



Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Ciencias Veterinarias

Laboratorio 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)

*Tesis presentada para optar por el grado académico de
Doctor en Ciencias Veterinarias*

*“Análisis de los componentes de la cascada inflamatoria asociados con
la ovulación y estudio del estrés como factor etiopatogénico de
alteraciones reproductivas bovinas: rol de las metaloproteasas y
proteínas relacionadas.”*

Autor: MV. Belotti E. Matías
Directora: Dra. Natalia Raquel Salvetti
Codirector: Dr. Hugo Héctor Ortega

La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos. Camino diez pasos y el horizonte se desplaza diez pasos más allá. ¿Entonces para qué sirve la utopía?...

Para eso, sirve para caminar.

De Fernando Birri, adaptado por Eduardo Galeano.

*Dedicado a Ana y Celeste, mis motores del día a día, causas y efectos de todos los
sentimientos y acciones en mi realidad...*

*...y a Evangelina, mi vieja, que con su amor, sabiduría innata y humildad supo
darme las alas para que mi horizonte no tenga fin...*

Agradecimientos

- ✓ A Celeste, por ser mi sostén diario y una compañera invaluable en mi vida...
- ✓ A mis hermanos, Graciela y Marcelo, que me abren su corazón desde ese primer día, y me regalaron a mis sobrinos, otra fuente de alegría de mi alma...
- ✓ A Marta y César, mis viejos... porque a su manera, me acompañan en mis decisiones, dejándome crecer como persona, como hijo y como padre...
- ✓ A mis amigos, todos... los que están en el día a día, los que están a la distancia, y a los que me quedaron de los intercambios también, porque son parte importantísima de lo que hoy soy... y particularmente a Marce... porque no nos pudimos dar ese abrazo de despedida, pero seguramente sabés todo lo que te quiero...
- ✓ A la Dra. Ana María Canal, mi madrina académica, y mis compañeros de la cátedra de Patología Veterinaria, quienes con humildad, cariño, y marcados valores, supieron mostrarme los caminos a la docencia y estimularme para crecer académica, profesional y por sobre todo personalmente...
- ✓ A la Dra. Natalia Salvetti, guía indispensable, tanto en lo académico, como en sus palabras de aliento... aconsejando siempre desde la humildad y espíritu colectivo, con la sonrisa como bandera...
- ✓ Al Dr. Hugo Ortega, por ser eje y sostén de un grupo de trabajo, del cual me siento orgulloso de ser parte. Porque en su frenesí diario, siempre deja abierta la posibilidad al crecimiento personal...
- ✓ A mi amiga Antonela Stassi, por su amistad desinteresada, alegre y sincera; y su contribución indispensable para el desarrollo de este trabajo...
- ✓ Al Dr. Pablo Díaz, porque sus palabras siempre son estímulo, y su amistad un tesoro entrañable...
- ✓ A la Dra. Ayelén Amweg y la Dra. Florencia Rey, quienes desinteresadamente, con humildad y espíritu de equipo, aportaron su conocimiento y trabajo para la culminación de esta tesis...

- ✓ *A todos mis compañeros de trabajo del laboratorio, porque nos aguantamos diariamente con alegría, y vivencias compartidas; y hemos generado un ambiente ameno para construir juntos...*
- ✓ *A Ernesto Quercia, por brindarnos desinteresadamente la posibilidad de desarrollar esta tesis con su aporte material, pero principalmente por brindar su amistad...*
- ✓ *A los laboratorios ELEA, quienes generosamente aportaron insumos para este trabajo...*
- ✓ *A mi querida Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, por brindarme el marco académico para el desarrollo de la presente tesis...*
- ✓ *Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgar la beca que me permitió finalizar los estudios de posgrado en la carrera del doctorado en Ciencias Veterinarias.*
- ✓ *A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por otorgar la beca y los subsidios necesarios para el desarrollo de este trabajo de tesis.*

