

## ALTERACIÓN DEL CICLO CELULAR Y DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES ESTEROIDES EN EL OVARIO DE BOVINOS CON ENFERMEDAD QUISTICA OVARICA#

*Hugo H. Ortega*<sup>1, 2</sup>, *Natalia R. Salvetti*<sup>1, 2</sup>, *Florencia Rey*<sup>1, 2</sup>,  
*Claudio G. Barbeito*<sup>2, 3, 4</sup>, *Eduardo J. Gimeno*<sup>2, 4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Morfológicas – Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional del Litoral. E-mail: hhortega@fcv.unl.edu.ar (H.H. Ortega), <sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), <sup>3</sup>Cátedra de Histología y Embriología – Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional de la Plata, <sup>4</sup>Instituto de Patología – Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional de la Plata

### Resumen

**La enfermedad quística ovárica (cystic ovarian disease: COD)** es uno de los trastornos reproductivos más comunes en vacas lecheras y afecta entre el 6 y el 19% de las hembras en producción. El impacto económico de esta enfermedad está en relación directa con el intervalo parto-concepción y los costos asociados. El objetivo de esta revisión es discutir nuestros resultados y los de otros grupos de investigación, relacionados con las alteraciones en el balance proliferación celular/apoptosis y la expresión de receptores hormonales esteroideos en el ovario de animales afectados por esta enfermedad. Los folículos quísticos, presentan niveles de proliferación y de apoptosis disminuidos con respecto a los folículos sanos. Además, existe, en los ovarios de animales con quistes foliculares, una relación alterada en la expresión de los distintos subtipos de receptores de estrógenos (RE), así como en las diferentes isoformas del receptor de progesterona (RP). Los resultados de nuestro grupo y su discusión con los aportes de otros autores, nos permiten concluir que el balance proliferación/apoptosis se modifica en los animales enfermos, indicando alteraciones en la dinámica celular que permitirían la persistencia de los folículos quísticos. Además, los cambios en la expresión de receptores de hormonas esteroideas podrían ser una de las causas de las alteraciones celulares observadas en los ovarios de los animales con la enfermedad.

*Palabras clave:* Enfermedad quística ovárica; bovinos, proliferación, apoptosis, receptores hormonales.

### Abstract

**Alteration of cellular cycle and steroid receptors expression in the ovary of bovines with cystic ovarian disease.** Cystic ovarian disease (COD) is one of the most common reproductive disorders in dairy cows and affects 6-19% of cattle. The economic impact of this disease is directly related to the conception-birth interval and, the associated costs. The objective of this revision is to discuss our results and those obtained by other authors, related with the cell proliferation/apoptosis and steroid hormone receptor expression in the ovary of affected animals. Cystic follicles present decreased levels of proliferation and apoptosis compared to healthy follicles. Estrogen receptors have a disturbed relation between subtypes with respect to the ovaries of normal animals. Differences in the progesterone receptor isoforms are also described. Our results and their discussion with the contributions of other authors, allow us to conclude that the proliferation / apoptosis balance is altered in animals affected by the disease, indicating that although these follicles do not continue to grow, they are not destined for atresia. Also, the modifications in the steroid

hormone receptors expression could be one of the causes of the cellular alterations observed in the ovaries of the animals with the disease.

*Key words:* cystic ovarian disease, cow, proliferation, apoptosis, hormonal receptors.

## **Introducción**

La enfermedad quística ovárica (cystic ovarian disease: COD) es una de las causas de disminución de la fertilidad más frecuente en vacas lecheras y afecta entre el 6 y el 19% de las hembras vacunas en producción [1-3]. McNutt [4] fue uno de los primeros autores que denominó quistes a las estructuras foliculares persistentes de un diámetro mayor a 20 mm. En las décadas de 1940 y 1950, se publicaron numerosos trabajos acerca de distintos aspectos de esta enfermedad, incluyendo la morfología ovárica, las características clínicas y la epidemiología [5-7].

Si bien la COD ha sido ampliamente estudiada en relación a su diagnóstico y tratamiento [8-14], en la actualidad se desconoce el mecanismo que causa su desarrollo y los cambios que ocurren a nivel del eje hipotálamico-hipofisario-ovárico [15-19].

Aunque existen muchos factores involucrados en su patogenia, en esta revisión nos proponemos hacer hincapié en componentes intraováricos, más específicamente en las alteraciones en el ciclo celular y en la expresión de receptores de hormonas esteroides.

## **Definición**

La COD bovina se caracteriza por la presencia de estructuras foliculares de un diámetro mayor al ovulatorio, que permanecen en el tiempo, ocasionando trastornos en la funcionalidad ovárica. Los quistes son estructuras dinámicas, descriptos como folículos anovulatorios únicos o múltiples, localizados en uno o ambos ovarios, que tienen un diámetro mayor a 18 mm (mayor al diámetro ovulatorio para la raza), con una persistencia de más de 6 días, en ausencia de tejido luteal, sin tonicidad uterina y con interrupción de los ciclos estrales normales [3,20]. Sin embargo, esta definición clásica debe ser complementada con el concepto de que los quistes pueden regresar y ser reemplazados por otros; pueden atresarse o luteinizarse e inclusive puede producirse la ovulación en presencia de estas estructuras [3,20,21].

La incidencia de COD en vacas lecheras varía, por lo general, entre el 5 y el 10%, aunque puede llegar al 30%. El número de animales afectados depende del país, el establecimiento y el manejo de los animales [6,15,22,23].

## **Etiología y patogenia**

La patogenia de la COD es compleja y puede describirse 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). Debido a la gran cantidad de factores involucrados en la formación de quistes ováricos, la causa primaria de la enfermedad aún no ha sido establecida claramente.

La hipótesis más aceptada en la actualidad es que el desarrollo de los quistes está asociado a un desequilibrio neuroendocrino a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.

En el desarrollo de la COD, luego de que uno o varios folículos de una onda de crecimiento folicular se desarrollan, se produce una falla en la ovulación provocando que el o los folículos dominantes superen el tamaño ovulatorio y se mantengan en el tiempo. Una causa probable podría ser el efecto que ejercen los estrógenos sobre la secreción de FSH. Inicialmente se produce una inhibición de la secreción de FSH cuando están los niveles estrógenicos son más elevados de lo normal. Pero luego de 3-5 días la hembra aparentemente se adapta a la concentración elevada de estrógenos y la concentración de FSH aumenta, estimulando el crecimiento de otros folículos, algunos de los cuales llegarían a alcanzar e incluso superar el tamaño ovulatorio.

