

Rol de la hormona del crecimiento en la función ovárica de la vaca lechera

Role of growth hormone in dairy cow ovarian function

LEIVA, CJ ^{1,3}; DURANTE, LI ^{1,3}; BÉRTOLI, J ^{2,3}; GATTI, E ^{2,3}; BARAVALLE, E ^{2,3}; REY, F ^{1,2}; ORTEGA HH^{1,2}; MARELLI BE^{1,2}

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina. ²Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias del Litoral, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Esperanza, Santa Fe, Argentina. ³Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Esperanza, Santa Fe, Argentina.

RESUMEN

La hormona del crecimiento es reconocida como un regulador endocrino clave del crecimiento post-natal y la producción en bovinos de leche. No obstante, actualmente se conoce que esta hormona también afecta la reproducción de estos animales. La función ovárica en los bovinos está controlada por mecanismos de control intraováricos que, concomitantemente con señales endócrinas, coordinan el reclutamiento, la selección y el crecimiento folicular. Aunque el rol de las gonadotropinas en la estimulación del crecimiento y diferenciación folicular es claro, particularmente durante las etapas finales de la maduración, la hormona del crecimiento también cumple una función moduladora de relevancia, ya que ejerce múltiples efectos directos e indirectos en el ovario, actuando sobre la esteroidogénesis, la foliculogénesis y la maduración de los ovocitos. Todo avance en la comprensión de los mecanismos de regulación intraováricos resultará de utilidad en la planificación de nuevos enfoques para la manipulación de la función ovárica y la mejora de la fertilidad de los rodeos lecheros.

Palabras clave: (hormona del crecimiento), (reproducción), (ovario), (bovinos), (enfermedad quística ovárica)

SUMMARY

Growth hormone is recognized as a key endocrine regulator of postnatal growth and production in dairy cattle. However, it is currently known that this hormone also affects reproduction in these animals. Ovarian function in cattle is controlled by intraovarian control mechanisms that, concomitantly with endocrine signals, coordinate recruitment, selection and follicular growth. Although the role of gonadotropins in stimulating follicular growth and differentiation is clear, particularly during the final stages of maturation, growth hormone also plays an important modulating role, since it exerts multiple direct and indirect effects on the ovary, acting on steroidogenesis, folliculogenesis and oocyte maturation. Any advances in understanding intraovarian regulatory mechanisms will be helpful in the design of new approaches to manipulating ovarian function and improving fertility in dairy herds.

Keywords: (growth hormone), (reproduction), (ovary), (cattle), (ovarian cystic disease)

INTRODUCCIÓN

La base fundamental de la viabilidad económica de los sistemas productivos pecuarios es la generación de la mayor cantidad posible de terneros con la mejor eficiencia reproductiva, caracterizada principalmente por índices reproductivos adecuados como ser, tasas de concepción elevadas e intervalos parto-parto breves. La alta eficiencia reproductiva se traduce en un incremento directo en la producción de leche o de carne, según el sistema del que se trate. Cualquiera sea el caso, el comienzo del proceso reproductivo se debe a una coordinación de eventos endocrinos que actúan en el ovario para inducir el estro y la posterior ovulación¹. Por lo tanto, cualquier alteración fisiológica que sufra la vaca en relación a dichos procesos podría provocar una disminución en los índices reproductivos y, en consecuencia, en la producción.

En los sistemas productivos actuales, las vacas sufren alteraciones metabólicas durante toda su vida asociadas a las distintas etapas adaptativas como nacimiento, destete y parto. Particularmente, durante el período de transición (PT), el cual transcurre desde las tres semanas antes del parto hasta tres semanas posteriores al mismo, la vaca sufre una serie de adaptaciones metabólicas, fisiológicas y anatómicas que la preparan para el parto y la lactan-

cia¹⁸. Esto convierte al PT en una etapa crítica debido a las complicaciones que pueden surgir como consecuencia de estas adaptaciones, y que pueden condicionar la reanudación de la actividad ovárica posparto. Las vacas que experimentan complicaciones en el PT poseen un mayor riesgo de contraer enfermedades, de padecer trastornos reproductivos y, en consecuencia, de ser descartadas; incrementándose así los índices de reposición¹². Aproximadamente entre el 30-50 % de estos animales se ven afectados por alguna alteración metabólica o por infecciones durante el parto, lo que genera un impacto económico negativo en la producción y en el bienestar general de dichos animales^{41,11}.

La mayoría de las vacas lecheras en parto presentan un periodo de insulino-resistencia, reducción en la ingesta alimentaria, balance energético negativo (BEN), lipólisis incrementada con la consecuente pérdida de peso (al inicio de la lactancia), hipocalcemia, y alteración de la función inmunológica⁵⁶. En las vacas lecheras de alta producción, la redistribución de nutrientes durante la lactancia temprana es un proceso fisiológico fundamental para alcanzar los máximos rendimientos productivos⁵. Las razas destinadas a la producción de carne se ven afectadas en menor medida. Una de las principales hormonas responsables

de este proceso es la hormona del crecimiento (GH, del inglés *G*rowth *H*ormone)¹⁹. La GH es un regulador endocrino clave del crecimiento y la lactancia en estos animales. No obstante, actualmente se conoce que esta hormona también afecta la función reproductiva de los bovinos, ya que ejerce múltiples efectos específicos sobre la fisiología ovárica^{64,51,27,15,28}.

La Enfermedad Quística Ovárica (EQO) es uno de los desórdenes reproductivos más frecuentes y una causa importante de infertilidad en vacas lecheras. El componente central de la etiopatogenia de la EQO se asocia con una disfunción del eje hipotálamo-pituitario-ovárico. No obstante, la persistencia de los folículos a lo largo del tiempo también está vinculada fuertemente a la acción de componentes intraováricos que pueden afectar procesos fisiológicos a este nivel como la foliculogénesis, la esteroidogénesis y la ovulación⁶⁶. Además, existen diversos factores que contribuyen al desarrollo de quistes ováricos en los rodeos entre los que se destacan los efectos de BEN, el estrés, las deficiencias nutricionales, el manejo del rodeo, las enfermedades infecciosas, entre otros^{66,55}. El estudio de los procesos que conducen a la falla ovulatoria y la persistencia del folículo dominante resulta clave para comprender la patogenia de la EQO.