Índice general

1. Introducción	7
1.1. El ovario bovino	2
1.1.1. Anatomía e histología ovárica	2
1.1.2. Foliculogénesis y clasificación folicular	3
1.1.3. Ciclo estral del bovino	5
1.1.3.1. Regulación endocrina del ciclo estral	6
1.1.3.2. Dinámica folicular durante el ciclo estral	9
1.1.3.3. Función del cuerpo lúteo durante el ciclo estral	12
1.1.3.4. La ovulación	13
1.2. Estrés	15
1.2.1. Fisiología del estrés	15
1.2.2. El estrés en la reproducción	16
1.3. Matriz extracelular: el rol de las MMPs y TIMPs en el ovario	19
1.3.1. La matriz extracelular y el ovario.	19
1.3.2. Metaloproteasas de matriz y sus inhibidores tisulares	20
1.3.2.1. Colagenasas	22
1.3.2.2. Gelatinasas	23
1.3.2.3. Metaloproteasa de transmembrana 1	23
1.3.2.4. Inhibidores tisulares de las metaloproteasas	24
1.4. Citoquinas en el proceso ovulatorio: Interleuquina 1 (L-1) e Interleuquina 4 (IL-4)	25
1.4.1. Interleuquina 1 β	27
1.4.2. Interleuquina 4	27
1.5. Enfermedad quística ovárica	28
1.5.1. Definición	28
1.5.2. Factores predisponentes	29
1.5.3. Etiopatogenia	30
1.5.3.1. Disfunción hipotálamo-hipofisaria	30
1.5.3.2. Disfunción ovárica	32
2. Objetivos	36
2.1. Objetivo general:	37
2.2. Objetivos específicos:	37
3. Materiales y Métodos	38
3.1. Procedimientos generales efectuados con animales	39
3.1.1. COD espontánea	39
3.1.2. Modelo experimental de inducción de estrés mediante la administración de ACTH.	40
3.2. Técnicas utilizadas para la obtención de muestras <i>in vivo</i>	42
3.2.1. Aspiración de líquido folicular guiada por ecografía	42

3.2.2. Ovariectomía bilateral	43
3.2.2.1 Técnica por colpotomía (transvaginal)	43
3.2.2.2. Técnica de laparotomía por flanco izquierdo	45
3.2.3. Obtención de muestras de sangre	45
3.2.4. Recolección y preparación de muestras de tejido ovárico	46
3.3. Evaluación <i>in vitro</i> mediante cultivos de pared folicular completa	47
3.4. Procesamiento de las muestras	48
3.4.1. Procesamiento del líquido folicular rico en células de la granulosa	49
3.4.2. Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas	49
3.4.3. Procesamiento de las muestras para la técnica de western blot	50
3.4.4. Procesamiento de las muestras para reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)	50
3.4.4.1. Purificación de ARN	50
3.4.4.2. Transcripción reversa	51
3.5. Cuantificación de hormonas en suero y líquido folicular	51
3.6. Detección y cuantificación de metaloproteasas y sus inhibidores tisulares	52
3.6.1. Inmunohistoquímica simple	52
3.6.2. Western blot	55
3.6.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	57
3.6.4. Análisis de la expresión de ARNm de MMP2, MMP9, TIMP1 y TIMP2	58
3.6.4.1. Diseño de cebadores específicos, clasificación de las muestras y validación de las condiciones de la PCR en tiempo real	58
3.6.4.2. PCR en tiempo real	59
3.6.4.3. Secuenciación de nucleótidos	60
3.6.5. Determinación de la actividad de MMP2 y MMP9 por zimografía de gelatina	60
3.7. Análisis digital de imágenes	61
3.8. Evaluación estadística	62
4. Resultados	63
4.1. Resultados de los procedimientos con animales	64
4.1.1. Desarrollo, seguimiento y caracterización del modelo de inducción de estrés mediante aplicaciones repetidas de ACTH	64
4.1.2. Efectos de las dosis de ACTH sobre la concentración de hormonas esteroides.	65
4.1.3. Diagnóstico, seguimiento y caracterización de COD espontánea	68
4.2. Localización, actividad y expresión de MMPs y TIMPs en COD	69
4.2.1. MMP2	70
4.2.1.1. Expresión génica de MMP2	70
4.2.1.2. Expresión proteica y localización de MMP2 en COD	70
4.2.1.3. Actividad enzimática de MMP2 en el líquido folicular en COD	71
4.2.2. MMP9	72
4.2.2.1. Expresión génica de MMP9	72
4.2.2.2. Expresión proteica de MMP9 en COD	72
4.2.2.3. Actividad enzimática de MMP9 en el líquido folicular en COD	73
4.2.3. TIMP1	74
4.2.3.1. Expresión génica de TIMP1	74