Sobre la base de los conocimientos actuales del mecanismo de la ovulación y la respuesta a distintas terapéuticas hormonales, se puede afirmar que cualquier obstáculo en el proceso ovulatorio puede determinar la formación de quistes. En este sentido, las alteraciones en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal serían fundamentales en la etiopatogenia de la enfermedad [1,2,15,18,19,21,24-30], aunque la acción de componentes intraováricos serían fundamentales para poder explicar la persistencia folicular y la falta de respuesta a algunos tratamientos. Por lo tanto, es de vital importancia la comprensión de los posibles mecanismos involucrados.

### **Disfunción ovárica**

Aunque muchos estudios han caracterizado la dinámica del crecimiento folicular, la comprensión de los cambios celulares y moleculares que ocurren dentro del folículo ovárico antes de la falla ovulatoria aún es escasa. Los cambios celulares pueden presentarse como una producción aberrante de factores de crecimiento por las células de la granulosa [31-33] mediante alteraciones en las proteínas que componen el citoesqueleto celular, ya sea en cantidad o tipo de proteínas [34,35] o por la secreción inapropiada de proteínas de la matriz extracelular [34]. Entre las proteínas de la matriz extracelular, la vitronectina y la fibronectina podrían tener un rol importante y su producción parecería estar influenciada por el tamaño del folículo [36]. Estudios previos llevaron a suponer que las alteraciones en la expresión y cantidad de receptores, tanto de hormonas hipotálamo-hipofisarias como de hormonas esteroides, podrían estar relacionadas con el proceso de anovulación. Diversos resultados permiten sugerir que los cambios en la expresión de receptores de esteroides, particularmente los de progesterona y estrógenos, podrían estar involucrados [37-39]. Por otra parte, la expresión de los genes responsables de la regulación de la proliferación, la apoptosis y la diferenciación en las células que componen el folículo quístico podría encontrarse alterada como consecuencia del desbalance en la expresión de los receptores de hormonas esteroides y ser un componente involucrado en la persistencia folicular de los quistes [40-44].

### **Balance proliferación/apoptosis**

La regulación del ciclo celular dentro de cualquier célula es compleja, involucra el balance de diversas moléculas reguladoras y puede ser alterada por numerosas señales externas que actúan en múltiples pasos del ciclo. En el ovario, el estradiol, la FSH y la LH son señales esenciales para el crecimiento de los folículos preovulatorios y la subsiguiente diferenciación como cuerpos lúteos. Cada hormona actúa a través de receptores específicos y por vía de señales intracelulares determinadas. Dentro del contexto hormonal que regula la proliferación de las células ováricas, se debe tener en cuenta no sólo cuales son las hormonas que actúan sino también en qué concentraciones se encuentran.

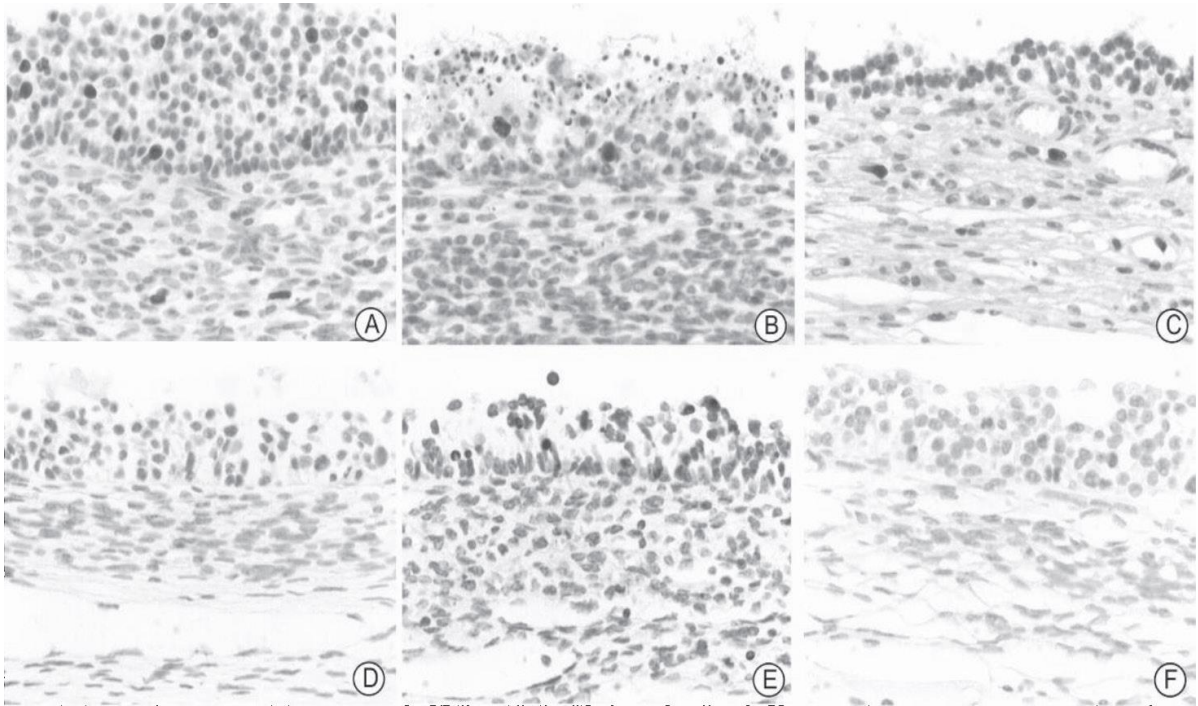


Fig. 1. Identificación de células en proliferación mediante la inmunomarcación para Ki-67 (A, B y C) y detección in situ de apoptosis (D, E y F) en la pared en un folículo terciario (A y D), folículo atrésico (B y E) y quístico (C y F).

Uno de los cambios que ocurren en la función de las células de la granulosa, es el súbito pasaje de una fase de intensa proliferación que caracteriza a los folículos preovulatorios hacia una fase no proliferativa y de diferenciación terminal de las células luteales [45].

En los folículos primordiales, el ovocito está rodeado por una capa de células foliculares que no se dividen por estar detenidas en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular. Los folículos primarios dejan ese estado quiescente e inician una fase de lento desarrollo en la cual las células de la granulosa ingresan plenamente en el ciclo celular aunque la proliferación es muy lenta al comienzo [46]. Sin embargo, cuando las células de la granulosa poco proliferativas de los folículos preantrales adquieren una mayor sensibilidad a la FSH y a la LH, y comienzan a producir estrógenos, la exposición a dichas hormonas produce un rápido incremento de la proliferación que resulta finalmente en la formación de los grandes folículos preovulatorios [47,48]. Por fuera de la membrana basal, las células de la teca también proliferan en respuesta a los estímulos de factores de crecimiento secretados por las células de la granulosa y de las gonadotropinas, diferenciándose en consecuencia, en teca interna y teca externa [49]. La diferenciación de las células de la teca interna es completamente dependiente de LH y de algunos factores de crecimiento como IGF-I [49]. La onda preovulatoria de LH induce cambios importantes tanto en la estructura como en la función de los folículos en crecimiento. La LH señala la terminación del desarrollo folicular induciendo a que las células de la granulosa salgan del ciclo celular [46,47] e inicien un programa de diferenciación terminal (luteinización) [50,51].