Considerando lo expuesto hasta aquí, esta revisión tiene como objetivo analizar las funciones más relevantes de GH sobre la fisiología ovárica de las vacas lecheras, su rol como mediador entre el estado metabólico y reproductivo de estos animales, y su posible participación en la fisiopatología ovárica.

Hormona del crecimiento: secreción y funciones fisiológicas

La GH, también llamada somatotropina, es una hormona proteica monomérica de 191 aminoácidos, con un peso molecular de 22 kDa. En el bovino, como en la mayoría de los mamíferos, la GH es sintetizada principalmente por las células somatotróficas de la adenohipófisis, y secretada de forma pulsátil siguiendo un ritmo ultradiano³⁶. En dichas especies, tanto la síntesis como la secreción de la GH hipofisaria están controladas principalmente por dos péptidos hipotalámicos con funciones opuestas, la hormona liberadora de GH (GHRH) y la hormona inhibidora

de la liberación de GH (GHIH; o somatostatina), quienes actúan estimulando o inhibiendo dichos procesos, respectivamente. Además, se han identificado una amplia variedad de moléculas bioactivas y hormonas que actúan como factores reguladores secundarios de la secreción de GH. Entre los reguladores positivos más relevantes de la GH hipofisaria se encuentran la serotonina, la acetilcolina, ciertos aminoácidos o sus derivados, el factor de crecimiento de fibroblastos, factor 1 derivado de quimiocinas, endotelinas, galanina y la proteína klotho. Además, se destacan la ghrelin, el neuropéptido Y, la hormona liberadora de tirotropina, las hormonas tiroideas, la hormona liberadora de gonadotropinas, la hormona liberadora de corticotropina, entre otros. Dentro de los reguladores negativos de GH se encuentran las catecolaminas, la oxitocina, la adernomedulina-2, la nesfatina-1 y el factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF1). Finalmente, la colecistoquinina, la activina, la leptina y la kisspeptina han demostrado un comportamiento dual en la regulación de GH, y persiste cierto debate sobre el potencial inhibidor y/o estimulante de estas moléculas^{24,69}.

La expresión de génica de GH, sin embargo, no se limita a la glándula pituitaria, ya que también sucede en diversos tejidos extra-pituitarios como los tejidos neurales, tejidos del sistema inmune, en órganos reproductivos, en órganos del sistema gastrointestinal y cardiovascular, en la piel, en el tejido muscular, en órganos del sistema respiratorio, entre otros, donde la GH producida localmente puede actuar como un factor de crecimiento autocrino o paracrino²⁵. Sin embargo, los mecanismos que regulan la secreción de GH en estos sitios están menos estudiados.

Dada la diversidad de órganos blanco sobre los que actúa, la GH es considerada una hormona pleiotrópica que participa en la regulación de numerosos procesos vitales en los vertebrados. En primer lugar, la GH es un regulador endocrino clave que controla diversos aspectos del crecimiento de los animales y el metabolismo de los nutrientes¹⁴. El sitio de acción principal de la GH es el hígado, donde la unión de dicha hormona a su receptor de membrana desencadena diferentes mecanismos de transducción intracelular de respuesta, siendo el más relevante el de liberación de IGFs (IGF1 e IGF2). Ambos

factores de crecimiento ejercen roles diferentes. Mientras que IGF1 es considerado un mediador de las vías de acción clásicas en el crecimiento, desarrollo y proliferación celular, el IGF2 es importante en la regulación y desarrollo perinatal, siendo sus concentraciones sistémicas menos afectadas por la GH¹⁷. El IGF1 actúa como un factor de crecimiento sistémico y, a su vez, ejerce un mecanismo de retroalimentación negativo en el hipotálamo sobre la secreción de GH. El metabolismo de los animales, principalmente el balance nutricional y energético, es uno de los reguladores clave de la producción de IGF1 en el hígado⁴⁴. Dada la interrelación entre GH e IGF1 (eje GH/IGF), una desregulación en este sentido podría generar trastornos del crecimiento.

El eje GH/IGF también cumple un rol primordial en los bovinos durante la lactancia. La GH actúa sobre múltiples tejidos, pero los eventos coordinados en el hígado y el tejido adiposo son los más importantes en este periodo. Durante el posparto, el incremento de GH tiene efectos directos e indirectos sobre la lactogénesis. Por un lado, la GH estimula la gluconeogénesis hepática y ejerce una acción antagónica sobre los efectos de la insulina, proporcionando la glucosa necesaria para la síntesis de la lactosa en la glándula mamaria. Mientras que, por el otro, este incremento de GH también antagoniza los efectos de la insulina en tejido adiposo, promoviendo la lipólisis e inhibiendo la lipogénesis y captación de glucosa dependiente de insulina. Así, los componentes del sistema GH/IGF juegan un papel importante en la transición metabólica posparto en bovinos, favoreciendo una mayor producción de leche en este periodo. Este contexto hormonal promueve el estado catabólico que sustenta la alta e inmediata producción de leche luego del parto^{50,59}.

Actualmente se conoce que la GH también afecta la función reproductiva de los animales. En el caso particular de la hembra, GH tiene efectos directos e indirectos sobre la función ovárica, actuando sobre la esteroidogénesis, la foliculogénesis y la maduración de los ovocitos, como describiremos más adelante^{64,51,27,15,28}. Los efectos directos están mediados por la interacción de GH y su receptor (GHR), mientras que los indirectos probablemente sean una consecuencia de la producción hepática o local de IGF1 en respuesta a la estimulación por GH. La GH puede

de estimular la secreción de IGF-1 no solo en el hígado sino también en los tejidos diana periféricos. Además, el IGF-1 puede secretarse localmente bajo la influencia de estímulos distintos de la GH. En el caso del ovario, pueden estar implicadas hormonas esteroides, gonadotropinas o la combinación de ambas. Finalmente, el propio ovario puede secretar GH localmente y ejercer una acción paracrina, modulando la vía de señalización intracelular de GH sin la interacción con el dominio extracelular del GHR de membrana. Esto es especialmente relevante ya que, contrariamente a la secreción pituitaria, la secreción ovárica de GH tiene lugar con un patrón regular, no pulsátil y no circadiano¹⁷.

