y col., 1993.; Attia y col., 2000; Juenguel y Mc Natty, 2005).

Los animales con COD espontánea e inducida por ACTH así como también aquellos del modelo de inducción de folículos persistentes, tienen niveles bajos de progesterona intrafolicular en quistes y folículos persistentes, cuando se comparan con folículos preovulatorios, y aumento de los niveles de testosterona en quistes espontáneos (Amweg y col., 2013) y folículos persistentes. Teniendo en cuenta que en el presente trabajo, tanto TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 se incrementaron en los folículos quísticos en comparación con similares estructuras en el grupo de control como a lo largo de la foliculogénesis en el mismo grupo, se puede sugerir que estos factores de crecimiento podrían influir en algunos aspectos de la esteroidogénesis. Por otra parte, en el modelo de persistencia folicular se observó que existen cambios tempranos durante la persistencia observándose una disminución en la expresión de TGF- $\beta$ 1 en las células de la granulosa de los folículos persistentes de 5 días en relación a los terciarios del mismo tiempo de persistencia. Además se observó un incremento en la expresión de dicha isoforma en las células de la teca de los folículos persistentes del día 10 en relación a los terciarios del mismo grupo. En estas células se observó, además, una disminución en la expresión en los folículos persistentes entre los días 10 y 15. Estos datos sugieren que las alteraciones tempranas en la formación de quistes podrían influir en la funcionalidad ovárica a largo plazo ya que la expresión de este factor de crecimiento influye en la foliculogénesis, desarrollo y maduración folicular.

En estudios *in vitro*, Zheng y col. (2009) demostraron que en las células de la granulosa, TGF- $\beta$ 1 promueve la apoptosis y reduce la entrada en la fase proliferativa del ciclo celular, independientemente de la estimulación por FSH. Se ha confirmado tanto por

nosotros y otros investigadores, que el balance proliferación / apoptosis se altera en los folículos quísticos en animales con COD espontánea e inducida por ACTH (Isobe y Yoshimura 2007; Salvetti y col. 2010). Mientras que diversos factores influyen en este delicado equilibrio, el sistema TGF- $\beta$  podría desempeñar un papel importante mediante la adición de sus acciones anti-proliferativas a otros sistemas tales como el sistema factor de crecimiento similar a insulina (IGF). Se ha observado que la expresión y la biodisponibilidad de IGF1, un potente inductor de la proliferación, es menor en quistes que en estructuras análogas en el ovario (Ortega y col., 2008; Rodríguez y col., 2013). Sin embargo, también se ha observado que la proliferación en quistes foliculares está disminuida, con bajos niveles de apoptosis (Salvetti y col., 2010). Tales circunstancias inusuales que favorecen la persistencia de estas estructuras, que continúan secretando niveles alterados de factores de crecimiento y hormonas contribuirían a la patogenia de esta enfermedad.

#### **5.4. SISTEMA ACTIVINA- INHIBINA-FOLICULOSTATINA: EXPRESIÓN EN LA FOLICULOGÉNESIS NORMAL Y EN ANIMALES CON COD ESPONTÁNEA E INDUCIDA Y PERSISTENCIA FOLICULAR 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 y Cortvrindt, 1998; Liu y col., 1999; McNatty y col., 2000; Knight y Glister, 2001; Zhao y col., 2001; Drummond y col., 2002; Pangas y col., 2002; Glister y col., 2006; Knight y Glister, 2006). En el caso particular de los bovinos, estas tres proteínas son sintetizadas por las células de la granulosa, ejerciendo no sólo un efecto autocrino sino también paracrino sobre las células de la teca y el ovocito (Knight y Glister, 2001). Los datos obtenidos por nosotros sobre la expresión de activina y foliculostatina muestran expresión positiva mediante inmunohistoquímica tanto en granulosa como en teca interna. Sin embargo, la escasa marcación en las células de la teca interna nos permite inferir que esa débil expresión pueda deberse al pasaje de dichas proteínas desde la capa de células de la granulosa para cumplir con su rol paracrino. Es decir que, como fue descrito por Knight y Glister (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. Diferente es el caso de la inhibina, que sólo fue detectada por esta técnica en las células de la granulosa de los folículos terciarios 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 y col., 2000; Drummond y col., 2002; Pangas y col., 2002). Sin embargo, sus funciones en esta etapa no parecen ser determinantes o bien podrían ser suplementadas por otro sistema regulatorio, ya que estudios realizados con ratones mutantes deficientes en el receptor de activina tipo IIB detienen el desarrollo folicular en estadio antral temprano, sugiriendo que a partir de esta etapa la función de estas proteínas pasa a ser imprescindible en la foliculogénesis (Matzuk y col., 1996).

Los resultados obtenidos en la presente tesis indican que existe una expresión alterada del sistema activina-inhibina-foliculostatina en los ovarios de animales con COD tanto espontánea como inducida así como también en aquellos con persistencia folicular inducida mediante progesterona. Pudo observarse una elevada expresión de la subunidad  $\beta A$ , común a la activina A e inhibina A, y de la subunidad  $\alpha$  de la inhibina en animales con COD espontánea. Además, se observó un aumento en la expresión de activina en la granulosa de los folículos persistentes de 15 días en relación al grupo control, lo que coincide con lo observado en los quistes espontáneos e inducidos. Por otra parte la inhibina total en la granulosa de los folículos persistentes presentó variaciones que no se mantuvieron en el tiempo. En relación a los niveles séricos de inhibina B, pudo detectarse un aumento en los animales del grupo de persistencia de 15 días sin diferencias en el grupo de animales con COD espontánea. Las subunidades  $\beta$  tienen una alta secuencia de homología (63%), pero son reguladas diferencialmente durante el desarrollo folicular y a través de la selección y maduración del folículo ovárico (Muttukrishna y col., 1994). Las diferencias de expresión se reflejan en las respuestas funcionales (Thompson y col., 2004). Varios estudios han demostrado que la expresión de las subunidades no es consistente entre especies. Por ejemplo, en contraste con lo que sucede en el ganado lechero, Magoffin y Jakimiuk (1997, 1998) encontraron altos niveles de inhibina A y B en líquido folicular en pacientes con enfermedad poliquística ovárica (PCOD). Estos autores mostraron que la inhibina B es la forma predominante de inhibina en el líquido folicular tanto en ovarios poliquísticos como en

ovarios normales. La concentración de inhibina B fue 10 veces superior que la de inhibina A y 50 veces mayor que la de activina A (Magoffin y Jakimiuk, 1997; 1998). El sistema de inhibina/activina /foliculostatina actúa de manera autocrina/paracrina en el ovario. Niveles anormales de este sistema pueden ejercer un importante rol en el síndrome de ovario poliquístico y vincularse a la hiperinsulinemia (Shen y col., 2005). Los resultados obtenidos sobre activina muestran 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 y Glister (2003) e indican que el porcentaje de área inmunomarcada fue directamente proporcional al tamaño folicular. La información aportada en este trabajo confirma la importancia de la activina en estadios foliculares avanzados, donde a medida que los folículos crecen, 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, apoyando los conocimientos acerca de las funciones de esta proteína en cuanto a la estimulación de la diferenciación y la proliferación celular.

Nuestros resultados indican que los altos niveles de expresión encontrados para la subunidad  $\alpha$  en secciones de tejido probablemente corresponden mayoritariamente a la inhibina A. Esto se sugiere considerando que los niveles intrafoliculares de inhibina B (subunidades  $\beta$ B) en quistes fueron menores que los detectados en folículos terciarios grandes en el grupo de control, y que además, el anticuerpo utilizado en la técnica de inmunohistoquímica para la localización de la activina detecta exclusivamente la subunidad  $\beta$ A, que es compartida entre la activina  $\beta$ A y la inhibina  $\beta$ A. En folículos antrales grandes en bovinos, Beg y col. (2002) encontraron que la concentración de inhibina B disminuye en folículos de entre 8,0 y 8,9 mm y entre 10,0 y 10,9 mm de diámetro folicular y que la activina A aumenta entre 7,0 y 7,9 mm y entre 9,0 y 9,9 mm de diámetro folicular. La concentración de inhibina B observada por Beg y col. (2002) en vacas sanas coincide con la encontrada por nosotros en líquido folicular de folículos grandes en los animales control. La disminución en la concentración de inhibina B observada en los quistes podría relacionarse con una menor expresión de la subunidad  $\beta$ B y una mayor expresión de la subunidad  $\beta$ A, alterando el equilibrio activina A / inhibina A. Los resultados en el modelo de persistencia indicarían que los cambios observados en cuanto a la expresión de estas moléculas ocurren de manera temprana y

son dinámicos en la medida que la persistencia se desarrolla a lo largo del tiempo. Consecuentemente, conduciría a una alteración en diferente sentido de los integrantes de esta superfamilia, contribuyendo a un desbalance generalizado en el ambiente hormonal local.