Recientemente hemos descripto que la proliferación celular, cuantificada mediante la inmunodetección de la proteína Ki-67, se encuentra disminuida tanto en la granulosa como en la teca de los folículos terciarios y quísticos de los animales con COD, tanto en la que se presenta de manera espontánea en las vacas en producción como en la inducida experimentalmente mediante la administración de ACTH [52]. Estas diferencias también

fueron observadas en bovinos por Isobe y Yoshimura [41,53] quienes encontraron un bajo índice de proliferación, medido por la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), en todas las capas foliculares de quistes bovinos. Ellos observaron una intensa proliferación en la zona basal de la capa granulosa de los folículos terciarios normales, y una disminución en los folículos atrésicos y quísticos. Estos resultados coinciden con los hallados por nuestro grupo en modelos experimentales de COD en otras especies [44,54] (Figura 2). Por otra parte, Das et al. [55] describieron un aumento en la proliferación celular en los quistes en relación a los folículos dominantes en la enfermedad que se presenta en humanos. Los autores atribuyen este resultado contradictorio a un aumento en los niveles de andrógenos circulantes. Cabe destacar que en la COD bovina, como así también en la COD inducida en ratas mediante la exposición a luz permanente, los niveles de andrógenos (testosterona) no están aumentados así como tampoco lo están en los animales que presentan la enfermedad de manera espontánea [41]. Monniaux et al. [56] mostraron que los quistes jóvenes presentaban niveles elevados de testosterona que disminuían en los quistes de más tiempo, en cambio en estos últimos aumentaban los niveles de progesterona. Es importante señalar que los andrógenos producidos por las células de la teca tienen un rol regulador decisivo en la foliculogénesis ya que sirven como precursores para la producción de estrógenos en las células de la granulosa. Los estrógenos intensifican la respuesta de los folículos ováricos a la estimulación por las gonadotropinas e incrementan la proliferación en las células de la granulosa. Sin embargo, y como ocurre en la enfermedad que se presenta en humanos, el exceso de andrógenos perjudica la función folicular. Esta hormona inhibe los efectos de los estrógenos sobre el desarrollo folicular y la inducción de receptores para LH en las células de la granulosa mediada por FSH [57]. En el mismo sentido, observamos una elevada expresión de ARNm para ciclinas E y D1 en los folículos antrales normales en relación a los folículos quísticos espontáneos (Figura 3). En líneas de células tumorales, Zwijsen et al. [58] mostraron que la ciclina D1 intensifica la acción de los estrógenos a través de su unión al coactivador de la expresión de estrógenos, SRC-1. Robker y Richards [45] demostraron que las células de la granulosa de ratas expresan de manera normal ciclinas D2 y E mientras que la ciclina D1 y D3 son exclusivas de las células de la teca. Las ciclinas D y E están implicadas en la progresión del ciclo celular desde la fase G1 y su expresión está influenciada por hormonas esteroides, principalmente los estrógenos, así como también por las gonadotróficas. Se sabe que el 17  $\beta$ -estradiol es un poderoso mitógeno y que induce la expresión de ciclinas en útero, glándula mamaria y ovario [45]. El-Hefnawy y Zeleznik [48] determinaron que la FSH aumenta la expresión de ciclina D2 y PCNA en células de la granulosa de ratas. Sin embargo, es sabido que las células de la granulosa comienzan a proliferar incluso antes de que comiencen a influir las hormonas gonadotróficas llegando a altos grados de mitosis en ausencia total de dichas hormonas. Esto ha sido demostrado en trabajos en los cuales se midió la proliferación celular en ratas hipofisectomizadas [45]. No obstante, el desarrollo final previo a la ovulación es exclusivamente dependiente de gonadotropinas [46].

Existen diversos estudios que indican que la proliferación celular en la granulosa está regulada por hormonas como la FSH, los estrógenos y la insulina, así como por algunos factores de crecimiento (IGFs, FGF-2, EGF, VEGF). Se ha demostrado que el IGF-I se encuentra en concentraciones relativamente elevadas en los folículos en crecimiento y que posee acciones directas sobre la estimulación de la proliferación celular en la capa granulosa y en la inducción de la expresión de receptores para gonadotropinas en las células foliculares, principalmente de LHR. Estudios realizados en quistes ováricos bovinos (espontáneos e inducidos mediante la administración de ACTH) han mostrado una disminución en la concentración de IGF-I tanto en la capa de células de la granulosa como en el líquido folicular, lo que podría estar correlacionado con la baja proliferación encontrada en esta capa celular [32]. Sumado a esto, hemos encontrado que la presencia de algunas proteínas de unión tales como las cadherinas sería otro indicador de la baja proliferación en las células de la granulosa de los quistes (datos no publicados).