4.2.3.2. Expresión proteica y localización de TIMP1 en COD _____	74
4.2.4. TIMP2 _____	75
4.2.4.1. Expresión génica de TIMP2 _____	75
4.2.4.2. Expresión proteica y localización de TIMP2 _____	76
4.3. Localización, actividad y expresión de MMPs y TIMPs en el modelo de inducción de estrés mediante administración de ACTH. _____	77
4.3.1. MMP2 _____	78
4.3.1.1. Actividad enzimática de MMP2 en el líquido folicular obtenidos de los grupos correspondientes al modelo de ACTH _____	78
4.3.1.2. Expresión proteica y localización de MMP2 en el modelo de ACTH _____	78
4.3.2. MMP9 _____	82
4.3.2.1. Actividad enzimática de MMP9 en el líquido folicular. _____	82
4.3.2.2. Expresión proteica y localización de MMP9. _____	82
4.3.3. Expresión proteica y localización de MMP14 _____	86
4.3.4. Expresión proteica y localización de TIMP1 _____	89
4.3.5. Expresión proteica y localización de TIMP2. _____	92
4.4. Evaluación de citoquinas en suero y LF proveniente de animales pertenecientes al modelo experimental de ACTH. _____	96
4.4.1. Concentración de IL-4 en líquido folicular y suero _____	96
4.4.2. Concentración de IL-1 β en líquido folicular y suero _____	96
4.5. Evaluación de MMP2 y MMP9 en cultivos de pared folicular _____	97
4.5.1. Expresión génica de MMP2 en el modelo con ACTH in vitro _____	97
4.5.2. Expresión génica de MMP9 en el modelo con ACTH in vitro _____	98
5. <i>Discusión</i> _____	99
5.1. Modelo de inducción de estrés mediante administración de ACTH en el periodo preovulatorio y su relación con la enfermedad quística ovárica. _____	100
5.2. MMP2 y MMP9 en el Modelo Experimental de inducción de estrés mediante ACTH y COD. _____	105
5.3. MMP14 y TIMPs en el Modelo Experimental de inducción de estrés mediante ACTH y COD. _____	110
6. <i>Conclusiones</i> _____	118
7. <i>Bibliografía</i> _____	122

Abreviaturas

11 β HSD:	11 β -hidroxiesteroide-dehidrogenasa
ACTH:	Hormona adrenocorticotrófica/adrenocorticotrofina
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AGNE:	Ácidos grasos no esterificados
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
BEN:	Balance energético negativo
BSA:	Albúmina de suero bovino
CC:	Condición corporal
CL:	Cuerpo lúteo
COD:	Enfermedad quística ovárica
CRH:	Hormona liberadora de corticotrofina
CSF:	Factor estimulante de colonias
Ct:	Ciclo threshold
CYP19A1:	Enzima citocromo p450 aromatasa
CYP17A1:	Enzima citocromo p450c17
DE:	Desvío estándar
DEL:	Días en lactancia
E2:	Estrógenos
eCG:	Gonadotrofina coriónica equina
ESR:	Receptor de estrógenos
FD:	Folículo dominante
FSH:	Hormona folículo-estimulante
FSHR:	Receptor de FSH
GC:	Glucocorticoides
GnRH:	Hormona liberadora de gonadotrofinas
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
hCG:	Gonadotrofina coriónica humana
HHA:	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
HHO:	Eje hipotálamo-hipófisis-ovario

IGF-1:	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
IL:	Interleuquina
LH:	Hormona luteotrópica
LHR:	Receptor de LH
LHCGR:	Receptor de hormona luteinizante/coriogonadotrofina
MAPK:	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCR:	Receptor de melanocortinas
MEC:	Matriz extracelular
MHz:	Mega Hertz
MMP:	Metaloproteasa de matriz
MSH:	Hormona estimulante de los melanocitos
MT-MMP:	Metaloproteasa de matriz de transmembrana
O ₂ :	Oxígeno
OH:	Hidroxilo
P ₄ :	Progesterona
PA:	Activador del plasminógeno
PBS:	Buffer salino de fosfato
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PGE ₂ :	Prostaglandina E 2
PGF ₂ α :	Prostaglandina-F-2-alfa
PCOS:	síndrome de ovario poliquístico
POMC:	Proopiomelanocortina
ROS:	Especies de oxígeno reactivo
RNS:	Especies de nitrógeno reactivo
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
TBS:	Buffer salino tris
TGF- β :	Factor de crecimiento transformante Beta
TNF:	Factor de necrosis tumoral
TIMP:	Inhibidor tisular de metaloproteasas de matriz
US:	Ultrasonido

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación morfológica de folículos ováricos empleada para bovinos (Adaptado de Braw-Tal y Yossefi, 1997; Aerts y Bols, 2010) _____ 5