Finalmente, la GH también participa en la regulación de otros procesos como la actividad física, neuroprotección, inmunidad, osmoregulación e incluso, comportamiento social⁶⁹.

Receptor de GH y cascadas de señalización intracelular

Aunque el GHR está presente en la mayoría de los tejidos, las mayores concentraciones se encuentran en el hígado. Luego le siguen el tejido adiposo, los músculos y los huesos (placa de crecimiento). En el caso de los tejidos reproductivos, dicho receptor se expresa en bajos niveles. El gen del GHR presenta tres promotores (P1, P2 y P3) que controlan su transcripción en diferentes tipos de células que responden a GH. A partir de estos promotores se transcriben tres variantes del receptor, el GHR 1A, 1B y 1C, respectivamente. El GHR 1A se encuentra únicamente en el hígado de los animales adultos. En tanto, GHR 1B y GHR 1C, además de estar presentes en hígado, se localizan en una amplia variedad de tejidos (incluido el ovárico) y tienen poca regulación metabólica o del desarrollo⁴⁷.

A nivel celular, la GH ejerce su acción mediante la unión a su receptor localizado en la membrana plasmática de las células de los distintos tejidos del organismo. La activación del GHR activa una variedad de genes, mediante sistemas de intermediarios intracelulares que desencadenan diferentes respuestas biológicas como proliferación celular, diferenciación y migración, prevención de la apoptosis, reorganización del citoesqueleto y regulación de vías metabólicas. El GHR es un miembro de la familia

de receptores de citoquinas de clase I, la cual incluye a más de 30 miembros. Entre ellos se destacan el receptor de prolactina, el de eritropoyetina, el receptor de leptina, el receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y los receptores de numerosas interleuquinas^{13,44}. El GHR consta de 638 aminoácidos y está presente en la membrana celular formando un homodímero. En su estructura proteica se distinguen un dominio extracelular homólogo al de los receptores de citoquinas, un dominio transmembrana de paso único y un dominio intracelular citoplásmico. El dominio intracelular presenta un motivo Box1 conservado cerca de la membrana celular, y un motivo Box2 menos conservado, localizado a continuación. Estos receptores carecen de actividad tirosina quinasa intrínseca y, por lo tanto, dependen del reclutamiento de proteínas tirosina quinasa para la transducción de señales^{70,13}.

La vía principal de señalización activada por GH está mediada por dos familias de proteínas intracelulares: las JAKs (Janus quinasas) y las STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription), por lo cual se la conoce como la vía JAK-STAT^{10,13,44}. En los mamíferos, la familia de las JAKs comprende cuatro miembros, JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 (Tyrosine Kinase 2), que pueden unirse a receptores específicos. La mayoría de las JAKs tienen una expresión ubicua en diferentes tipos celulares, excepto JAK3 que se encuentra sólo en células hematopoyéticas. Mientras que JAK1 y JAK2 están involucradas en diferentes procesos fisiológicos como la hematopoyesis, la inmunidad y el desarrollo y crecimiento, JAK3 y TYK2 participan principalmente en la homeostasis del sistema inmunológico. JAK2 es el único miembro de la familia que se une al GHR⁷⁰. Un homodímero de GHR preensamblado interactúa con GH a través de dos sitios de unión con diferentes afinidades por el ligando. La formación del complejo trimérico produce la rotación del dominio transmembrana del receptor, lo que conduce a la activación de dos moléculas JAK2s asociadas al motivo Box1 por transfosforilación (es decir, la fosforilación recíproca entre residuos tirosina)⁹. A su vez, las JAK2s activadas fosforilan múltiples tirosinas en el dominio citoplásmico del GHR, promoviendo el reclutamiento de las STATs hacia dichos sitios. La familia de proteínas STATs

comprende siete miembros, STAT1-4, 5a, 5b y 6. STATs 1, 3, 5a y 5b son activadas mediante la fosforilación por JAK2. No obstante, STAT5 es el factor de transcripción más importante como mediador en las acciones celulares de GH. Las STATs no estimuladas se encuentran en el citoplasma y son transcripcionalmente inactivas. En cambio, luego de la fosforilación, estas proteínas translocan al núcleo donde actúan como elementos de respuesta específicos, regulando la transcripción de genes diana^{13,44}.

Una vez que se desencadena, la vía JAK-STAT está regulada de forma negativa principalmente por las proteínas SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling)²¹. La familia de las SOCSs consta de ocho miembros, SOCS 1-7 y CIS, sin embargo, sólo las SOCS 1-3 y CIS participan de esta vía, siendo SOCS2 la más relevante. La GH induce la expresión de SOCS-1, -2, y -3, quienes luego inhiben mediante retroalimentación negativa su propia acción transcripcional⁴². Las SOCS pueden actuar mediante la interacción con GHR o JAK2 según diferentes mecanismos. Estas proteínas pueden inhibir la actividad quinasa de JAK, pueden impedir la unión de JAK al receptor, pueden bloquear el acceso de las STATs al receptor, o pueden mediar la ubiquitinación de JAKs y STATs para su degradación en los proteosomas⁴³. Las vías de señalización del GHR también pueden ser suprimidas mediante desfosforilaciones llevadas a cabo por proteínas tirosina fosfatasas (PTP) y por la proteína inhibidora de las STATs activadas (PIAS)²¹.

Otras cascadas de señalización intracelular activadas por GH son la vía de las MAPKs (proteínas quinasas activadas por mitógeno) y la vía PI3K / AKT / mTOR (fosfatidilinositol 3-quinasa / serina-treonina proteína-quinasa / diana de la rapamicina en los mamíferos)⁴⁴.

Por otra parte, varios estudios han demostrado que luego de la interacción de GH con su receptor, el complejo GH-GHR puede disociarse de la membrana plasmática y translocar al núcleo, induciendo cambios en la actividad transcripcional^{40,15}. Estos resultados estarían indicando que el GHR estaría actuando como un factor de transcripción nuclear, aunque también podría estar ejerciendo otras funciones que aún se desconocen. Los mecanismos moleculares subyacentes siguen siendo poco claros. Sin embargo, estos hallazgos contradicen el concepto clásico

de que las hormonas proteicas solo actúan sobre sus receptores en la membrana celular.