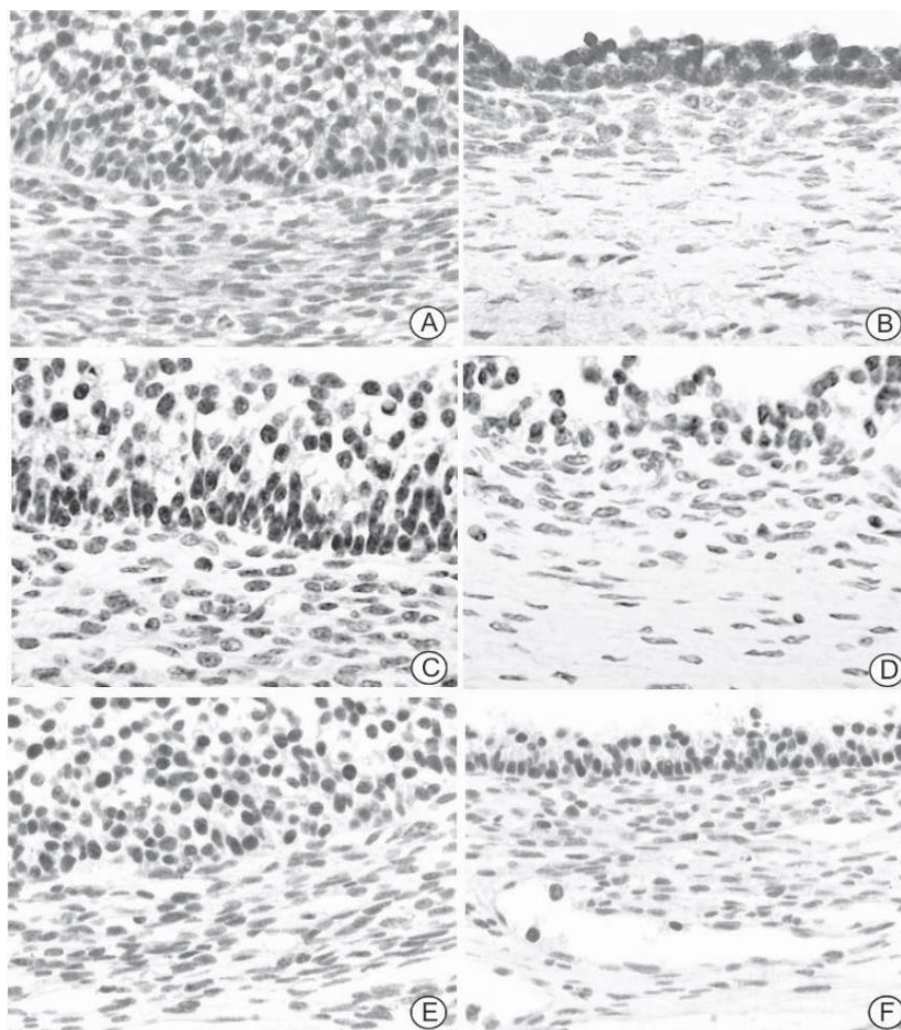


Fig. 2. Inmunomarcación para RE  $\alpha$  (A y B); RE  $\beta$  (C y D) y RP (E y F) en la pared en un folículo terciario (A, C y E) y de un folículo quístico (B, D y F).

Se sabe que es el balance entre las proteínas que actúan como pro/antiapoptóticas el que determina si una célula se dirige hacia la muerte o la supervivencia [59]. Como se detalló previamente, numerosas moléculas poseen este tipo de acción en las células ováricas, siendo las más importantes, dentro de la familia Bcl-2, las proapoptóticas: bax, bcl-xs, bad y las antiapoptóticas: bcl-2, bcl-w y bcl-xl. La respuesta a la activación de los estímulos inductores de muerte celular es la activación de la cascada de caspasas. Finalmente, la activación de la caspasa-3 conlleva a la célula a una muerte inminente. Recientemente hemos descrito que los niveles de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, en todas las capas foliculares, se encuentran más elevados en los folículos en crecimiento de los animales control y en los folículos en crecimiento y quísticos de los ovarios de los animales con la enfermedad, que en los folículos atrésicos de ambos grupos [52]. Por el contrario, las moléculas proapoptóticas Bax y Caspasa-3, así como las células apoptóticas detectadas in situ son más abundantes en los folículos atrésicos, tanto en la granulosa como en la teca interna (Figura 4). Isobe y Yoshimura [41,60], trabajando con quistes foliculares bovinos, hallaron que los folículos quísticos tardíos tenían, en las células granulosas, índices de apoptosis in situ menores que los folículos atrésicos y folículos quísticos tempranos. Además, dichos autores encontraron que las células de la teca interna de los folículos quísticos tardíos presentaban índices de apoptosis muy bajos, postulando que éste es uno de los motivos por los cuales estos folículos tardan en regresar y se produce su persistencia. En un trabajo previo realizado en ratas con COD inducida mediante la exposición a luz permanente, encontramos resultados similares a los observados en bovinos, con bajos niveles de proliferación y apoptosis en los quistes [44]. En otro modelo experimental, Anderson y Lee [61] encontraron, en ratas tratadas con dehidroepiandrosterona (DHEA),



que la capa de células de la granulosa presentaba apoptosis in situ, principalmente en la zona correspondiente al antro folicular, y en menor proporción en la zona basal de los quistes foliculares. En esta última zona, las células permanecieron en el tiempo y cambiaron de fenotipo, pasando de ser células mesenquimales a epiteliales (esta transición se corroboró por el cambio de proteína de filamentos intermedios desde vimentina hacia citoqueratinas). Por otra parte, Shirwalkar et al., [62], utilizando otro modelo en ratas en el cual se administró valerato de estradiol para inducir quistes foliculares, encontraron un aumento en los niveles de apoptosis en la medida que pasaba el tiempo (máximo: 4 semanas). Vale considerar que en estos modelos, en los cuales se utilizan hormonas esteroides (andrógenos y estrógenos) para la inducción de quistes, pueden existir interferencias propias de las hormonas utilizadas y son métodos que no reproducen totalmente lo que ocurre en las enfermedades espontáneas (ya sean en la enfermedad poliquística ovárica (PCOD) que se presenta en humanos como en la COD bovina).

Das et al. [55], trabajando con muestras obtenidas de mujeres con PCOD encontraron una alta expresión de ARNm y proteína para los factores antiapoptóticos IAPc-2 y Bcl-xL y menor expresión para Bax y caspasa-3 en las células de la granulosa de quistes ováricos. Numerosas investigaciones han propuesto un rol importante de diversas hormonas y factores de crecimiento como elementos de supervivencia de las células para suprimir la apoptosis. Estos incluyen: EGF, NGF, factores estimulantes de colonia, eritropoyetina, IGF-I, FGF-2, activina, TGF $\alpha$ , y las gonadotrofinas. Se ha encontrado que suprimiendo la onda preovulatoria de gonadotrofinas se induce la atresia folicular en el término de 48 h y que además, administrando esas gonadotrofinas de manera exógena, pueden rescatarse los folículos de la atresia temprana. Se ha demostrado además, que las gonadotrofinas afectan la maquinaria apoptótica suprimiendo la expresión de factores proapoptóticos e induciendo la expresión de proteínas antiapoptóticas [63,64]. Por ejemplo, el tratamiento con FSH de ratas hipofisectomizadas disminuye el grado de apoptosis y fragmentación del ADN en los folículos ováricos. Del mismo modo, el tratamiento temprano con FSH o LH en folículos preovulatorios in vitro previene el comienzo de la apoptosis espontánea, subrayando el rol de las gonadotrofinas como un factor de supervivencia [59]. Por otra parte, Yacobi et al. [65] mostraron que, si bien la administración de gonadotrofinas (principalmente LH) disminuye la apoptosis en las células de la granulosa en cultivo de folículos preovulatorios, incrementa la apoptosis de las células teco/intersticiales a través de la activación de la caspasa-3. Tilly [63] demostró que la inhibición de la apoptosis en las células de la granulosa y la atresia folicular mediada por el tratamiento con gonadotrofinas puede estar asociada a la habilidad de estas hormonas de reducir las cantidades de Bax presentes en las células de la granulosa manteniendo los niveles de expresión de Bcl-2 y Bcl-xL. Además, los niveles de ARNm para Bcl-xS se reducen luego de la administración de gonadotrofinas y este efecto podría contribuir a un cambio en el balance entre los inductores y supresores de la muerte celular programada [63,66]. En bovinos con COD, los niveles de gonadotrofinas se mantienen constantes a lo largo del tiempo, sin la onda preovulatoria de gonadotrofinas (la cual fue inhibida por la ACTH); lo que podría indicar que estas hormonas pueden contribuir a la supervivencia de los folículos que se transformarán en quísticos.