Tabla 2. Detalle de los anticuerpos primarios utilizados, y las condiciones de uso en la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) y western blot (WB). _____ 54

Tabla 3. Detalle de los anticuerpos secundarios utilizados en las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y western blot (WB). _____ 55

Tabla 4. Pares de primers usados para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Ta: Temperatura de anealing. Pb: pares de bases. _____ 60

Índice de figuras

- Figura 1.** Anatomía del ovario bovino. El ovario se compone de dos zonas: región medular (1) (abarca la región central del ovario y se forma de tejido conectivo, vasos y fibras nerviosas) y la región cortical (2) que contiene folículos (3) en diferentes estadios, cuerpos lúteos (4) y el estroma ovario. Modificado de Fernández Sánchez, 2008.....**Página 3**
- Figura 2.** Clasificación folicular. Células y componentes de los diferentes estadios foliculares. *ZP*: Zona pelúcida. Adaptado de Ross y col., 2004.....**Página 4**
- Figura 3.** Diagrama del ciclo estral bovino mostrando los niveles hormonales en cada una de las etapas de las fases folicular y luteal (Adaptado de Gasque Gómez, R. 2008 Enciclopedia bovina. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. UNAM).....**Página 6**
- Figura 4.** Esquema de los principales mecanismos de regulación endócrina del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. *GnRH*: Hormona liberadora de gonadotrofinas; *P4*: Progesterona; *E2*: Estrógenos; *FSH*: Hormona folículo-estimulante; *LH*: Hormona luteinizante.....**Página 8**
- Figura 5.** Esquema de las concentraciones hormonales y la dinámica de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. *FSH*: hormona folículo-estimulante. *LH*: hormona luteinizante. *PGF2 α* : prostaglandina F2 α . *FD*: folículo dominante. *FA*: folículo atrésico. (Adaptado de Rippe, 2009).....**Página 12**
- Figura 6.** Esquema de la regulación endócrina del estrés en el eje Hipotálamo-hipófisis-adrenal y su relación con el ovario. *CRH*: Corticotrofina; *ACTH*: Adrenocorticotrofina; *MCRs*: Receptor de melanocortinas.....**Página 17**

- Figura 7.** Esquema de los componentes de la matriz extracelular de los mamíferos. *HSPGs*: Proteoglicanos tipo Heparán Sulfato. *PGs*: Proteoglicanos. *GAGs*: Glucosaminoglicanos. (Adaptado de Bonnans y cols., 2014).....**Página 20**
- Figura 8.** Representación esquemática de la implicancia de citoquinas a lo largo de la foliculogénesis. Interacciones y localizaciones basadas en foliculogénesis humana, con inferencias a partir de modelos animales. Las capas celulares se separan y reducen para mayor claridad. *O*: ovocito; *PG*: células pre-granulosa; *G*: células de la granulosa; *PT*: células pre-teca; *T*: células de la teca. Las flechas negras indican sitios de producción de citoquinas; Las flechas rojas sólidas indican interacciones positivas mientras que las flechas azules interacciones negativas. Las flechas punteadas indican interacciones presumidas; aquellas alineadas indican sinergismo potencial. Las citoquinas modulan la foliculogénesis en todas las etapas, aumentando el número de citoquinas conocidas hacia la ovulación. Destacadas con óvalos verdes las estudiadas en este trabajo (Adaptado de Field y col., 2014).....**Página 26**
- Figura 9.** Diagnóstico ecográfico de COD. A: ovario con un quiste folicular, B: ovario contralateral con escaso desarrollo folicular. En ambos ovarios no se detecta la presencia de cuerpo lúteo (en la imagen se aprecia la grilla de medición), C: cuerno uterino con ausencia de tono a la palpación transrectal.....**Página 39**
- Figura 10.** Protocolo de inducción de estrés mediante administración de adrenocorticotrofina (*ACTH*). Se indican tratamientos hormonales, seguimiento con ultrasonografía (*US*), momentos de muestreo de sangre (*MS*), y de la ovariectomía biletaral. *SF*: Solución fisiológica.....**Página 42**
- Figura 11.** Técnica de aspirado folicular guiado por ecografía. A: Anestesia epidural; B: Ecógrafo y sonda transvaginal; C: Bomba de aspiración; D: Momento del aspirado; E: Tubo colector falcón con líquido folicular luego de la extracción.....**Página 43**
- Figura 12.** Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje transvaginal.....**Página 44**
- Figura 13.** Técnica de ovariectomía bilateral por laparotomía por flanco izquierdo. A y B: equipo de trabajo. C y D: animales dados de alta post-quirúrgico.....**Página 45**