Rol de GH en el ovario

La GH tiene múltiples efectos específicos sobre la fisiología reproductiva tanto del macho como de la hembra, aunque en esta revisión describiremos exclusivamente estos últimos. A nivel ovárico, GH ejerce sus acciones más relevantes sobre la foliculogénesis, la gametogénesis y la esteroidogénesis^{64,51,27,15,28}. Si bien muchas de estas acciones reflejan la acción endocrina directa de la GH pituitaria, la GH sintetizada a nivel local por los tejidos reproductivos puede tener acciones autocrinas / paracrin.

En el ovario bovino, la GH fue inmunolocalizada en los folículos antrales de >2 mm de diámetro y esta marcación se vio incrementada con el crecimiento folicular³⁰. Por el contrario, la GH no fue detectada en el estroma ovárico ni en los folículos primordiales, primarios o secundarios. La GH también está presente en el líquido folicular, donde su concentración no necesariamente se correlaciona con los niveles plasmáticos. Esto sugiere que la síntesis ovárica de GH podría contribuir de forma significativa a mantener un ambiente hormonal diferencial en el folículo⁸. A su vez, dentro de los folículos ováricos, la GH fue inmunolocalizada principalmente en células de la granulosa y particularmente en las células del *cumulus* y en el ovocito⁵³. Como los ovocitos y las células de la granulosa son avasculares, es decir que están separados de la circulación sistémica por la lámina basal, estos hallazgos fueron otro indicio de la producción local de GH. En relación a ello, el ARNm que codifica para la GH fue detectado en el ovocito y en las células de la granulosa mural que rodean la cavidad antral, pero no así en las células del *cumulus* del complejo *cumulus*-ovocito (COC)³⁰.

En cambio, existen controversias respecto a la expresión del GHR en los folículos ováricos bovinos. Se ha reportado que el ARNm que codifica para el GHR y la proteína fueron localizados principalmente en cuerpo lúteo, mientras que, en folículos ováricos, los niveles de dicho ARNm fueron extremadamente bajos y la proteína GHR, indetectable⁴⁵. Años más tarde, el ARNm del GHR fue amplificado a partir de células de la granulosa, células del *cumulus* y de ovocitos²⁹. Asimismo, Kö-

lle *et al.* demostraron la presencia del ARNm y de la proteína GHR en el ovocito y en las células de la granulosa³⁸. Estas diferencias pueden explicarse en función de los tipos de folículos analizados y de la metodología empleada en los diferentes estudios. Actualmente se conoce que el patrón de expresión de GHR varía durante la foliculogénesis, desde estar ausente en los folículos preantrales hasta presentar altos niveles de expresión en los folículos antrales pequeños y grandes⁶⁴. Por lo tanto, se propone que, en los folículos más pequeños e inmaduros que carecen del receptor, la GH puede ejercer sus acciones de forma indirecta, posiblemente a través de la producción local de IGF1 inducida por GH. En cambio, los folículos más maduros responden de forma directa al estímulo de GH a través de su receptor²⁸.

En los últimos años, varios estudios *in vitro* e *in vivo* en bovinos han demostrado la importancia de GH en el desarrollo folicular y la maduración de los ovocitos^{3,32,33}. En las etapas tempranas de la foliculogénesis, en estadios donde el desarrollo folicular es independiente de FSH, se ha demostrado que la GH estimula el crecimiento y previene la atresia de los folículos pequeños. La GH probablemente actúa en el reclutamiento de folículos que precede al crecimiento de una onda folicular, y parece ser uno de los cofactores necesarios para la supervivencia y el crecimiento de los mismos^{4,33}. En varios modelos animales se determinó que la GH juega un papel importante en el crecimiento y la progresión de los folículos primordiales¹⁷. Ford *et al.* sugieren que, además del reservorio de folículos primordiales presentes en el ovario al nacimiento, la tasa de activación de dichos folículos es crucial para mantener una fertilidad adecuada²³. En este contexto, la GH y otros factores tales como IGF1, la proteína morfogénica del hueso, la hormona anti-mülleriana, tendrían un rol determinante en la activación de folículos primordiales para su posterior desarrollo a folículos antrales^{2,37,71}. Un estudio en ratas, a las cuales se les aplicó radioterapia, demostró que la administración de GH exógena protegía la reserva folicular en las etapas iniciales de maduración. Los autores proponen que la GH ejerce dicho efecto protector mediante el aumento de la secreción hormonal, el incremento de la proliferación de las células ováricas y la disminución del estrés oxidativo y la apoptosis⁵². Por último, un estudio *in vitro* demostró que el tratamiento

de folículos secundarios bovinos con GH fue capaz de provocar un incremento en el diámetro folicular, en la formación del antro y en la secreción de E2 por parte de los mismos³.

Por otra parte, en las etapas más avanzadas de la foliculogénesis, las evidencias experimentales sugieren que la GH y/o el IGF1 actúan sobre el ovario de forma sinérgica con las gonadotropinas (FSH y LH), para estimular la proliferación de las células de la granulosa y de la teca, además de la diferenciación de las células de la granulosa a células luteales^{6,62}. En los bovinos, el tratamiento con GH exógena (rbST, somatotropina bovina recombinante) demostró efectos significativos sobre el desarrollo folicular. La GH fue capaz de estimular poblaciones particulares de folículos de forma selectiva, inhibiendo el desarrollo del folículo dominante de la primera onda y estimulando el crecimiento de los subordinados. Esto provocó un inicio anticipado de la segunda onda folicular durante el ciclo estral de vaquillonas tratadas con rbST⁴⁶. Además, Shimizu *et al.* sugirieron que el aumento en la expresión de GHR en las células de la granulosa puede ser un punto de inflexión para que los folículos antrales entren en la fase ovulatoria durante la maduración folicular final y que, además, puede sostener la maduración de los folículos preovulatorios en los bovinos⁶³. Esta regulación positiva del receptor es independiente del aumento concomitante de la producción de estrógenos, pero puede ser inducida por la FSH.