Las hormonas esteroides actúan tanto como supresoras como estimuladoras de la apoptosis en diferentes poblaciones celulares [59,67]. El tratamiento con estrógenos incrementa el índice mitótico de las células de la granulosa y el desarrollo folicular. En contraste, los andrógenos, disminuyen el peso de los ovarios en ratas hipofisectomizadas tratadas con estrógenos y causan el deterioro de los folículos incrementando el número de células con picnosis. Los andrógenos no aromatizables, tales como la DHEA, no solo inhiben la actividad de la aromatasas y estimulan la producción de progesterona en las células de la granulosa, sino que además inducen la atresia en los folículos preantrales y antrales. Los folículos atrésicos presentan una proporción de andrógenos incrementada con respecto a los estrógenos en el líquido folicular. La disminución en la producción de estrógenos en algunas

especies resulta en la concomitante acumulación de andrógenos en el líquido folicular, sugiriendo un posible rol de los andrógenos en la progresión del proceso de atresia. Esta evidencia lleva a pensar que los esteroides ováricos están involucrados en el proceso de iniciación de la atresia. La progesterona es otro de los factores que tiene acciones antiapoptóticas en células de la granulosa luteinizadas humanas y de roedores [65] y se encontraron niveles bajos de progesterona en el líquido folicular de los folículos quísticos bovinos en relación a los folículos antrales. Esto sugiere que la progesterona tal vez no sea un factor importante en la supervivencia celular en los quistes.

### **Expresión de receptores de hormonas esteroides**

Los esteroides sexuales juegan un papel importante en el desarrollo y diferenciación de los órganos reproductivos y en el mantenimiento de la fertilidad. A través de sus receptores nucleares, estas hormonas regulan eventos transcripcionales [68]. Es sabido que la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona es inducida por las gonadotropinas y cambia de acuerdo a los niveles hormonales a lo largo del ciclo estral [13,69,70]. Las vacas con COD presentan de manera característica alteraciones en la frecuencia y pulsos de LH con respecto a aquellas que presentan ciclos estrales normales [19]. Si bien los niveles de estas hormonas no están aumentados en los modelos experimentales que hemos usado [32,52], es probable que los niveles constantes y no pulsátiles o cíclicos de gonadotropinas influyan sobre la expresión de los receptores hormonales en el ovario, como así también a nivel del eje hipotálamo-hipofisario [71].

En los animales con COD, hemos hallado que los folículos quísticos espontáneos, obtenidos de material a campo, presentan una elevación considerable de los niveles del receptor de estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) en la granulosa y teca, mientras que el receptor de estrógenos  $\beta$  (RE $\beta$ ) disminuye en ambas capas [38]. Con nuestros resultados también confirmamos que cambios similares ocurren en animales con la enfermedad inducida experimentalmente. Algunos estudios llevados a cabo en distintas especies, incluyendo seres humanos y en modelos experimentales en roedores, han descripto que los ovarios de individuos con COD presentan diferencias en la expresión de la proteína y el ARNm de los receptores de estrógenos con respecto a individuos con ovarios sanos [37-39,72]. Odore et al. [37] mostraron una notable reducción en la concentración total de receptores de estrógenos en los quistes foliculares bovinos con respecto a los folículos dominantes de animales normales. Sin embargo estos autores no discriminaron entre los distintos subtipos de receptores de estrógenos, así como en la localización de los mismos. Por otro lado, Calder et al. [73] no hallaron diferencias en la expresión del ARNm del RE $\beta$  en los folículos quísticos de hembras bovinas con respecto a los folículos dominantes, utilizando la técnica de hibridización in situ, lo cual coincide con nuestros resultados (38,44). Jakimiuk et al. [72] encontraron variaciones en la expresión de las dos isoformas del RE en las capas foliculares de los quistes en relación con los folículos del mismo tamaño en mujeres con PCOD y normales respectivamente. Dichos autores hallaron una disminución tanto del ARNm como de las proteínas de RE $\beta$  en las células de la granulosa y de la teca interna en los folículos derivados de individuos con PCOD en comparación con los folículos del mismo tamaño de mujeres sanas. En cuanto al RE $\alpha$ , la única diferencia encontrada por estos autores fue un marcado incremento en la expresión proteica en las células de la teca interna proveniente de los ovarios quísticos.

Es sabido que las gonadotropinas [74] y los estrógenos [75] regulan negativamente la expresión del RE $\beta$  en las células de la granulosa y ambos receptores de estrógenos muestran una tendencia hacia la regulación positiva en paralelo al aumento de los niveles de estrógenos en el líquido folicular, hecho que se correlaciona con la regulación positiva de los receptores de LH y de FSH [76,77].



Considerando las acciones de los estrógenos a nivel ovárico, estimulación de la proliferación y diferenciación celular durante la foliculogénesis, disminución de la apoptosis, estimulación de la secreción de factores de crecimiento, incremento de las uniones estrechas entre las células de la granulosa, aumento de la expresión de receptores para gonadotrofinas en el folículo, etc [70]; cualquier cambio en la expresión y concentración de los distintos subtipos de receptores de estrógenos puede llevar a modificaciones en el modo de acción de los estrógenos sobre sus células blanco. Si bien aún resta conocer claramente las consecuencias de estos cambios, se debe considerar que ambos subtipos poseen distinta afinidad por el 17- $\beta$ -estradiol y además es posible la formación de heterodímeros entre los dos tipos de RE. Bajo estas circunstancias, sería de esperar que pequeñas modificaciones en la relación RE $\alpha$ /RE $\beta$  interrumpen la foliculogénesis normal llevando a alteraciones reproductivas tales como persistencia folicular y COD [71,78-80]. Así, los efectos del estradiol en estas condiciones pueden llevar a cambios en el balance proliferación/apoptosis [44,52,53,60], en las concentraciones de receptores para gonadotrofinas [73], en las acciones de las enzimas y en el metabolismo celular [73], etc.