En quistes en vacas, Kaneko y col. (2002) encontraron que la inhibina A plasmática se mantiene en niveles altos durante un largo período, asociada con el crecimiento de los folículos dominantes persistentes, y que luego disminuye en folículos dominantes que cesan de crecer o cuando se produce la ovulación. Sin embargo, estos autores no midieron la concentración folicular de inhibina A. Beg y col. (2002) encontraron niveles similares de inhibina A total y en los folículos de diferentes ondas foliculares en vacas.

Diversos estudios han confirmado los efectos autocrinos/paracrinos de la activina para promover la proliferación y mantener la diferenciación de células de la granulosa (Knight y col. 2012). Por ejemplo, el tratamiento de células de la granulosa con activina provenientes de ratas inmaduras tratadas con dietilestilbestrol (DES), puede regular el incremento de la expresión del receptor de FSH, mejorando la capacidad de respuesta a la FSH y LH, aumentando la expresión de la subunidad  $\alpha$  de la inhibina y del ARNm de foliculostatina (Knight y col.1996). En presencia de la FSH, la activina puede mejorar la actividad y por ende, la secreción de estrógenos y de progesterona, así como aumentar la expresión de receptor de FSH y foliculostatina (Knight y col. 1996). Esta acción ampliamente aceptada de activina en la promoción de la expresión del receptor de FSH actúa con más éxito en niveles menores de foliculostatina (Knight y col., 1996). Activina A también reduce la secreción de andrógenos (Hillier y col., 1991), y la activina B suprime la producción de andrógenos de células de la teca cultivada in vitro (Young y col., 2012).

Aunque se encontró un aumento de la expresión de la subunidad  $\beta A$  de la activina, esto no está totalmente relacionado con los cambios observados típicamente en los quistes foliculares tal como una disminución en la proliferación y la apoptosis (Salveti y col., 2010) y un aumento de los niveles de andrógenos y concentraciones normales de estrógenos (Amweg y col., 2013). Estudios anteriores han demostrado que el equilibrio entre proteínas pro-y anti-apoptóticas está a favor de la supervivencia celular, pero con bajos niveles de proliferación celular (Isobe y Yoshimura, 2007; Salvetti y col., 2009, 2010). Sin embargo, debido a la interacción entre los componentes del sistema, los resultados con respecto a la expresión de la inhibina y foliculostatina y la relación entre estas moléculas también deben ser considerados.

Las activinas y las inhibinas, secretadas por células de la granulosa, pueden funcionar como reguladores recíprocos de la producción de andrógenos de las células de la teca. La producción de inhibina por folículos seleccionados aumenta, de modo que la acción inhibidora de la activina en la producción de andrógenos es superada y el folículo produce cantidades crecientes de andrógenos, vitales para mantener el sustrato suficiente para la aromatización a estrógenos (Knight y col., 2012). Los niveles de subunidad  $\alpha$  y de la subunidad  $\beta A$  de la inhibina que se encuentran en los quistes foliculares exceden funcionalmente los niveles de activina  $\beta A$ , lo que resulta en un equilibrio en favor de las acciones de la inhibina en el ovario.

La foliculostatina se une a las isoformas de activina y, en menor medida, a las isoformas de inhibina a través de su subunidad común  $\beta$ . Esta acción se considera que representa el principal papel funcional de foliculostatina, en particular con respecto a la neutralización de la bioactividad de la activina debido a que la afinidad de foliculostatina por activina es similar a la existente entre la activina y sus receptores (Knight, 1996). El aumento en los niveles de foliculostatina coincide con el incremento de tamaño de los folículos, con los mayores niveles de expresión encontrados en los folículos terciarios (en todos los grupos) y en los folículos quísticos. Al oponerse a las acciones positivas de activina en células de la granulosa, la foliculostatina puede promover la atresia del folículo asociada con la disminución de la actividad aromataza, la secreción de inhibina y el aumento la producción de progesterona.

Basándonos en los resultados obtenidos, postulamos que el delicado balance entre los componentes del sistema activina-inhibina-foliculostatina está inclinado en favor de un bajo tono de activina. Esto podría contribuir a los mecanismos que conducen a la prolongada persistencia folicular, con bajos niveles de apoptosis y proliferación en estas estructuras (Isobe y Yoshimura, 2007; Salvetti y col. 2010) y una esteroidogénesis alterada (Amweg y col., 2013).

Por último, las diferencias encontradas entre la COD espontánea e inducida de ACTH se deben probablemente a las diferencias en las condiciones ambientales y el tiempo de persistencia de los quistes, lo cual podría influir en la expresión de estos componentes.



## 5.5. RECEPTORES DE LA SUPERFAMILIA TGF- $\beta$ : SU EXPRESIÓN EN LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA INDUCIDA Y ESPONTÁNEA

El esclarecimiento de la señalización interpretando roles efectores y moduladores de los receptores para los integrantes de esta superfamilia demuestra la importancia de cómo la modulación de las vías de comunicación intracelular y sus intermediarios participan en la diferenciación celular y el desarrollo del tejido, en este caso ovárico. Al hacer referencia a los receptores evaluados en esta tesis, ACTRIIB y TGF- $\beta$ RI, y TGF- $\beta$ RIII, destacamos que su presencia fue detectada en las células de granulosa y teca interna de todos los estadios foliculares.

Una comprensión detallada de la señalización generada por nuestros ligandos objetivo de estudio, nos lleva a citar que, para el caso de la inhibina, ésta antagoniza la señalización de la activina mediante la unión a receptores de activina tipo II, evitando así la formación de complejos activos de señalización con receptores tipo-I (Phillips y Woodruff, 2004). La inhibina sólo puede interactuar de manera efectiva con los receptores de tipo II cuando se une a otra molécula de la superficie celular, el TGF- $\beta$ RIII, que se considera esencial para la inhibina (Cook y col., 2004; Lewis y col., 2000). Si evaluamos los resultados obtenidos para el TGF- $\beta$ RIII, la mayor expresión se observó en células de la granulosa en los folículos secundarios y en quistes inducidos. En la teca interna se notó una marcación similar en cuanto a intensidad de marcación en folículos terciarios espontáneos y controles, lo que concuerda con lo estudiado por Glister y col. (2010). El análisis de la expresión del mRNA en células de la teca y en células de granulosa de folículos antrales bovinos reveló que la expresión era mayor en las primeras y que aumentó progresivamente con el crecimiento folicular (Glister y col., 2010). El TGF- $\beta$ RIII, además de unirse a las tres isoformas de TGF- $\beta$  (Segarini y col., 1989; Cheifetz y col., 1990), puede facilitar la unión de la inhibina a su receptor de señalización de tipo II (Wang y col., 1996; López-Casillas y col., 1993). Se ha demostrado recientemente que la inhibina-A puede antagonizar la señalización de TGF- $\beta$ RII mediante la promoción de la internalización de TGF- $\beta$ RIII en la superficie celular (Looyenga y col., 2010). Por lo tanto, es evidente que la inhibina está implicada en la modulación de la señalización por múltiples ligandos de la familia TGF- $\beta$  y no sólo activinas. Del mismo modo, TGF- $\beta$  puede modular la acción inhibina través de la

competencia por la unión con el TGF- $\beta$ RIII y/o mediante la modulación de la expresión del mismo (Farnworth y col., 2007).

En cuanto a ACTRIIB, su mayor presencia se detectó en la teca interna de los folículos quísticos provenientes de casos de COD espontánea. La expresión en folículos primarios espontáneos fue la más notoria al evaluar las células de la granulosa de todas las estructuras evaluadas. Esto concuerda con lo descrito por Glister y col. (2010), en folículos antrales bovinos cultivados, donde encontraron que había relativamente poca variación en la abundancia general para receptores de activina de tipo I (ACVR1 y ACVR1B) y II (ACVR2A y ACVR2B) durante el desarrollo del folículo de 1-18 mm; los que se expresaron tanto en células de teca y granulosa en todas las etapas. Esto concuerda con la presencia detectada en condiciones fisiológicas de la activina.