A medida que la foliculogénesis avanza, también lo hace la maduración del ovocito, el cual sufre una serie de eventos nucleares y citoplasmáticos que lo preparan para su posterior fertilización. En humanos, se ha demostrado que las concentraciones foliculares de GH están directamente relacionadas con la calidad de los ovocitos²⁶. La GH acelera la maduración nuclear y citoplasmática en los COCs⁷ y, en los bovinos esto ocurre independiente de IGF1²⁹. Esta acción está mediada por las células del *cumulus*, ya que no se evidencia en los ovocitos desnudos. La GH actúa sobre las células del *cumulus* para provocar su expansión, como resultado del incremento de la tasa de proliferación y la disminución de la apoptosis^{39,34}. También es posible que la GH actúe directamente sobre el ovocito para inducir su maduración ya que la expresión del GHR fue demostrada en ovocitos de diferen-

tes especies²⁵. Por último, el efecto benéfico de la GH sobre la fertilidad de la hembra observado en estudios *in vivo* puede reflejar la capacidad estimulante de la GH sobre la cinética de maduración nuclear del ovocito.

Finalmente, aunque las gonadotropinas son los reguladores primarios de la esteroidogénesis ovárica, las evidencias *in vitro* sugieren que la GH también modula la liberación de progesterona y estradiol (E2) en células de la granulosa bovina⁶⁷ y células de la granulosa luteinizadas humanas³⁵. La interacción GH-GHR en las células de la granulosa puede modular la acción de la FSH y también inducir la expresión del receptor de LH (LHR). El LHR es un marcador clave de la diferenciación de las células de la granulosa a células luteales. Posiblemente, esta acción también pueda estar influenciada por la producción de IGF1 (estimulada por GH) dentro del ovario, el cual actúa de manera paracrina cuando las células de la granulosa proliferan²⁸. El efecto de la GH sobre la expresión de FSHR y LHR ha sido demostrado *in vitro*³¹ e *in vivo*⁵⁸ y resulta de gran relevancia. Esto significa que la GH puede modificar o potenciar la sensibilidad de las células de la granulosa y / o de la teca al estímulo de las gonadotropinas y, posteriormente, regular la síntesis y liberación de esteroides sexuales en los folículos, estimulando el crecimiento celular como factores esteroidogénicos paracrinos / autocrinos²⁸.

Influencia del eje GH/IGF en trastornos ováricos

La EQO y el anestro posparto son importantes patologías que contribuyen a la baja eficiencia reproductiva de los sistemas lecheros. Los quistes se desarrollan a partir de folículos preovulatorios que no ovulan, persisten y luego interfieren con la función ovárica normal⁶⁸. Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia en el posparto, lo cual es una expresión evidente de la disfunción endocrina característica de esta fase delicada de la vida reproductiva de la vaca⁵⁵. El estudio de los procesos que conducen a la falla ovulatoria y la persistencia del folículo dominante resultan clave para comprender la patología de la EQO.

Al inicio de la lactancia se producen cambios importantes a nivel del eje GH/IGF⁴⁸. Un incre-

mento de la concentración de GH sistémica impulsa el redireccionamiento de los nutrientes que se dirigen preferentemente a la producción de leche²⁰. Por su parte, las concentraciones de IGF1 en sangre disminuyen en el momento del parto y se mantienen bajas durante las semanas siguientes. Esta disminución del IGF1 reduce la retroalimentación negativa sobre la secreción de GH favoreciendo su incremento en sangre. Durante este periodo, las vacas lecheras suelen experimentar un BEN ya que no pueden consumir suficiente alimento para satisfacer la demanda energética de la producción de leche¹⁸. La alta producción de leche y el BEN durante el posparto temprano son factores que predisponen a los animales a la EQO. El BEN está acompañado de diversas adaptaciones hormonales y metabólicas que pueden afectar la función ovárica. Aunque no existe un consenso, varios estudios sugieren un vínculo entre la EQO y la magnitud y/o duración del BEN. Los posibles mecanismos subyacentes tampoco están claros, pero el BEN puede favorecer el desarrollo de quistes tanto a nivel del hipotálamo/pituitaria como del ovario/folículo a través de los cambios hormonales y metabólicos asociados^{16,49}. Como se mencionó previamente, a nivel ovárico, el IGF1 promueve la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de las células foliculares, así como, además, la esteroidogénesis^{6,62}. En la mayoría de sus funciones, IGF1 actúa de forma sinérgica con las gonadotropinas. El IGF1 que llega al ovario proviene de la circulación sistémica, aunque también es producido de forma local. Las fluctuaciones en las concentraciones séricas de IGF1 provocan variaciones en las concentraciones de IGF1 en el líquido folicular. Estas últimas pueden afectar la forma en que el folículo crece y responde a las gonadotropinas ya que IGF1 incrementa el número de receptores de gonadotropinas y la actividad de sus sistemas de segundos mensajeros²². Por lo tanto, las concentraciones bajas de IGF1 sistémico en el posparto temprano podrían contribuir a la anovulación y al desarrollo posterior de folículos quísticos⁷². Silva *et al.* demostraron que las vacas lecheras en anestro posparto poseen una menor concentración de IGF1 en sangre que las vacas que reinician la ciclicidad⁶⁵. Además, en animales con EQO se evidenciaron alteraciones en la expresión génica de IGF1 en células de la granulosa bovina, con

niveles no detectables en células de la teca⁶⁰. También se evidenció una menor expresión proteica de IGF1 en la pared de folículos quísticos respecto a folículos de animales sanos⁵⁴. Por otro lado, se detectaron niveles de IGF1 sérico similares en animales sanos y enfermos, aunque las concentraciones de IGF1 en líquido folicular fueron menores en el último caso^{72,54}. Diversos estudios proponen que IGF1 no sólo está involucrado en la patogénesis de trastornos ováricos sino también en el mantenimiento de la EQO en los bovinos^{72,57,61}.