Investigaciones recientes en ratones KO para RE revelaron que la presencia de ambos receptores es un prerrequisito para el funcionamiento apropiado del eje hipotálamo-hipofisario-ovárico y para una exitosa ovulación. Los ratones Knockout (KO) para el gen RE $\alpha$  (ratones RE $\alpha$ KO) exhiben un fenotipo similar al de la PCOD que se presenta en humanos, con niveles de LH aumentados, y ovarios caracterizados por la presencia de múltiples folículos quísticos y hemorrágicos sin evidencias de ovulación [81]. Si bien los ratones KO para el gen RE $\beta$  (RE $\beta$ KO) son fértiles, los ovarios de estos animales muestran signos morfológicos de desarrollo folicular anormal, y una capacidad ovulatoria reducida [81,82]. Quienes desarrollaron estos modelos demostraron también, que las acciones del estradiol a través del RE $\beta$  son vitales para la diferenciación celular de las células de la granulosa dependiente de FSH, y que en ausencia de este receptor, los folículos preovulatorios son deficientes en la organización celular, la actividad enzimática y las vías de señalización de receptores, principalmente receptores de LH [81-82]. Los cambios observados en los ratones KO, probablemente, no sólo se deban a la deficiencia de los receptores a nivel ovárico sino además a la ausencia de estos en otros niveles del eje hipotálamo-hipofisario con la consecuente disrupción en los mecanismos de retroalimentación.

Por otra parte, hemos hallado que la expresión de las diferentes isoformas del receptor de progesterona (RP) se encuentra afectada en los folículos quísticos en relación a los controles, con una marcada disminución en las isoformas RP-A2 y el RP-B con respecto a los folículos terciarios normales [38]. Se ha demostrado que el RP-A funciona como un inhibidor transcripcional de todos los receptores hormonales esteroides y como un facilitador de señales cruzadas dependientes de ligandos entre los caminos de señales de los receptores sexuales esteroides dentro de la célula. El RP-B aparece como un activador transcripcional de los genes de respuesta a la progesterona. De este modo, la relación RP-A/RP-B en células específicas define la respuesta fisiológica a la progesterona [83]. La información acerca de la isoforma RP-C es aún escasa. En la rata esta isoforma es predominantemente citoplasmática y no tiene actividad transcripcional por sí misma, pero puede hacer menos eficiente las capacidades transcripcionales de RP-B y RP-A [84]. Los cambios en la expresión relativa de las distintas isoformas podría de este modo afectar las actividades biológicas inducidas por la progesterona y resultar en cambios por la ausencia funcional de esta hormona sin modificar los niveles tisulares o séricos de la misma [85-87].

Si consideramos la regulación hormonal, la onda de LH actúa directamente para inducir la expresión de ARNm y proteína de RP en las células granulosas diferenciadas que expresan altos niveles de receptores de LH y aromatasa citocromo P450 [88]. Aparentemente, la progesterona producida por las células estimuladas que poseen los receptores, disminuye

las posibilidades de morir por apoptosis, actuando esta hormona como un factor de supervivencia de las células [89].

En ratones KO para el RP-A (RPAKO), la isoforma RP-B funciona de manera tejido-específica para mediar un subconjunto de funciones reproductivas de los RP. La ablación del RP-A no afecta la respuesta a la progesterona en la glándula mamaria ni en el timo pero resulta en severas anormalidades a nivel de la función uterina y ovárica. Los ovarios de los ratones RPAKO contienen gran cantidad de folículos anovulatorios maduros detenidos en un estadio similar de desarrollo, con un número reducido de ovocitos y con evidentes fallas en la ovulación. El estudio de ratones RPKO reveló la ausencia de ciertas enzimas metaloproteasas necesarias para la disolución del ápice de los folículos preovulatorios y, como consecuencia, la correcta expulsión de los ovocitos [90]. Por otro lado, la ausencia de RP-A en el útero de los ratones RPAKO incrementa la actividad proliferativa dependiente de progesterona a través del RP-B en el epitelio, lo que demuestra que el RP-A es necesario para inhibir la proliferación inducida por progesterona (a través del RP-B) y estrógenos en este tejido. Esta actividad inhibitoria no se detecta en la glándula mamaria en donde ambos receptores actúan como mediadores de la proliferación inducida por progesterona. En nuestros experimentos, los cambios observados en su expresión en animales con COD, podrían también explicar una menor proliferación en estos ovarios debido a la actividad inhibitoria ejercida por las diferentes isoformas [38].

## Conclusiones

Los resultados que hemos obtenido hasta ahora en nuestro grupo, y su discusión con los aportes de otros autores, nos permiten concluir que los procesos de proliferación y apoptosis se encuentran alterados en los ovarios de los animales con COD. Esta alteración se manifiesta por baja proliferación en las capas celulares de los folículos terciarios y quísticos; con un concomitante bajo índice de apoptosis. Esto indicaría que si bien estos folículos no siguen creciendo, tampoco están destinados a la atresia, por lo menos de manera temprana. Por otra parte, también hemos descrito que la expresión de REs presenta diferencias entre los folículos en crecimiento en animales sanos con respecto a los mismos en los ovarios de animales con COD. La expresión de RE $\alpha$  se mantuvo normal en los folículos en crecimiento y quísticos de los animales tratados y el RE $\beta$  presentó niveles inferiores a los encontrados en los animales normales. Esto indica cambios en la relación RE $\alpha$ /RE $\beta$  en los ovarios de los animales con la enfermedad. Dado que ambos receptores tienen distinta afinidad por el 17- $\beta$ -estradiol, mediando diferentes respuestas, esta podría ser una de las causas de las alteraciones celulares observadas en los ovarios de los animales con la enfermedad. Además se describen diferencias en la expresión de las isoformas del RP con un cambio en la relación de las isoformas expresadas en los animales afectados, probablemente asociado con las alteraciones en la proliferación y diferenciación celular.

Por último, estos cambios descritos a nivel ovárico corroboran nuestra hipótesis de que aunque la patogenia de esta enfermedad tiene un fuerte componente neuroendocrino, las alteraciones a nivel ovárico podrían jugar un papel importante en los procesos de formación de quistes y en la persistencia folicular.

## Agradecimientos

A la ANCFEN por el premio otorgado, que comparto con las más de 20 personas que forman nuestro grupo de trabajo, con quienes tratamos de demostrar día a día que lo importante no es ser los mejores si no poner lo mejor de nosotros en lo que hacemos.

A las autoridades y toda la Facultad de Ciencias Veterinarias (no docentes, docentes y alumnos) por darme la oportunidad de demostrar que la veterinaria iba mas allá de la clínica. A la UNL que me permitió formarme y posgraduarme y al CONICET y la ANPCYT que financian parte de nuestras actividades.