Para el caso del receptor TGF- $\beta$ RI, la expresión de su ARNm es alta en cultivos de ovarios de rata 4 días después del nacimiento, cuando hay principalmente folículos precursores primordiales y primarios presentes. Entre los días 4 y 8, esta expresión disminuye a medida que las células de la granulosa se multiplican en folículos primarios y preantrales. Entre los días 8 y 12, el ARNm TGF- $\beta$ RI aumenta coincidiendo con la diferenciación y el reclutamiento de células de la teca, la proliferación de células de la granulosa y la formación de folículos antrales. En relación al TGF- $\beta$ RI, encontramos que su expresión en células de la granulosa fue constante y similar en los folículos primarios, secundarios y antrales evaluados, presentando la mayor marcación los quistes espontáneos. La presencia en teca interna de los folículos espontáneos evaluados fue la más intensa de ambos tipos celulares evaluados. Una mayor expresión del TGF- $\beta$ RI podría favorecer las acciones del ligando, actuando de manera específica en los folículos en crecimiento, favoreciendo la persistencia y el recambio por nuevas estructuras quísticas. En cuanto a la expresión de los dos receptores y del correceptor, TGF- $\beta$ RIII, y, considerando las múltiples funciones de los ligandos anteriormente evaluados, es probable que su expresión aumentada en los quistes foliculares esté vinculada con la persistencia en el tiempo de las estructuras quísticas, evadiendo los mecanismos celulares de la apoptosis que permitan el reanudamiento de la actividad folicular.

Dada la complejidad y la naturaleza multifacética de la foliculogénesis ovárica, la tarea de desentrañar las funciones del sistema endocrino y las vías de señalización intra-ováricas que regulan este proceso esencial en condiciones patológicas es

verdaderamente interesante y brindaría datos aplicables al diseño de protocolos y medidas terapéuticas efectivas.

## ***6. CONCLUSIONES***



El éxito de los programas de salud reproductiva del rodeo puede ser monitoreado mediante diferentes parámetros, siendo uno de los más importantes, la cantidad de terneros producidos por vaca anualmente. Por lo tanto, cualquier alteración de la fisiología normal de la vaca, como la aparición de quistes foliculares, o alteraciones en la frecuencia de los ciclos estrales, son capaces de provocar una importante reducción en la eficiencia reproductiva de estos animales y en consecuencia, en la producción de terneros. Existe una fuerte justificación económica para desarrollar medidas preventivas y tratamientos para las alteraciones foliculares. Los resultados obtenidos en esta tesis aumentan el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad quística ovárica y los mecanismos involucrados en la persistencia folicular. Además, el desarrollo de los métodos necesarios para estos estudios, permiten disponer de herramientas no sólo para la investigación de estos trastornos, sino además, para su aplicación futura en el estudio de otras enfermedades. De esta manera, con los resultados obtenidos y la discusión de los mismos considerando los aportes de otros autores, obtuvimos las siguientes conclusiones:

1- Se ha demostrado previamente que TGF- $\beta$  influencia la esteroidogénesis, la proliferación folicular ovárica y la apoptosis. Por lo tanto, una alteración en su expresión puede contribuir a la patogenia de la COD bovina. Los niveles proteicos de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 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 de animales con COD tanto inducida como espontánea. Al abordar el estudio puntual de la isoforma TGF- $\beta$ 1 en el modelo de persistencia folicular, los resultados obtenidos consolidaron y complementaron los conocimientos obtenidos del modelo de desarrollo de quistes. Las diferentes isoformas de TGF- $\beta$ , implicadas globalmente como inhibidores de los mecanismos de proliferación celular, estuvieron sobreexpresadas en estructuras quísticas espontáneas, y la isoforma TGF- $\beta$ 1 mostró mayor expresión en los folículos con 10 días de persistencia. La baja proliferación demostrada en los folículos quísticos y en folículos que persisten, permiten sospechar un importante rol de estos factores de crecimiento.

2- Tanto activina como foliculostatina fueron detectadas en todos los estadios de desarrollo folicular, indicando una relación 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 y persistentes. Los efectos 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 esta tesis. 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 en relación con 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 las gonadotropinas que tienen dichas moléculas. Un desbalance en la expresión de los componentes del sistema inhibina-activina-foliculostatina contribuiría en la persistencia folicular observada en el modelo evaluado avalando los resultados encontrados en los casos de COD espontánea.

3- La evaluación de los receptores TGF- $\beta$ RI, ACTRIIB y TGF- $\beta$ RIII permitió identificar cambios en la expresión en los folículos quísticos en relación a los controles. Esto, junto con las alteraciones encontradas a nivel de los ligandos concretaría una modificación en la señalización favoreciendo las acciones de estos a nivel celular.

4- El modelo experimental de inducción de la COD 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 indeterminado en muchos casos espontáneos de la enfermedad. Además, el desarrollo y caracterización de un modelo para el estudio de la persistencia folicular desde estadios muy tempranos permitirá su utilización como herramienta para el estudio de aquellos factores que se encuentran alterados desde el inicio de la formación de los quistes. En este sentido, los modelos experimentales que permiten el estudio de los

cambios incipientes que ocurren muchas veces antes del diagnóstico, resultan fundamentales para ampliar los conocimientos referentes a la etiopatogenia temprana de los quistes y pueden ser utilizados en estrategias preventivas.

5- En relación al desarrollo del modelo de persistencia folicular podemos concluir que se han obtenido datos relevantes sobre lo que sucede en etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad, que llevarían finalmente a la formación de los quistes, con las consiguientes infructuosas inseminaciones artificiales o en mortalidad embrionaria temprana. Este aporte podría contribuir a medidas que ayuden a lograr diagnósticos oportunos y a tratamientos efectivos.

6- Ambos modelos desarrollados en animales afianzan la idea de que los modelos experimentales son necesarios para entender las enfermedades tanto en animales como en humanos y que los modelos animales con validación apropiada pueden ser usados para ensayos preclínicos, clínicos y terapéuticos así como para estudiar la patogénesis de complejos desórdenes reproductivos.

## ***7. BIBLIOGRAFÍA***





- Adams GP. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fertil.* 54: 1732.
- Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology.* 69: 72-80.
- Ahmad N, Schrick FN, Butcher RL, Inskoop EK. 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.* 52: 1129–1135.
- Alfaro NS, Salvetti NR, Velazquez MM, Stangaferro ML, Rey F, Ortega HH. 2012. Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Res. Vet. Sci.* 92(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.
- Amsterdam A, Sazón R, Keren-Tal I, Aharoni D, Dantes A, Rimón E, Land A, Cohen T, Dor Y, Hirsh L. 2003. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1355-1362.
- Amweg AN, Paredes AH, Salvetti NR, LARA HE, Ortega HH. 2011. Expression of melanocortin receptors mRNA, and direct effects of ACTH on steroids secretion in the bovine ovary. *Theriogenology.* 75: 628-637.
- Amweg AN, Salvetti NR, Stangaferro ML, Paredes AH, Lara HH, Rodríguez FM, Ortega HH. 2013. Ovarian localization of 11 $\beta$  Hydroxysteroid Dehydrogenase (11 $\beta$ HSD): Effects of ACTH stimulation and its relationship with bovine cystic ovarian disease. *Domestic animal Endocrinology* 45(3): 126-40.
- Andreone L, Velásquez EV, Abramovich D, Ambao V, Loreti N, Croxatto H, Parborell F, Tesone M, Campo S. 2009. Regulation of inhibin/activin expression in rat early antral follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 309: 48–54.
- Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. 2003. Making Sense of Latent TGFbeta Activation. *J. Cell.Sci.* 116: 217-224.

- Armstrong DG, McEvoy TG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R. 2002. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction*. 123: 371-378.
- Attia GR, Dooley CA, Rainey WE, Carr BR. 2000. Transforming growth factor- $\beta$  inhibits steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression in human ovarian thecal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 170, 123–129.
- Attisano L, Wrana JL, Montalvo E, Massague J. 1996. Activation of signalling by the activin receptor complex. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1066–73.
- Attisano L, Wrana JL. 2000. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12: 235–43.
- Attisano L, Wrana JL. 2002. Signal transduction by the TGF- $\beta$  superfamily. *Science*. 296 (5573): 1646-7.
- Baird DT, Campbell BK, Mann GE, Mcneilly AS. 1992. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J. Reprod. Fertil.* 43: 125-138.
- Bao B, Garverick, HA. 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotrophin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.* 76: 1903-1921.
- Baravalle C, Salvetti NR, Mira GA, Lorente JA, Ortega HH. 2007. Role of ACTH in the pathogenesis of Polycystic Ovarian Syndrome in the rat: hormonal profiles and ovarian morphology. *Physiol. Res.* 56: 67-78.
- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound. Repair. Regen.* 16: 585.
- Bartolomé JA, Thatcher WW, Melendez P, Risco CA, Archbald LF. 2005. Strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cysts in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227: 1409-1415.
- Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Ginther OJ. 2002. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biol. Reprod.* 66: 120-126.

- Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *J. dairy Sc.* 89(9): 3413-24.
- Bigelow KL, Fortune JE. 1998. Characteristics of prolonged dominant versus control follicles: follicle cell numbers, steroidogenic capabilities, and messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes. *Biol. Reprod.* 58: 1241-9.
- Bitzer M, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M. 2000. A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev.* 14:187-97.
- Bleach ECL, Glencross RG, Feist SA, Groome NP, Knight PG. 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.
- Bo GA, Caccia M. 2002. Dinámica folicular en el ganado bovino. En: Ungerfeld, R. *Reproducción en los animales domésticos.* Ed. Melibea. 57-70p.
- Bodensteiner KJ, Wiltbank, MC, Bergfelt DR, Ginther OJ. 1996. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology.* 45: 499-512.
- Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR. 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.
- Bridges PJ, Fortune JE. 2003. Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. *Domestic Animal Endocrinology.* 25: 199-214.
- Butcher RL, Pope RS. 1979. Role of estrogen during prolonged estrous cycles of the rat on subsequent embryonic death or development. *Biology of Reproduction.* 21: 491-495.

- Butler WR. 1997. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 449-457.
- Caestecker M. 2004. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15(1): 1-11.
- Calder MD, Manikkam M, Salfen BE, Youngquist RS, Lubahn DB, Lamberson WR, Garverick HA. 2001. Dominant bovine ovarian follicular cysts express increased levels of messenger RNAs for luteinizing hormone receptor and 3<sub>β</sub>-hydroxysteroid dehydrogenase<sub>4,5</sub> isomerase compared to normal dominant follicles. *Biol. Reprod.* 65: 471–6.
- 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.
- Casida LE, Mcshan WH, Meyer RK. 1944. Effects of an unfractionated pituitary extract upon cystic ovaries and nymphomania in cows. *J. Anim. Sci.* 3: 273-282.
- Casida LE, Chapman AB. 1951. Factors affecting the incidence of cystic ovaries in a herd of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 34: 1200-1205.
- Cattaneo L, Signorini M, Bertoli J, Bartolomé J, Gareis N, Díaz P, Bó G, Ortega H. 2014.
- Epidemiological description of cystic ovarian disease in argentine dairy herds: risk factors and effects on the reproductive performance of lactating cows. *Reprod.Domest.Anim.* 49(6):1028-33.
- Caubo B, DeVinna RS, Tonetta SA, 1989. Regulation of steroidogenesis in cultured porcine theca cells by growth factors. *Endocrinology* 125: 321–326.
- Chang H, Lau AL, Matzuk MM. 2001. Studying TGF-beta superfamily signaling by knockouts and knockins. *Mol. Cell. Endocrinol.* 180:39–46.
- Chapman SC, Bernard DJ, Jelen J, Woodruff TK. 2002. Properties of inhibin binding to betaglycan, InhBP/p120 and the activin type II receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 196: 79–93.

- Cheifetz S, Like B, Massague J. 1986. Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor- $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 261: 9972–9978.
- Chen Y, Bhushan A, Vale W. 1997. Smad8 mediates the signaling of the ALK-2 receptor serine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (24): 12938-43.
- Cook DL, Smith CA, Parfet JR, Youngquist RS, Brown EM, Garverick HA. 1990. Fate and turnover of ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J. Reprod. Fertil.* 90: 37–46.
- Cook RW, Thompson TB, Jardetzky TS, Woodruff TK. 2004. Molecular biology of inhibin action. *Semin. Reprod. Med.* 22: 269-76.
- Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC. 1997. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Hum. Reprod.* 12: 759–768.
- Datta P K, Chytil A, Gorska A E, Moses H L. 1998. Identification of STRAP, a Novel WD Domain Protein in Transforming Growth Factor-Beta Signaling. *J. Biol. Chem.* 273: 34671-34674.
- Davis GH, Mcewan JC, Fennessy PF, Dodds KG, McNatty KP, 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.
- Day ML, Anderson LH. 1998. Current concepts on the control of puberty in cattle. *J. Anim. Sci.* 76: 1–15.
- de Kretser DM, Meinhardt A, Meehan T, Phillips DJ, O'Bryan MK, Loveland K.A. 2000. The roles of inhibin and related peptides in gonadal function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 161: 43–46.
- Dellmann HD, Priedkalns, J. 1993. *Histología Veterinaria*. 2da. Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- Dellmann HD, Eurell JA. 1998. *Textbook of veterinary histology*. 5th ed, London: Williams y Wilkins. 252 p.

- Demeter-Arlotto M, Rainey WE, Simpson ER. 1993. Maintenance and regulation of 17 $\beta$ -hydroxylase expression by bovine thecal cells in primary culture. *Endocrinology*. 132, 1353–1358.
- De Paolo LV, Shimonaka M, Schwall RH, Ling N. 1991. In vivo comparison of the follicle-stimulating hormone suppressing activity of follistatin and inhibin in ovariectomised rats. *Endocrinology* 128: 668-674.
- Derynck R, Zhang Y, Feng XH. 1998. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*. 95(6): 737-40.
- Derynck R, Zhang YE. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGFbeta family signalling. *Nature* 425: 577-584.
- Derynck R., Akhurst R J. 2007. Differentiation Plasticity Regulated by TGF-Beta Family Proteins in Development and Disease. *Nat. Cell Biol.* 9, 1000-1004.
- De Silva M, Reeves JJ. 1988. Hypothalamic-Pituitary function in chronically cystic and regularly cycling dairy cows. *Biol. Reprod.* 38: 264.
- Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. 1995. Defective Haematopoiesis and Vasculogenesis in Transforming Growth Factor-Beta 1 Knock Out Mice. *Development* 121, 1845-1854.
- Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM. 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 345–370.
- Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. 2011. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 51(4): 600-6.
- Dodson WC; Schomberg DW. 1987. The effect of transforming growth factor-B on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 12: 512-516.
- Dobson H, Ribadu AY, Noble KM, Tebble JE, Ward WR. 2000. Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 120: 405-410.

- Donadeu FX, Ginther OJ. 2002. Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin and oestradiol during the anovulatory season in mares. *Reproduction*. 124(6): 875-85.
- Dong J, Albertini D.F.; Nishirimi K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 383: 531–535.
- Dorrington J, Chuma AV, Bendell JJ. 1988. Transforming growth factor beta and follicle-stimulating hormone promote rat granulosa cell proliferation. *Endocrinology*. 123(1):353-9.
- Drummond AE, LE MT, Ethier JF, Dyson M, Findlay JK. 2002. Expression and localization of activin receptors, Smads, and beta glycan to the postnatal rat ovary. *Endocrinology*. 143: 1423-1433.
- Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. 1995. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes. Dev*. 9: 2795-2807.
- Dufour J, Cahill LP, 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 AL, Grujters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Natchigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. 2002. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*. 143: 1076–1084.
- Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. 2000. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Mol. Cell. Endocrinol*. 159: 1–5.
- Enciclopedia Bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1° Edición. 2008. Universidad Nacional Autónoma de México. Cap. 10, pág. 393.
- Engelhardt H, Tekpetey FR, Gore-Langton RE, Armstrong DT. 1992. Regulation of steroid production in cultured porcine thecal cells by transforming growth factor- b. *Mol Cell Endocrinol* 85, 117–126.
- Eppig J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122: 829–838.

- Espinoza-Villavicencio JL, Ortega-Pérez R, Palacios Espinosa A, Valencia Méndez J, Aréchiga Flores CF. 2007. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia*. 32: 93-99.
- Ethier JF, Findlay JK. 2001. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction*. 121: 667-675.
- Eyestone WH, AX RL (1984). A review of ovarian follicular cysts in cows, with comparisons to the condition in women, rats and rabbits. *Theriogenology*. 22: 109-125.
- Farnworth PG, Wang Y, Escalona R, Leembruggen P, Ooi GT, Findlay JK. 2007. Transforming growth factor- $\beta$  blocks inhibin binding to different target cell types in a context-dependent manner through dual mechanisms involving betaglycan. *Endocrinology*. 148: 5355-5368.
- Folman Y, Rosenberg M, Herz Z, Davidson M. 1973. The relationship between plasma progesterone concentrations and conception in postpartum dairy cows maintained on two levels of nutrition. *J. Reprod. Fertil.* 34: 267-278.
- Fortune JE. 1988. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Repr.* 50: 225-32.
- Fortune JE. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 135-163.
- Fortune JE, Rivera1 GM, Yang MY. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 109-126.
- Frandsen RD, Spurgeon TL. 1995. Anatomía y fisiología de los animales domésticos. 5ta edición. México, Mc. Graw-Hill Interamericana. 410 p
- Galloway SM, Mc Natty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, Mc Laren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davies GH, Ritvos O. 2000. Mutations in an oocytederived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosagesensitive manner. *Nat. Genet.* 25: 279-283.