Por el contrario, la participación directa de la GH en la patogenia de la EQO y trastornos reproductivos relacionados, ha sido escasamente analizada hasta el momento. Considerando que GH ejerce acciones dependientes e independientes de gonadotropinas e IGF1 sobre la función gonadal, es de esperar que dicha hormona tenga un rol significativo en el desarrollo de enfermedades reproductivas. Como se mencionó previamente, la GH es un mediador metabólico que participa de los mecanismos que gobiernan la dinámica folicular, promoviendo el crecimiento folicular, la transición desde folículo primordial a folículo antral temprano, e incluso el reclutamiento folicular, ya sea actuando como un factor anti-apoptótico o mejorando la respuesta folicular a las gonadotropinas. Es decir que, GH actúa como un factor de crecimiento durante la etapa de maduración folicular temprana independiente de las gonadotropinas. En este contexto, alteraciones en las concentraciones de GH, tanto séricas como locales, podrían explicar el escaso desarrollo folicular en vacas con anestro nutricional, donde la foliculogénesis es prácticamente nula. Nuevos estudios destinados a evaluar las concentraciones de GH en vacas lecheras en anestro respecto a vacas con ciclos estrales normales serían necesarios para establecer una asociación entre estas variables. Por otra parte, también está descrito que la interacción de GH con su receptor en el ovario induce la esteroidogénesis y regula de forma positiva la expresión de LHR¹⁵. Durante las etapas finales del desarrollo folicular, se produce un incremento en la expresión de GHR en las células de la granulosa cuando los folículos antrales entran en la fase ovulatoria, lo que contribuye a la maduración de los folículos preovulatorios⁶³. La ac-

tivación de GHR induce, a través de sus efectos sobre las células de la teca, un aumento en la producción de esteroides sexuales, principalmente E2, que además de sus acciones a nivel ovárico, se libera a la circulación ejerciendo un efecto de retroalimentación positiva sobre el eje hipotalámico-hipofisario¹⁵. Por lo tanto, la GH tendría un efecto adyuvante sobre la acción de las gonadotropinas en la esteroidogénesis. El E2 contribuye al aumento sostenido de los niveles circulantes de estrógenos que secreta el folículo preovulatorio, estimulando el centro cíclico hipotalámico e induciendo la liberación del pico de LH indispensable para la ovulación. Teniendo en cuenta estos conceptos, resulta razonable proponer que alteraciones en los niveles de GH, o en su receptor, podrían afectar el mecanismo de retroalimentación positiva del E2, así como la capacidad de respuesta local de las células foliculares frente a LH. Nuevos estudios serán necesarios para confirmar estos posibles mecanismos de disfunción ovárica como responsables de la anovulación y causa potencial de la persistencia folicular.

CONCLUSIÓN

Además de sus acciones sobre el crecimiento y desarrollo postnatal de los animales, el metabolismo y la utilización y el direccionamiento de los nutrientes en la lactogénesis, la GH es una hormona pleiotrópica que desempeña una serie de acciones endocrinas, autocrinas y paracrinas en numerosos tejidos y órganos. A nivel ovárico, la GH modula la secreción y función de las gonadotropinas y ejerce acciones dependientes e independientes de las mismas sobre la actividad gonadal, incluidas la foliculogénesis, esteroidogénesis y la gametogénesis. Por lo tanto, resulta razonable considerar que una alteración en dichos procesos, regulados en parte por GH, podría repercutir en el ciclo estral normal de las vacas y conducir a importantes desórdenes reproductivos. Numerosos estudios se han enfocado en IGF1 y su participación en la fisiopatología ovárica, aunque poco se conoce al respecto sobre el rol específico de GH. Finalmente, la utilización de rbST está aprobada en numerosos países como herramienta para incrementar la producción lechera. Además, el uso clínico de GH como

adyuvante ha demostrado relevancia biológica en el tratamiento de trastornos reproductivos en humanos y en animales, al mejorar la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotropinas. No obstante, la utilización de esta hormona para el tratamiento terapéutico de desórdenes reproductivos en vacas lecheras se encuentra escasamente difundido. Considerando sus implicancias en la fisiología ovárica, sería interesante explorar su utilización en el tratamiento de anestros profundos, así como adyuvante en protocolos de sincronización, donde resulta fundamental asegurar la adecuada reactivación de los mecanismos de retroalimentación positiva del E2 sobre el hipotálamo, necesarios para que ocurra la ovulación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subsidiado por el programa CAI+D de la Universidad Nacional del Litoral y por el Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, G.P.; Jaiswal, R.; Singh, J.; Malhi, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*. 2008; 69(1): 72–80.
- Adhikari, D.; Liu, K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Nat Rev Endocrinol*. 2009; 30(5): 438–64.
- Araújo, V.R.; Gastal, M.O.; Wischral, A.; Figueiredo, J.R.; and Gastal, E.L. In vitro development of bovine secondary follicles in two- and three-dimensional culture systems Using ascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-1, and growth hormone. *Theriogenology*. 2014; 82(9): 1246–53.
- Bachelot, A.; Monget, P.; Imbert-Bolloré, P; *et al*. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. *Endocrinology*. 2002; 143(10): 4104–12.
- Bauman, D.E.; Currie, W.B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci*. 1980; 63(9): 1514–29.
- Beg, M.A.; Ginther, O.J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*. 2006; 132(3): 365–77.
- Bevers, M.M.; Izadyar, F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 197(1–2): 173–78.
- Borromeo, V.; Bramani, S.; Berrini, A.; *et al*. Growth hormone but not prolactin concentrations in the fluid of bovine ovarian cysts are related to the cystic stage of luteinization. *Theriogenology*. 1996; 46(3): 481–89.
- Brooks, A.J.; Dai, W.; M. L. O'Mara, M.L.; *et al*. Mechanism of activation of protein kinase jak2 by the growth hormone receptor. *Science*. 2014; 344(6185):
- Carter-Su, C.; Schwartz, J.; Argetsinger, L.A. Growth hormone signaling pathways. *Growth Horm IGF Res*. 2016; 28(6): 11–15.
- Cattaneo, L.; Signorini, M.L.; Bertoli, J.; *et al*. Epidemiological description of cystic ovarian disease in argentine dairy herds: risk factors and effects on the reproductive performance of lactating cows. *Reprod Domest Anim*. 2014; 49(6): 1028–33.
- Ceciliani, F.; Lecchi, C.; Urh, C.; Sauerwein, H. Proteomics and metabolomics characterizing the pathophysiology of adaptive reactions to the metabolic challenges during the transition from late pregnancy to early lactation in dairy cows. *J Proteomics*. 2018; 178(3): 92–106.
- Dehkhoda, F.; Lee, C.M.; Medina, J.; Brooks, A.J. The growth hormone receptor: mechanism of receptor activation, cell signaling, and physiological aspects. *Front Endocrinol*. 2018; 9:35.
- Devesa, J.; Almengló, C.; Devesa, P. Multiple effects of growth hormone in the body: is it really the hormone for growth? *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. 2016; 9:47–71.
- Devesa, J.; Caicedo, D. The role of growth hormone on ovarian functioning and ovarian angiogenesis. *Front Endocrinol*. 2019; 10: 450.
- Diskin, M.G.; Mackey, D.R.; Roche, J.R.; Sreenan, J.M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci*. 2003; 78(3–4): 345–70.
- Dosouto, C.; Calaf, J.; Polo, A.; Haahr, T.; Humaidan, P. Growth hormone and reproduction: lessons learned from animal models and clinical trials. *Front Endocrinol*. 2019; 10:404.
- Drackley, J.K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J Dairy Sci*. 1999; 82(11): 2259–73.
- Etherton, T.D.; Bauman, D.E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev*. 1998; 78(3): 745–61.
- Etherton, T.D. Somatotropic function: the somatomedin hypothesis revisited. *J Anim Sci*. 2004; 82: 239–244.
- Flores-Morales, A.; Greenhalgh, C.J.; Norstedt, G.; Rico-Bautista, E. Negative Regulation of growth hormone receptor signaling. *Mol Endocrinol*. 2006; 20(2): 241–53.
- Flores, R.; Looper, M.L.; Rorie, R.W.; Hallford, D.M.; Rosenkrans, C.F. Endocrine factors and ovarian follicles are influenced by body condition and somatotropin in postpartum beef cows. *J Anim Sci*. 2008; 86(6): 1335–44.
- Ford, E.A.; Beckett, E.L.; Roman, S.D.; McLaughlin, E.A.; Sutherland, J.M. Advances in human primordial follicle activation and premature ovarian insufficiency. *Reproduction*. 2020; 159(1): 15–29.
- Gahete, M.D.; Durán-Prado, M.; Luque, R.L.; *et al*. Understanding the multifactorial control of growth hormone release by somatotropes. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1163(1): 137–53.
- Harvey, S. Extrapituitary growth hormone. *Endocrine*. 2010; 38(3): 335–59.
- Hull, K.L.; Harvey, S. Growth hormone: roles in female reproduction. *J Endocrinol*. 2001; 168(1): 1–23.