## **Referencias**

- [1] W.H. Eyestone & R.L. Ax, *Theriogenology* 22, 109 (1984).
- [2] H.A. Garverick, *J. Dairy Sci.* 80, 995 (1997).
- [3] W.J. Silvia, T.B. Hatler, A.M. Nugent, & L.F. Laranja Da Fonseca, *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 167 (2002).
- [4] G.W. McNutt, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 72, 286 (1927).
- [5] L.E. Casida, W.H. Mcshany & R.K. Meyer, *J. Anim. Sci.* 3, 273 (1944).
- [6] L.E. Casida & A.B. Chapman, *J. Dairy Sci.* 34, 1200 (1951).
- [7] J.N. Wiltbank, W.J. Tyler & L.E. Casida, *J. Dairy Sci.* 36, 1077 (1953).
- [8] A.S. Nanda, W.R. Ward & H. Dobson, *Reprod. Fertil. Dev.* 3, 709 (1991).
- [9] G. Opsomer, P. Mijten, M. Coryn & A. De Kruif. *Vet Quart* 18, 68 (1996).
- [10] C. Christopher & T.G. Devanathan, *Ind. Vet. J.* 3, 184 (1997).
- [11] S.K. Agarwal & U. Shankar, *Ind. Vet. J.* 75, 127 (1998).
- [12] S.P. Sharma, *Ind. Vet. J.* 75, 161 (1998).
- [13] M.D. Calder, B.E. Salfen, B. Bao, R.S. Youngquist & H.A. Garverick, *J. Anim. Sci.* 77, 3037 (1999).
- [14] R. Douthwaite & H. Dobson, *Vet. Rec.* 147, 355 (2000).
- [15] D.J. Kesler & H.A. Garverick, *J. Anim. Sci.* 55, 1147 (1982).
- [16] K. Yoshioka, S. Iwamura & H. Kamomae, *J. Vet. Med. Sci.* 60, 257 (1998).
- [17] C. Heuer, Y.H. Schukken & P. Dobbelaar, *J. Dairy Sci.* 82, 295 (1999).
- [18] A.Y. Ribadu, K. Nakada, Y. Tanaka, M. Moriyoshi, W.C. Zhang & T.J. Nakao, *Vet. Med. Sci.* 61, 979 (1999).
- [19] A.Y. Ribadu, K. Nakada, M. Moriyoshi, W.C. Zhang, Y. Tanaka & T. Nakao *Anim. Reprod. Sci.* 64, 21 (2000).
- [20] J.A. Bartolomé, W.W. Thatcher, P. Melendez, C.A. Risco & L.F. Archbald *JAVMA*, 227, 1409 (2005).
- [21] S.A. Hamilton, H.A. Garverick, D.H. Keisler, Z.Z. Xu, K. Loos, R.S. Youngquist & B.E. Salfen, *Biol. Reprod.* 53, 890 (1995).
- [22] H.M. Laporte, H. Hogeveen, Y.H. Schukken & J.P.T.M. Noordhuizen, *Livest. Prod. Sci.* 38, 191 (1994).
- [23] P. Fleischer, M. Metzner, M. Beyerbach, M. Hoedemaker & W. Klee, *J. Dairy Sci.* 84, 2025 (2001).
- [24] R.W. Liptrap & P.J. McNally, *Am. J. Vet. Res* 37, 369 (1976).
- [25] W.T. Bosu & Peter, A.T. *Theriogenology* 28, 725 (1987).
- [26] M.C. Lopez-Diaz & W.T.K. Bosu, *Theriogenology* 37, 1163 (1992).
- [27] V.C. Zulu & C. Penny, *J. Reprod. Physiol.* 44, 191 (1998).
- [28] H. Dobson, & R.F. Smith, *Anim. Reprod. Sci.* 60, 743 (2000).
- [29] A.T. Peter, *Reprod. Domest. Anim.* 39, 1 (2004).
- [30] T. Vanholder, G. Opsomer & A. De Kruif. *Reprod. Nutr. Develop.* 46, 105 (2006).
- [31] H.H. Ortega, P. Amable, N.R. Salvetti, B.E. Dallard, C. Baravalle, C.G. Barbeito & E.J. Gimeno, *Anat. Histol. Embryol.* 36, 94 (2007).
- [32] H.H. Ortega, M.M. Palomar, J.C. Acosta, N.R. Salvetti, B.E. Dallard, J.A Lorente, C.G. Barbeito & E.J. Gimeno, *Res. Vet. Sci.* 84, 419 (2008).
- [33] F. Rey, F.M. Rodríguez, N.R. Salvetti, M.M. Palomar, C.G. Barbeito & H.H. Ortega, *J Comp. Pathol.* 142, 193 (2009).
- [34] N.R. Salvetti, A.M. Canal, E.J. Gimeno & H.H. Ortega, *Braz. J. Morphol. Sci.* 20, 93 (2003).