- Gangrade BK, May JV. 1990. The production of transforming growth factor-beta in the porcine ovary and its secretion in vitro. *Endocrinology*. 127: 2372-2380.
- 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 anestésias y cirugías del bovino. 1ra.Edición. - Editorial Imprenta San Cayetano, Santa Fe, Argentina, p. 125.
- Gartner LP, Hiat JL. 1997. *Histología. Texto y Atlas.* McGraw-Hill Interamericana, México, 506 p.
- Garverick HA. 1997. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 995-1004.
- Ghiglieri C, Khatchadourian C, Tabone E, Hendrick JC, 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: 2115-2211.
- Gigli I, Byrd D D, Fortune JE. 2006. Effects of oxygen tension and supplements to the culture medium on activation and development of bovine follicles in vitro. *Theriogenology* 15; 66 (2):344-53.
- Gil G, Galindo Izquierdo M. 2014. Role of transforming growth factor-beta (TGF) beta in the physiopathology of rheumatoid arthritis. *Reumatol. Clin.* 10(3):174-179
- Gilchrist RB, Morrissey MP, Ritter LJ, Armstrong DT. 2003. Comparison of oocyte factors and transforming growth factor-b in the regulation of DNA synthesis in bovine granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 201:87-95.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 41: 247-254.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Frick PM, Gibbons JR, Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55: 1187-1194.

- Ginther OJ. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 61-79.
- Glister CC, Kemp F, Knight PG. 2004. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: Actions of BMP-4, -6, and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction.* 127: 239–254.
- Glister CC, Groome NP, Knight PG. 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.
- Gore-Langton R, Armstrong D. 1994. Follicular steroidogenesis and its control. En: Knobil & Nelly (eds). *The physiology of reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press. p 571-628.
- Goumans MJ, Mummery C. 2000. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int. J. Dev. Biol.* 44 (3):253-65.
- Gümen A, Wiltbank MC 2002. An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. *Biol. Reprod.* 66: 1689–95.
- Gümen A, Sartori R, Costa FM, Wiltbank MC. 2002. A GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure can induce development of follicular cysts. *J. Dairy Sci.* 85: 43–50.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7ma ed. Mc Graw-Hill. Interamericana.
- Hafez ESE, Hafez B. 2004. *Reproducción e Inseminación artificial en animales: Séptima Edición*. McGraw Hill Interamericana. p 49-50.
- Hajimiri, M.; Shaverdi, S.; Kamalinia, G.; Dinarvand, R. 2014. Growth factor conjugation: Strategies and applications. *J. Biomed Mater Res*. En prensa.

- Hamilton SA, Garverick HA, Keisler DH, Xu ZZ, Loos K, Youngquist RS, Salfen BE. 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol Reprod.* 53: 890–8.
- Hatler TB, Hayes SH, Laranja Da Fonseca LF, Silvia WJ. 2003. Relationship between endogenous progesterone and follicular dynamics in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts. *Biol. Reprod.* 69: 218-223.
- Hatler TB, Hayes SH, Ray DL, Reames PS, Silvia WJ. 2008. Effect of sublethal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows. *Vet J* 177: 360-368.
- Heger J, Peters SC, Piper HM, Euler G. 2009. SMAD-proteins as a molecular switch from hypertrophy to apoptosis induction in adult ventricular cardiomyocytes. *Journal of cellular physiology.* 220(2): 515-23.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-471.
- Henricks DM, Hill JR, Dickey JF. 1973. Plasma ovarian hormone levels and fertility in beef heifers treated with melengestrol acetate (MGA) *Journal of Animal Science.* 37: 1169-1175.
- Hernandez ER, Hurwitz A, Payne DW, Dharmarajan AM, Purchio AF, Adashi EY. 1990. Transforming growth factor-  $\beta$  1 inhibits ovarian androgen production: gene expression, cellular localization, mechanism(s), and site(s) of action. *Endocrinology* 127, 2804–2811.
- Hill JR, Lamond DR, Henricks DM, Dickey JF, Niswender GD. 1971. The effect of melengestrol acetate (MGA) on ovarian function and fertilization in beef heifers. *Biology of Reproduction.* 4: 16—22.
- Hillier SG. 1991. Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries. *J. Endocrinol.* 131(2):171-5.
- Hillier SG. 2001. Gonadotrophic control of ovarian follicular growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179: 39-46.
- Hosokawa R, Nonaka K, Morifuji M, Shum L, Ohishi M. 2003. TGF- $\beta$  3 decreases type I collagen and scarring after labioplasty. *J. Dent. Res.* 82: 558.

- Hsu CJ, Hammond JM. 1987. Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 120: 198-207.
- Hsu SY, Hsueh AJ. 2000. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: an ovarian paradigm. *Physiol. Rev.* 80:593-614.
- Hsueh AJ, Dahl KD, Vaughan J, Tucker E, Rivier J, Bardin CW, Vale W. 1987. Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.* 84(14): 5082-6.
- Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri H. 1994. An ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev.* 15: 707-724.
- Hunter M G, Robinson R, Mann S, Webb R. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 461-477.
- Huse M, Chen YG, Massague J, Kuriyan J. 1999. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* 96: 425–36.
- Huse M, Muir TW, Xu L, Chen YG, Kuriyan J, Massague J. 2001. The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substratebinding switch. *Mol. Cell.* 8: 671–82.
- Hussein MR. 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum. Reprod. Update* 11:162-177.
- Hutchinson LA, Findlay JK, de Vos FL, Robertson DM. 1987. Effects of bovine inhibin, transforming growth factor-B and bovine activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146: 1405-1412.
- 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.
- Itoh S, ten Dijke P. 2007. Negative Regulation of TGF-Beta receptor/Smad Signal Transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 176-184.
- Jaatinen R, Laitinen MP, 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.
- Jainudeen MR, Hafez ESE. 2000. Incapacidad reproductiva en hembras. En: Hafez, E.S.E., ed. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Cap. III. Interamericana Mc Graw Hill, México. p. 247-256.
- Jöchle W. 1993. Forty years of control of the oestrous cycle in ruminants: progress made, unresolved problems and the potential impact of sperm encapsulation technology. *Reprod. Fertil. Dev.* 5(6):587-94.
- Jolly PD, Tisdall DJ, Heath DA, Lun S, McNatty KP. 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 JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader, KL, Lawrence SB, O'Connell AR, Laitinen MP, Cranfield M, Groome NP, Ritvos O, McNatty, KP. 2002. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol. Reprod.* 67: 1777-1789.
- Juengel JL, Bibby AH, Reader KL, Lun S, Quirke LD, Haydon LJ, McNatty KP. 2004. The role of transforming growth factor-beta (TGFbeta) during ovarian follicular development in sheep. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2: 78.

- Juengel JL, McNatty KP. 2005. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum. Reprod. Update.* 11: 143–160.
- Johnson AD, Uldberg LC. 1967. Influence of exogenous progesterone on follicular cysts in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 50: 758-761.
- Johnson, L.N.; Noble, M.E.; Owen, D.J. 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85:149–58.
- Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu, D., Heisterkamp N, Groffen, J. 1995. Abnormal Lung Development and Cleft Palate in Mice Lacking TGF-Beta 3 Indicates Defects of Epithelial-Mesenchymal Interaction. *Nat. Genet.* 11, 415-421.
- Kaneko H, Noguchi J, Kikuchi K, Todoroki J, Hasegawa Y. 2002. Alter-ations in peripheral concentrations of inhibin A in cattle studied using a time-resolved immunofluorometric assay: relationship with estradiol and follicle-stimulating hormone in various reproductive conditions. *Biol. Reprod.* 67, 38-45.
- Karimi-Googheri M, Daneshvar H, Nosratabadi R, Zare-Bidaki M, Hassanshahi G, Ebrahim M, Arababadi MK, Kennedy D. 2013. Important roles played by TGFB in hepatitis B infection. *J. Med. Virol.* 86 (1):102-8.
- Kesler DJ, Garverick HA. 1982. Ovarian cysts in dairy cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 55: 1147-1159.
- Knecht M, Feng P, Catt K. 1987. Bifunctional role of transforming growth factor-b during granulosa cell development. *Endocrinology.* 120: 1243-1249.
- Knight PG. 1996. Roles of inhibins, activins and follistatin in the female reproductive system. *Front. Neuroendocrinol.* 17: 476-509.
- Knight PG, Glister C. 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatins in the ovary. *Reproduction* 121:503–512.
- Knight PG, Glister C. 2003. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reproduction Science.* 78 (3-4): 165-183.