27. Hull, K.L.; Harvey, S. Growth hormone and reproduction: a review of endocrine and autocrine/paracrine interactions. *Int J Endocrinol.* 2014; 2014:234014.
28. Ipsa, E.; Cruzat, V.F.; Kagize, J.N.; Yovich, Y.L.; Keane, K.N. Growth hormone and insulin-like growth factor action in reproductive tissues. *Front Endocrinol.* 2019; 10: 777.
29. Izadyar, F.; Van Tol, H.T.; Colenbrander, B.; Bevers, M.M. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-1. *Mol Reprod Dev.* 1997; 47(2): 175–80.
30. Izadyar, F.; Zhao, J.; Van Tol, J.T.; Colenbrander, B.; Bevers, M.M. Messenger RNA expression and protein localization of growth hormone in bovine ovarian tissue and in cumulus oocyte complexes (cocs) during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev.* 1999; 53(4): 398–406.
31. Jia, X.C.; Kalmijn, J.; Hsueh, A.J. Growth hormone enhances follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 1986; 118(4): 1401–9.
32. Jimenez, C.R.; de Azevedo, J.L.; Silveira, R.G.; et al. Effects of growth hormone on in situ culture of bovine preantral follicles are dose dependent. *Reprod Domest Anim.* 2016; 51(4): 575–84.
33. Jimenez, C.R.; de Azevedo, J.L.; Ciro Alexandre Alves T.; Penitente-Filho J.M.; Gonçalves, W.G. Sequential medium with GH and IGF-1 improved in vitro development of bovine preantral follicles enclosed in ovarian tissue. *Reprod Domest Anim.* 2018; 53(5):1103–13.
34. Kaiser, G.G.; Kölle, S.; Boie, G.; Sinowatz, F.; Palma, G.A.; Alberio, R.A. In vivo effect of growth hormone on the expression of connexin-43 in bovine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev.* 2006; 73 (5): 600–606.
35. Karamouti, M.; Kollia, P.; Kallitsaris, A.; Vamvakopoulos, N.; Kollis, G.; Messinis, E.I. Growth hormone, insulin-like growth factor 1, and leptin interaction in human cultured lutein granulosa cells steroidogenesis. *Fertil Steril.* 2008; 90(4): 1444–50.
36. Kasuya, E. Secretory pattern and regulatory mechanism of growth hormone in cattle. *Anim Sci J.* 2016; 87(2): 178–82.
37. Kim, J.Y. Control of ovarian primordial follicle activation. *Clin Exp Reprod Med.* 2012; 39(1): 10–14.
38. Kölle, S.; Sinowatz, F.; Boie, G.; Lincoln, D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biol Reprod.* 1998; 59 (4): 836–42.
39. Kölle, S.; Stojkovic, M.; Boie, G.; Wolf, E.; Sinowatz, F. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine in vitro maturation cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod.* 2003; 68 (5): 1584–89.
40. Lan, H.; Liu, H.; Hong, P.; Li, R.; Zheng, X. Porcine growth hormone induces the nuclear localization of porcine growth hormone receptor in vivo. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2018; 31 (4): 499–504.
41. LeBlanc, S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J Reprod Dev.* 2010; 56 (6): 29–35.
42. Leung, K.C.; Doyle, N.; Ballesteros, M.; et al. Estrogen inhibits gh signaling by suppressing GH-induced JAK2 phosphorylation, an effect mediated by SOCS-2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(3): 1016–21.
43. Linossi, E.M.; Babon, J.J.; Hilton, D.J.; Nicholson, S.E. Suppression of cytokine signaling: the SOCS perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013; 24(3): 241–48.
44. Lu, M.; Flanagan, J.U.; Langley, R.I.; Hay, M.P.; Perry, J.P. Targeting growth hormone function: strategies and therapeutic applications. *Signal Transduct Target Ther.* 2019; 4:3.
45. Lucy, M.C.; Collier, R.J.; Kitchell, M.L.; Dibner, J.J.; Hauser, S.D.; Krivi, G.G. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biol Reprod.* 1993; 48 (6): 1219–27.
46. Lucy, M.C.; Byatt, J.C.; Curran, T.L.; Curran, D.F.; Collier, R.J. Placental lactogen and somatotropin: hormone binding to the corpus luteum and effects on the growth and functions of the ovary in heifers. *Biol Reprod.* 1994; 50(5): 1136–44.
47. Lucy, M.C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci.* 2000; 83(7): 1635–47.
48. Lucy, M.C.; Jiang, H.; Kobayashi, Y. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. *J Dairy Sci.* 2001; 84(2): 113–19.
49. Lucy, M.C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reprod Suppl.* 2003; 61: 415–27.
50. Lucy, M.C. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reprod Domest Anim.* 2008; 43(2): 31–39.
51. Lucy, M.C. Growth hormone regulation of follicular growth. *Reprod Fertil Dev.* 2012; 24(1): 19.