- [35] H.H. Ortega, N.R. Salvetti, L.A. Müller, P. Amable, J.A Lorente, C.G. Barbeito & E.J. Gimeno, *J. Comp. Pathol.* 136, 222 (2007).
- [36] M.S. Perrone, A.T. Meter & E. K. Asem, *Assist. Reprod. Technol. Androl.* 7, 103 (1995).
- [37] R. Odore, G. Re, P. Badino, A. Donn, D. Vigo, B. Biolatti & C. Girardi, *Pharmacol. Res.* 39, 297 (1999).
- [38] N.R. Salvetti, L.A. Muller, J.C. Acosta, J.E. Gimeno & H.H. Ortega, *Vet. Pathol.* 44, 373 (2007).
- [39] N.R. Salvetti, C. Baravalle, G.A. Mira, E.J. Gimeno, B.E. Dallard, F. Rey & H.H. Ortega, *Reprod. Domest. Anim.* 44, 805 (2009).
- [40] N.R. Salvetti, E.J. Gimeno, J.A. Lorente & H.H. Ortega, *Cells Tissues Organs* 178, 117 (2004).
- [41] N. Isobe, & Y. Yoshimura, *J. Reprod. Dev.* 53, 1119 (2007).
- [42] A.T. Peter & N. Dhanasekaran, *Reprod. Domest. Anim.* 38, 209 (2003).
- [43] H.H. Ortega, M.L. Stangaferro, N.R. Salvetti, D. Arcangelo & M.M. Palomar, *Medicina (Supl III)* 67, 185 (2007).
- [44] N.R. Salvetti, C.G. Panzani, E.J. Gimeno, L.G. Neme, N.S. Alfaro & H.H. Ortega, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 68 (2009).
- [45] R.L. Robker & J.S. Richards, *Mol. Endocrinol.* 12, 924 (1998).
- [46] A.N. Hirshfield, *Int. Rev. Cytol.* 124, 43 (1991).
- [47] M.C. Rao, A.R. Jr. Midgley & J.S. Richards, *Cell* 14, 71 (1978).
- [48] T. El-Hefnawy & A.J. Zeleznik, *Endocrinology* 142, 4357 (2001).
- [49] A.J. Duleba, R.Z. Spaczynski, D.L. Olive & H.R. Behrman, *Biol. Reprod.* 56, 891 (1997).
- [50] J.S. Richards, L. Hedin & L. Caston, *Endocrinology* 118, 1660 (1986).
- [51] J.S. Richards, *Endocr. Rev.* 15, 725 (1994).
- [52] N.R. Salvetti, M.L. Stangaferro, M.M. Palomar, N.A. Alfaro, F. Rey, E.J. Gimeno & H.H. Ortega, *Anim. Reprod. Sci.* 122, 98 (2010).
- [53] N. Isobe & Y. Yoshimura, *Theriogenology* 53, 897 (2000).
- [54] C. Baravalle, N.R. Salvetti, G.A. Mira, N. Pezzone & H.H. Ortega, *Arch. Med. Res.* 37, 830 (2006).
- [55] M. Das, O. Djahanbakhch, B. Hacıhanefioglu, E. Saridogan, M. Ikram, L. Ghali & M. Raveendran, *A. Storey, J Clin. Endocr. Metab.* 93, 881 (2008).
- [56] D. Monniaux, N. di Clemente, J.L. Touzè & C. Belville, C. Rico, *Biol. Reprod.* 79, 387 (2008).
- [57] R. Farookhi, *Endocrinology* 106, 1216 (1980).
- [58] R.M.L. Zwijzen, R.S. Buckle, E.M. Hijmans, C.J.M. Loomans & R. Bernards, *Genes Dev.* 12, 3488 (1998).
- [59] A.J. Hsueh, H. Billig & A. Tsafiriri, *Endocr. Rev.* 15, 707 (1994).
- [60] N. Isobe & Y. Yoshimura, *Theriogenology* 54, 1159 (2000).
- [61] E. Anderson & G.Y. Lee, *Tissue Cell* 29,171 (1997).
- [62] H. Shirwalkar, N. Deepak, D.N. Modi & A. Maitra, *Mol. Cell. Endocrinol.* 272, 22 (2007).
- [63] J.L. Tilly, *Rev. Reprod.* 1, 162 (1996).
- [64] R. Robles, X.J. Tao, A.M. Trbovich, D.V. Maravel, R. Nahum, G.I. Perez, K.I. Tilly & J.L. Tilly, *Endocrinology* 140, 2641 (1999).
- [65] K. Yacobi, A. Wojtowicz, A. Tsafiriri & A. Gross, *Endocrinology* 145, 1943 (2004).
- [66] A.L. Johnson, *Anim. Reprod. Sci.* 78, 185 (2003).
- [67] H. Billig, I. Furuta & A.J. Hsueh, *Endocrinology* 133, 2204 (1993).
- [68] M. Beato, & J. Klug, *Hum. Reprod. Update.* 6, 225 (2000).
- [69] D.L. Cook, C.A. Smith, J.R. Parfet, R.S. Youngquist, E.M. Brownny & H.A. Garverick, *J. Reprod. Fertil.* 90, 37 (1990). *Anales Acad. Nac. de Cs. Ex., Fís. y Nat., tomo 62 (2010): 39-48.* - 48 -

- [70] C.S. Rosenfeld, J.S. Wagner, R.M. Roberts & D.B. Lubahn, *Reproduction* 122, 215 (2001).
- [71] R. Taft, N. Ahmad & E.K Inskeep *J. Anim. Sci.* 74, 2985 (1996).
- [72] A.J. Jakimiuk, S.R. Weitsman, H.W. Yen, M. Bogusiewicz & D.A. Magoffin, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5532 (2002).
- [73] M.D. Calder, M. Manikkam, B.E. Salfen, R.S. Youngquist, D.B. Lubahn, W.R. Lamberson & H.A. Garverick, *Biol. Reprod.* 65, 471 (2001).
- [74] M. Byers, G.G. Kuiper, J.A. & O.K. Park-Sarge, *Mol. Endocrinol.* 11, 172 (1997).
- [75] S.C. Sharma, J.W. Clemens, M.D. Pisarska & J.S. Richards, *Endocrinology* 140, 4320 (1999).
- [76] B. Berisha, D. Schams, M. Kosmann, W. Amselgruber & R. Einspanier, *J. Endocrinol.* 167, 371 (2000).
- [77] B. Berisha, M. Pfaffl & D. Schams, *Endocrine* 17, 207 (2002).
- [78] S. Mosselman, J. Polman & R. Dijkema, *FEBS Lett.* 392, 49 (1996).
- [79] K. Pettersson, K. Grandien, G.G. Kuiper & J.A. Gustafsson, *Mol. Endocrinol.* 11, 1486 (1997).
- [80] H.H. Ortega, N.R. Salvetti & V. Padmanabhan, *Reproduction* 137, 865 (2009).
- [81] J.F. Couse, M.M. Yates, R. Sanford, A. Nyska, J.H. Nilson & K.S. Korach, *Endocrinology* 145, 4693 (2004).
- [82] J.M. Emmen, J.F. Couse, S.A. Elmore, M.M. Yates, G.E. & K.S. Korach, *Endocrinology* 146, 2817 (2005).
- [83] D.X. Wen, Y.F. Xu, D.E. Mais, M.E. Goldman & D.P. McDonnell, *Mol. Cell. Biol.* 14, 8356 (1994).
- [84] T.F. Ogle, *Steroids* 67, 1 (2002).
- [85] X. Fang, S. Wong & B.F. Mitchell, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E1167 (2002).
- [86] D. Schams, S. Kohlenberg, W. Amselgruber, B. Berisha, M.W. Pfaffl & F. Sinowatz, *J. Endocrinol.* 177, 305 (2003).
- [87] S. Goldman, A. Weiss, I. Almalah & E. Shalev, *Mol. Hum. Reprod.* 11, 29 (2005).
- [88] U. Natraj & J.S. Richards, *Endocrinology* 133, 761 (1993).
- [89] E.C. Svensson, E. Markstrom, M. Andersson & H. Billig, *Biol. Reprod.* 63, 1457 (2000).
- [90] B. Mulac-Jericevic & O.M. Conneely, *Reproduction* 128, 139 (2004).

*Manuscrito recibido el 8 de febrero de 2011.*

*Aceptado 6 de abril de 2011.*