- Knight PG, Glister C. 2006. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 132: 191-206.
- Knight PG, Satchel L, Glister C. 2012. Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 359(1-2):53-65.
- Komiyama J, Nishimura R, Lee HY, Sakumoto R, Tetsuka M, Acosta TJ, Skarzynski DJ, Okuda K. 2008. Cortisol Is a Suppressor of Apoptosis in Bovine Corpus Luteum. *Biol. Reprod*. 78: 888–895.
- Krozowski Z, Li KX, Koyama K, Smith RE, Obeyesekere VR, Steinoakley A, Sasano H, Coulter C, Cole T, Sheppard KE 1999. The type I and type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *J. Steroid Biochem*. 69: 391-401.
- Kubota T, Kamada S, Taguchi M, Aso T. 1994. Autocrine/paracrine function of transforming growth factor-beta 1 in porcine granulosa cells. *Hum Reprod* 9, 2118–2122.
- Kulkarni AB, Huh CJ, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM., Karlsson J. 1993. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(2): 770-4.
- Kumanov P, Nandipati KC, Tomova A, Robeva R, Agarwal A. 2005. Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications. *Reprod. Biomed. Online*. 10: 786-812.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laio M, Weis FM, Boyd FT, Igotz RA, Massagué J. 1991. Responsiveness to transforming growth factor-beta (TGF-beta) restored by genetic complementation between cells defective in TGF-beta receptors I and II. *J. Biol. Chem*. 266 (14): 9108-12.
- Laporte HM, Hogeveen H, Schukken YH, Noordhuizen JPTM. 1994. Cystic ovarian disease in Dutch dairy cattle I. Incidence, risk factors and consequences. *Livest. Prod. Sci*. 38: 191–197.

- Lee CN, Cook DL, Parfet JR, Smith CA, Youngquist RS, Garverick HA. 2001. Induction of persistent ovarian follicular structures following administration of progesterone near the onset of estrus in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 71: 3505–8.
- Letterio JJ, Roberts AB. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 137-61.
- Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, Dang H, Kong L, Nakabayashi T, Mackall CL, Gress RE, Roberts A B. 1996. Autoimmunity Associated with TGF-beta1-Deficiency in Mice is Dependent on MHC Class II Antigen Expression. *J. Clin. Invest.* 98, 2109-2119.
- Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM. 2000. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature.* 404: 411–4.
- Li R, Phillips DM, Mather JP. 1995. Activin promotes ovarian follicle development in vitro. *Endocrinology.* 136: 849-856.
- Lin SY, Morrison JR, Phillips DJ, de Kretser DM. 2003. Regulation of ovarian function by the TGF-b superfamily and follistatin. *Reproduction.* 126, 133–148.
- Liptrap RM, McNally PJ. 1976. Steroid concentrations in cows with corticotropin-induced cystic ovarian follicles and the effect of prostaglandin F2alpha and indomethacin given by intrauterine injection. *Am. J. Vet. Res.* 37: 369–375.
- Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J. 1995. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol. Cell. Biol.* 15: 3479–86.
- 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.



- Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J. 1993. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73:1435–44.
- Looyenga BD, Wiater E, Vale W, Hammer GD. 2010. Inhibin-A antagonizes TGF {beta}2 signaling by down-regulating cell surface expression of the TGF{beta} coreceptor betaglycan. *Mol. Endocrinol.* 24: 608–620.
- Lloyd, R.V. 1997. Growth Factors. *Endocrine pathology.* Summer; 8(2):121-127.
- Macias-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L., y Wrana, J. L. (1996). MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell*, 87(7), 1215-24.
- Macmillan KL, Taufa VK, Barnes DR and Day AM. 1991. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. *Animal Reproduction.* 26, 25-40.
- Magoffin DA, Gancedo B, Erickson GF. 1989. Transforming growth factor- $\beta$  promotes differentiation of ovarian thecal– interstitial cells but inhibits androgen production. *Endocrinology.* 125: 1951-1958.
- Magoffin DA, Jakimiuk AJ. 1997. Inhibin A, inhibin B and activin A in the follicular fluid of regularly cycling women. *Hum. Reprod.* 12:1714-1719.
- Magoffin DA, Jakimiuk AJ, 1998. Inhibin A, inhibin B and activin A concentrations in follicular fluid from women with polycystic ovarysyndrome. *Hum. Reprod.* 13: 2693-2698.
- Marelli BE, Diaz PU, Salvetti, NR, Rey F, Ortega HH. 2014. mRNA expression pattern of gonadotropin receptors in bovine follicular cysts. *Reprod. Biol.* 14(4): 276-81.
- Martin P. 1997. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 276: 75–81.
- Massague J. 1998. TGF-Beta Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791.

- Massagué J, Wotton D. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO. J.* 19: 1745-1754.
- Mather JP, Moore A, Li RH. 1997. Activins, inhibins, and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 215(3): 209-22.
- Matzuk MM, Krumar TR, Shou W, Coerver KA, Lau AL, Behringer RR, 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.
- May JV, Frost JP, Schomberg DW. 1988. Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and transforming growth factor-beta on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation. *Endocrinology.* 123, 168-179.
- McGee E, Hsueh A. 2000. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocr. Rev.* 21(2): 200–214.
- McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. 1995. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol. Endocrinol.* 9: 131–136.
- McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DA, Lundy T, O Connell A, Tiddall DJ. 2000. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Molecular and Cellular. Endocrinology.* 163: 11-20.
- McNatty KP, Juengel JL, Wilson T, Galloway SM, Davis GH. 2001. Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 13: 549–555.
- McNatty KP, Galloway SM, Wilson T, Smith P, Hudson NL, O'Connell A, Bibby AH, Heath DA, Davis GH, Hanrahan JP, Juengel JL. 2005. Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet. Sel. Evol.* 37(Suppl D): S25-S38.
- Meisterling EM, Dailey RA. 1987. Use of concentrations of progesterone and estradiol-17 beta in milk in monitoring postpartum ovarian function in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 70: 2154–2161.

- Mihm M, Baguisi A, Boland MP, Roche JF. 1994. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J. Reprod. Fertil.* 102: 123–30.
- Mihm M, Austin EJ. 2002. The final stages of dominant follicle selection in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23: 155-166.
- Miro F, Hillier SG. 1996. Modulation of granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and differentiation by activin. *Endocrinology.* 136: 3247-3252.
- Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. 2001 Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J. Cell. Physiol.* 187: 265–76.
- Moberg GP. 1991. How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *J. Dairy Sci.* 74: 304-311.
- Mondschein JS, Canning SF, Hammond JM. 1988. Effects of transforming growth factor- $\beta$  on the production of immunoreactive insulin-like growth factor I and progesterone and on [3H] thymidine incorporation in porcine granulosa cell cultures. *Endocrinology* 123: 1970-1976.
- Monget P, Monniaux D. 1995. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49: 321-33.
- Monniaux D, Barbey S, Rico C, Fabre S, Gallard Y, Larroque H. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? *Reprod. Fertil. Dev.* 22(7): 1083-1091.
- Montgomery G W, Galloway SM, Davis GH, McNatty KP. 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction.* 121:843–852.
- Muttukrishna S, Fowler PA, Groome NP, Mitchell, GG, Robertson WR, Knight PG. 1994. Serum concentrations of dimeric inhibin during the spontaneous human menstrual cycle and after treatment with exogenous gonadotrophin. *Hum. Reprod.* 9: 1634-1642.
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R. 1978. Identification of Smad7, a TGF $\beta$ -inducible antagonist of TGF $\beta$  signalling. *Nature* 389: 631–5.