52. Mahran, Y.F.; El-Demerdash, E.; Nada, A.S.; El-Naga, R.N.; Ali, A.A.; Abdel-Naim, A.B. Growth hormone ameliorates the radiotherapy-induced ovarian follicular loss in rats: impact on oxidative stress, apoptosis and IGF-1/IGF-1R axis. *PLoS One*. 2015; 10(10): 0140055.
53. Modina, S.; Borromeo, V.; Luciano, A.M.; Lodde, V.; Franciosi, F.; Secchi, C. Relationship between growth hormone concentrations in bovine oocytes and follicular fluid and oocyte developmental competence. *Eur J Histochem*. 2007; 51(3): 173–80.
54. Ortega, H.H., Palomar, M.P.; Acosta, J.C.; et al. Insulin-like growth factor 1 in sera, ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous or induced cystic ovarian disease. *Res Vet Sci*. 2008; 84(3): 419–27.
55. Ortega, H-H; Marelli, B.E.; Rey, F.; et al. Molecular aspects of bovine cystic ovarian disease pathogenesis. *Reproduction*. 2015; 149(6): 251–64.
56. Pascottini, O.B.; Leroy, J.L.; Opsomer, G. Metabolic stress in the transition period of dairy cows: focusing on the prepartum period. *Animals*. 2020; 1(8): 1419.
57. Probo, M.; Comin, A.; Mollo, A.; Cairolì, F.; Stradaoli, G.; Veronesi, M.C. Reproductive performance of dairy cows with luteal or follicular ovarian cysts after treatment with buserelin. *Anim Reprod Sci*. 2011; 127(3–4): 135–39.
58. Regan, S.L.; Knight, P.G.; Yovich, J.L.; Arfuso, F.; Dharmarajan, A. Growth hormone during in vitro fertilization in older women modulates the density of receptors in granulosa cells, with improved pregnancy outcomes. *Fertil Steril*. 2018; 110(7): 1298–1310.
59. Rhoads, M.L.; Meyer, J.P.; Kolath, S.J.; Lamberson, W.R.; Lucy, M.C. Growth Hormone receptor, insulin-like growth factor (igf)-1, and igf-binding protein-2 expression in the reproductive tissues of early postpartum dairy cows. *J Dairy Sci*. 2008; 91 (5): 1802–13.
60. Rodríguez, F.M.; Salvetti, N.R.; Colombero, N.; et al. Interaction between IGF1 and IGF-BPs in bovine cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci*. 2013; 140 (1–2): 14–25.
61. Rodríguez, F.M.; Gareis, N.C.; Hein, G.J.; et al. Role of components of the insulin-like growth factor system in the early stages of ovarian follicular persistence in cattle. *J Comp Pathol*. 2017; 157(2–3): 201–14.
62. Scaramuzzi, R.J.; Campbell, B.K.; Downing, J.A.; et al. A Review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev*. 2006; 46 (4): 339–54.
63. Shimizu, T.; Murayama, C.; Sudo, N.; Kawashima, C.; Tetsuka, M.; Miyamoto, A. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Anim Reprod Sci*. 2008; 106(1–2): 143–52.
64. Silva, J.R.; Figueiredo, J.R.; van den Hurk, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*. 2009; 71 (8): 1193–1208.
65. Silva, P.R.; Weber, W.J. Crooker, B.A.; Collier, R.J.; Thatcher, W.W.; Chebel, R.C. Hepatic mRNA expression for genes related to somatotrophic axis, glucose and lipid metabolisms, and inflammatory response of periparturient dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin. *J Dairy Sci*. 2017; 100(5): 3983–99.
66. Silvia, W.J.; Hatler, T.B.; Nugent, A.M.; Laranja da Fonseca, F.M. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest Anim Endocrinol*. 2002; 23(1–2): 167–77.
67. Sirotkin, A.V.; Makarevich, A.V.; Hetényi, L. Effect of growth hormone and inhibitors of protein kinase a on IGF-I, oxytocin and progesterone release by cultured bovine granulosa cells. *Ann Endocrinol*. 2000; 61(2): 154–58.
68. Vanholder, T.; Leroy, J.L.; Van Soom, A.; et al. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. *Anim Reprod Sci*. 2005; 87(1–2): 33–44.
69. Vélez, E.J.; Unniappan, S. A comparative update on the neuroendocrine regulation of growth hormone in vertebrates. *Front Endocrinol*. 2021; 11: 614981.
70. Waters, M.J.; Brooks, A.J. JAK2 activation by growth hormone and other cytokines. *Biochem J*. 2015; 466 (1): 1–11.
71. Zhang, H.; Liu, K. Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood. *Hum Reprod Update*. 2015; 21 (6): 779–86.
72. Zulu, V.C.; Sawamukai, Y.; Nakada, K.; Kida, K.; Moriyoshi, M. Relationship among insulin-like growth factor-1, blood metabolites and postpartum ovarian function in dairy cows. *J Vet Med Sci*. 2002; 64 (10): 879–85.