- Nakatani A, Shimasaki S, Depaolo LV, Erickson GF, Ling N. 1991. Cyclic changes in follistatin messenger ribonucleic acid and its protein in the rat ovary during the estrous cycle. *Endocrinology*. 129(2): 603-11.
- Nanda AS, Ward WR, Williams PCW, Dobson H. 1988. Retrospective analysis of the efficacy of different hormone treatments of cystic ovarian disease in cattle. *Vet. Rec.* 122: 155-158.
- Nelson ST, Martin AD, Osteras O. 2010. Risk factors associated with cystic ovarian disease in Norwegian dairy cattle. *Acta Vet. Scand.* 52:60.
- Nilsson EE, Skinner MK. 2001. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 8: 17-20.
- Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK. 2002. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol. Cell. Endocrinol.* 188: 65-73.
- Nilsson EE, Doraiswamy V, Skinner MK. 2003. Transforming growth factor beta isoform expression during bovine ovarian antral follicle development. *Mol. Reprod. Dev.* 66(3): 237-246.
- Nilsson EE, Skinner MK. 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 F<sub>2α</sub> and gonadotropins in hypophysis and ovary of dairy cows with ovarian cysts. *Pharmacol. Res.* 39: 297-304.
- Oktem O, Urman B. 2010. Understanding follicle growth in vivo. *Hum. Reprod.* 25(12): 2944-2954.
- Ortega HH, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2008. Insulin-like growth factor I in ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous and induced cystic ovarian disease. *Res. Vet. Sci.* 84: 419-427.

- Otsuka F, Moore RK, Iemura S, Ueno N, Shimasaki S. 2001. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 961–966.
- Pangas SA, Rademaker AW, Fishman DA, Woodruff TK. 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.
- Parrot JA, Skinner MK. 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 AT, Perrone MS, Asem EK. 1995. Bovine ovarian follicular fluid vitronectin content is influenced by follicle size. *Theriogenology.* 43:1239-1247.
- Peter AT. 2004. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 39: 1-7.
- Peter AT, Levine H, Drost M, Bergfelt DR. 2009. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology.* 71(9):1343-57.
- Pfeffer PL, Sisco B, Donnison M, Somers J, Smith C. 2007. Isolation of genes associated with developmental competency of bovine oocytes. *Theriogenology.* 68:84-90.
- Phillips DJ, Woodruff TK. 2004. Inhibin: actions and signalling. *Growth Factors* 22, 13–18.
- Poon VY, Choi S, Park M. 2013. Growth factors in synaptic function. *Front Synaptic Neuroscience.* 18: 5-6.

- Pretheeban T, Balendran A, Gordon MB, Rajamahendran R. 2010. mRNA of luteal genes associated with progesterone synthesis, maintenance, and apoptosis in dairy heifers and lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 121: 218–224.
- Priedkalns J. 1993. Capítulo 13: Sistema reproductor femenino. En: *Histología Veterinaria* (Ed. Dellman H.D). 2da. Edición. Acribia. España.
- Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T. 1995. Transforming Growth Factor-Beta 3 is Required for Secondary Palate Fusion. *Nat. Genet.* 11: 409-414.
- Pursley .R, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 alpha and GnRH. *Theriogenology.* 44: 915-923.
- Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. 2004. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J. Anim. Sci.* 82: E40-E52.
- Rabinovici J, Goldsmith PC, Roberts VJ, Vaughan J, Vale W, Jaffe RB. 1991. Localization and secretion of inhibin/activin subunits in the human and subhuman primate fetal gonads. *J. Clin. Endocr. Metab.* 73: 1141-1149.
- Raftery LA, Twombly V, Wharton K, Gelbart WM. 1995. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics.* 139: 241-254.
- Refsal KR, Jarrin-Maldonado JH, Nachreiner RF. 1988. Basal and estradiol-induced release of gonadotrofins in dairy cows with naturally occurring ovarian cysts. *Theriogenology.* 30: 679.
- Revah I, Butler WR. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 106: 39-47.
- Rey F, Rodríguez FM, Salvetti NR, Palomar MM, Barbeito CG, Alfaro NS, Ortega HH. 2010. Insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor-binding proteins in bovine cystic ovarian disease. *J Comp Pathol.* 142: 193-204.

- Ribadu AY, Nakada K, Moriyoshi M, Zhang WC, Tanaka Y, Nakao T. 2000. The role of LH pulse frequency in ACTH induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 64: 21–31.
- Richards JS, Jonassen JA, Rofles AL, Kersey K, Reichert LE. 1979. Adenosine 3,5-monophosphate, luteinizing hormone receptor, and progesterone during granulosa cell differentiation: effects of estradiol and follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 104: 765-773.
- Rizzo A, Campanile D, Mutinati M, Minoia G, Spedicato M, Sciorsi RL. 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 JG, Bousquet D, Barnes FL, Sirard MA. 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.
- Robker RL, Richards JS. 1998. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27KIP1. *Mol. Endocrinol.* 12: 924-940.
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. 2010. Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction.* 139: 309–318.
- Rodríguez FM, Salvetti NR, Panzani CG, Barbeito CG, Ortega HH, Rey F. 2011. Influence of insulin-like growth factor-binding proteins-2 and -3 in the pathogenesis of cystic ovarian disease in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 128: 1-10.
- Rodríguez FM, Salvetti NR, Colombero M, Stangaferro M, Barbeito CG, Ortega HH, Rey F. 2013. Interaction between IGF1 and IGF1BPs in bovine cystic ovarian disease. *Animal Reproduction Science.* 140(1-2): 14-25.
- 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: 1729-1737.
- Roy SK. 1993. Transforming growth factor-beta potentiation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral follicles is mediated by a latent induction of epidermal growth factor. *Biol. Reprod.* 48(3):558-63.
- Roy SK, Kole AR. 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.
- Rutter B, Russo AF. 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.
- Salveti NR, Gimeno EJ, Lorente JA, Ortega HH. 2004. Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. *Cells Tissues Organs.* 178,117-125.
- Salveti NR, Acosta JC, Gimeno EJ, Müller LA, Mazzini RA, Taboada AF, Ortega HH. 2007. Estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptors in normal bovine ovarian follicles and cystic ovarian disease. *Vet Pathol.* 44: 373-378.
- Salveti NR, Stangaferro ML, Palomar MM, Alfaro NS, Rey F, Gimeno, EJ, Ortega HH. 2010. Cell proliferation and survival mechanisms underlying the abnormal persistence of follicular cysts in bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Anim. Reprod. Sci.* 122(1-2): 98-110.
- Salveti NS, Alfaro NA, Velazquez MML, Amweg A, Matiller V, Díaz PU, Ortega HH. 2012. Alteration in localization of steroid hormone receptors and coregulatory proteins in follicles from cows with induced ovarian follicular cysts. *Reproduction.* 144(6):723-35.



- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. 1997. TGFbeta2 Knockout Mice have Multiple Developmental Defects that are Non-Overlapping with Other TGFbeta Knockout Phenotypes. *Development* 124: 2659-2670.
- Santibanez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. 2011. TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical science*. 121(6): 233-51.
- Santos Ramirez, O.A. (2013) Dinámica folicular bovina. Engormix. <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/genetica/articulos/dinamica-folicular-bovina-t4841/103-p0.htm>.
- Saragueta PE, Lanuza GM, Baranao JL. 2002. Autocrine role of transforming growth factor b1 on rat granulosa cell proliferation. *Biol. Reprod.* 66, 1862– 1868.
- 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.
- Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW. 1996. *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor  $\beta$  pathway components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 790-794.
- Savio JD, Thatcher WW, Morris GR, Entwistle K, Drost M, Mattiacci MR. 1993. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing device on follicular turnover and fertility in cattle *Journal of Reproduction and Fertility*. 98:77-84.
- Schmid P, Cox D, Van Der Putten H, McMaster GK, 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 GS, Wysocki A. 2009. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair and Regen.* 17: 153–162.
- Schwall RH, Mason AJ, Wilcox JN, Bassett SG, Zelesnik AJ. 1990. Localization of inhibin/activin subunit mRNAs within the primate ovary. *Mol.Endocrinol.* 4(1):75-9.
- Shaham-Albalancy A, Rosenberg M, Folman Y, Graber Y, Meidan R, Wolfenson D. 2000. Two methods of inducing low plasma progesterone concentrations have different effects on dominant follicles in cows. *J. Dairy Sci.* 83: 2771–8.
- Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Andrade ER, Binelli M, Oliveira JA, Nascimento AB. 2003. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasoundguided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology.* 59:1435-1440.
- Skinner NK, Keski-Oja J, Osteen KG, Moses HL. 1987. Ovarian thecal cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology* 121(2):786-92.
- Sosa Garrocho M, Macias Silva M. 2004. El Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- $\beta$ ): funciones y vías de transducción. Facultad de Medicina UNAM. *REB* 23 (1): 3-11.
- Stock AE, Fortune JE. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology.* 132 1108—1114
- Segarini PR, Rosen DM, Seyedin SM. 1989. Binding of transforming growth factor- $\beta$  to cell surface proteins varies with cell type, *Mol. Endocrinol.* 261–272.
- Shen CJ, Chen XP, Chen YG. 2005. BRIEF COMMUNICATION: Inhibin B, activin A, and follistatin and the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 88: 336-337.

- Shi Y, Massagué J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 113(6): 685-700.
- Shimasaki S, Koga M, Buscaglia ML, Simmons DM, Bicsack TA, Ling N. 1989. Follistatin gene expression in the ovary and extragonadal tissues. *Mol. Endocrinol.* 3(4):651-9.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr. Rev.* 25: 72-101.
- Shukovski L, Findlay JK, Robertson DM. 1991. The effect of follicle-stimulating hormone-suppressing protein or follistatin on luteinizing bovine granulosa cells in vitro and its antagonistic effect on the action of activin. *Endocrinology.* 129 (6): 3395-402.
- Shull MM, Ormsby AB, Kier S, Pawlowski RJ, Diebold M, Yin R, Allen C, Sidman G, Proetzel D. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 35(6397): 693-9.
- Shrestha HK, 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
- Sidis Y, Fujiwara T, Leykin L, Isaacson K, Toth T, Schneyer AL. 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.* 59(4):807-12.
- Sirois J, Fortune JE. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology* 127:916-925

- Sisco B, Pfeffer PL. 2007. Expression of activin pathway genes in granulosa cells of dominant and subordinate bovine follicles. *Theriogenology*. 68(1):29-37.
- Silva CC, Knight PG. 1998. Modulatory actions of activin-A and follistatin on the developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 58(2):558-65.
- Silvia WJ, Alter TB, Nugent AM, Laranja da Fonseca LF. 2002. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest Anim. Endocrinol.* 23: 167-177.
- Sirois J, Fortune JE. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*. 127: 916-25.
- Skinner MK, Keski-Oja J, Osteen KG, Moses HL. 1987. Ovarian thecal cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology*. 121: 786-792.
- Slot KA, Voorendt M, De Boer-Brouwer M, Van Vugt HH, Teerds KJ. 2006. Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase- 3 in the rat ovary. *J. Endocrinol.* 188:179-192.
- Smith J, Cortvrind R. 1998. Inhibin A and B secretion in mouse preantral follicle culture. *Hum Reprod.* 13: 927-935.
- Stangaferro ML. 2013. Participación de miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) en la patogenia de la enfermedad quística ovárica bovina. Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias-Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional del Litoral.
- Sugino K, Kurosawas N, Nakamura T, Takio K, Shimasaki S, Ling N, Titani K, Sugino H. 1993. Molecular Heterogeneity of Follistatin, an Activin-binding Protein: Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cell. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 268, No. 21: 15579-15587.

- Sunak N, Green DF, Abeydeera LR, Thurston LM, Michael AE. 2007. Implication of cortisol and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the development of porcine (*Sus scrofa domestica*) ovarian follicles and cysts. *Reproduction*. 133: 1149-1158.
- Taft R, Ahmad N, Inskeep EK. 1996. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *J. Anim. Sci.* 74: 2985–2991.
- Teerds KJ, Dorrington JH. 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
- ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H. 1993. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene*. 8: 2879-87.
- ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzen P, Laiho M, Miyazono K. 1994. Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science*. 264: 101-4.
- Tetsuka M, Yamamoto S, Hayashida N, Hayashi KG, Hayashi M, Acosta TJ, Miyamoto A. 2003. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in bovine follicle and corpus luteum. *J. Endocrinol.* 177: 445-852.
- Thompson TB, Cook RW, Chapman SC, Jardetzky TS, Woodruff TK. 2004. Beta A versus beta B: is it merely a matter of expression? *Mol. Cell. Endocrinol.* 225: 9-17.
- Topper JN, Cai J, Qiu Y, Anderson KR, Xu YY, Deeds JD. 1997. Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9314-9.
- Trimberger GW, Hansel W. 1955. Conception rate and ovarian functions following estrus control by progesterone injections in dairy cattle *Journal of Animal Science*. 14: 224-232.
- Ulloa L, Doody J, Massague J. 1999. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature*. 397: 710–3.

- Vanholder T, Opsomer G, de Kruif A. 2006. Etiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 105-119
- van Meeteren LA, ten Dijke P. 2011. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta. *Cell. Tissue Res.* 347(1):177-86.
- Visser JA, Themmen AP. 2005. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 234: 81 – 86.
- Waddington SN, Crossley R, Sheard V, Howe SJ, Buckley SM, Coughlan L, Gilham DE, Hawkins RE, McKay TR. 2010. Gene delivery of a mutant TGFbeta3 reduces markers of scar tissue formation after cutaneous wounding. *Mol. Ther.* 18: 2014
- Wang T, Li BY, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ. 1996. The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell.* 86: 435–44.
- Webb R, Gosden RG, Telfer EE, Moor RM. 1999. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Anim. Sci. (Pencaitland)* 68: 257–284.
- Webb RB, Nicholas JG, Gong BK, Campbell CG, Gutierrez HA, Garverick HA, Armstrong DG. 2003. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction in Domestic Ruminants V. Reproduction Suppl.* 61:71–90.
- Webb R, Garnsworthy PC, Campbell BK, Hunter MG. 2007. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology.* 68: 22-29.
- Webb R., Campbell BK 2007. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 64: 141-163.
- Wehrman ME, Roberson MS, Cupp AS, Kojima FN, Stumpf TT, Werth LA, Wolfe MW, Kittok RJ and Kinder JE. 1993. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 $\beta$ -estradiol and increases conception in cows *Biology of Reproduction.* 49: 214-220.

- Welt C, Sidis Y, Keutmann H, Schneyer A. 2002. Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 227: 724-752.
- Wharton K, Derynck R. 2009. TGFbeta family signaling: novel insights in development and disease. *Development*. 136(22): 3691-7.
- Wiater E, Vale W. 2003. Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J. Biol. Chem.* 278: 7934-41.
- Willis SA, Zimmerman CM, Li LI, Mathews LS. 1996. Formation and activation by phosphorylation of activin receptor complexes. *Mol. Endocrinol.* 10: 367-79.
- Wiltbank JN, Tyler WJ, Casida LE. 1953. A study of atretic large follicles in six sire-groups of Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 36: 1077-1082.
- Wiltbank M, Gümen A, Sartori R. 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*. 57: 21-52.
- Wishart DF. 1977. Synchronization of oestrous in heifers using steroid (SC 5914, SC 9880, and SC 21009) treatment for 21 days: 2. The effect of treatment on the ovum collection and fertilisation rate and the development of the early embryo. *Theriogenology*. 8: 249-269.
- Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massague J. 1992. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*. 71: 1003.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*. 370: 341-7.
- Yi JJ, Barnes AP, Hand R, Polleux F, Ehlers MD. 2010. TGF-beta signalling specifies axons during brain development. *Cell* 142: 144-157.
- Young JM, Henderson S, Souza C, Ludlow H, Groome N, McNeilly AS. 2012. Activin B is produced early in antral follicular development and suppresses thecal androgen production. *Reproduction*. 143: 637-650.

- 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 $\beta$  in cows. *Res. Vet. Sci.* 61: 240–244.
- Zaied AA, Garverick HA, Kesler DJ, Bierschwal CJ, Elmore RJ, Younquist RS. 1981. Luteinizing hormone response to estradiol benzoate in cows with ovarian cyst. *Theriogenology*. 16: 349.
- Zhang Y, Feng X, We R, Derynck R. 1996. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature*, 383(6596): 168-72.
- Zhao GQ. 2003. Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis* 35:43–56.
- Zheng X, Price CA, Tremblay Y, Lussier JG, Carriere PD. 2008. Role of transforming growth factor-b1 in gene expression and activity of estradiol and progesterone-generating enzymes in FSHstimulated bovine granulosa cells. *Reproduction* 136, 447–457.
- Zheng X, Boerboom D, Carriere PD. 2009. Transforming growth factor-beta 1 inhibits luteinization and promotes apoptosis in bovine granulosa cells. *Reproduction* 137: 969-977.
- Zurvarra FM, Salvetti NR, Ian Mason J, Velázquez MML, Alfaro NS, Ortega HH. 2009. Disruption in the expression and immunolocalisation of steroid receptors and steroidogenic enzymes in letrozole-induced polycystic ovaries in rat. *Reprod. Fertil. Dev.* 21: 827–839.