- Figura 14.** Extracciones de sangre por punción de los vasos coccígeos.....**Página 46**
- Figura 15.** Ovarios provenientes de playa de faena. Ovarios sanos con folículos terciarios grandes y sin CL activo.....**Página 47**
- Figura 16.** Esquema de la procedencia y destino de las muestras obtenidas.....**Página 49**
- Figura 17.** Marcadores de peso molecular para SDS-PAGE, amplio espectro (Rainbow™, RPN800E, GE Healthcare).....**Página 56**
- Figura 18.** Imágenes del seguimiento Ultrasonográfico en el período de aplicaciones de ACTH. *OI*: Ovario Izquierdo; *OD*: Ovario derecho; *FD*: Folículo dominante; *FP*: Folículo preovulatorio; *CL*: Cuerpo lúteo; *CLr*: Cuerpo lúteo en regresión.....**Página 65**
- Figura 19.** Medición de hormonas esteroideas en el grupo control (barras blancas) y en respuesta a las dosis de ACTH (barras negras) al momento de la ovariectomía. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....**Página 67**
- Figura 20.** Niveles séricos diarios de hormonas esteroideas en los animales del modelo de ACTH, en relación al momento previo al tratamiento con ACTH (Basal: previo al inicio de la administración de ACTH). Test estadístico de Dunnet. Los valores representan la media \pm DE ($p < 0,05$). El asterisco muestra diferencias en relación al basal.....**Página 68**
- Figura 21.** Izquierda: Quiste folicular obtenido por ovariectomía. Centro: Imagen ultrasonográfica de un quiste folicular. Derecha: Imagen microscópica de la pared de un quiste, tinción de Hematoxilina-Eosina (40x).....**Página 69**
- Figura 22.** Niveles de expresión relativa de ARNm correspondiente a **MMP2** en folículos preovulatorios de animales control y quistes foliculares de animales con COD espontánea. Los valores representan la media \pm DS. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....**Página 70**
- Figura 23.** Imágenes representativas de la inmunomarcación de **MMP2** en células de la granulosa (G) y de la teca interna (T) de folículos antrales de vacas controles (A) y quistes espontáneos de vacas con COD (B). Aumento: 40X.....**Página 71**

- Figura 24.** Niveles de expresión relativa de proteína (medida como porcentaje del área inmunopositiva) de **MMP2** en células de la granulosa y de la teca de animales controles (barras negras) y con COD espontánea (barras azules). Los valores representan la media \pm DE.....**Página 71**
- Figura 25.** Análisis zimográfico para **MMP2**. Izquierda: Imagen representativa de zimografía en gel para la detección de la actividad enzimática de **MMP2**. Derecha: Actividad de **MMP2** en líquido folicular de folículos preovulatorios de los grupos Control y COD, representados como un porcentaje del control utilizado en la zimografía en gelatina. Los valores representan la media \pm el DS. Las letras diferentes representan diferencia significativa ($p < 0,05$).....**Página 71**
- Figura 26.** Imágenes representativas de la inmunomarcación de **MMP9** en células de la granulosa (G) y de la teca interna (T) de folículos antrales de vacas controles (A) y quistes espontáneos de vacas con COD (B). Aumento: 40X.....**Página 73**
- Figura 27.** Niveles de expresión relativa de proteína (medida como porcentaje del área inmunopositiva) de **MMP9** en células de la granulosa y de la teca de animales controles (barras negras) y con COD espontánea (barras moradas). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).....**Página 73**
- Figura 28.** Análisis zimográfico para **MMP9**. *Izquierda:* Imagen representativa de zimografía en gel para la detección de la actividad enzimática de **MMP9**. *Derecha:* Actividad de **MMP9** en líquido folicular de folículos preovulatorios controles y quistes espontáneos de COD. Media \pm el DE. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....**Página 73**
- Figura 29.** Niveles de expresión relativa de ARNm correspondiente a **TIMP1** en folículos preovulatorios de animales control y quistes foliculares de animales con COD espontánea. Los valores representan la media \pm DS. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....**Página 74**
- Figura 30.** Imágenes representativas de la inmunomarcación de **TIMP1** en células de la granulosa (G) y de la teca interna (T) de folículos antrales de vacas controles (A) y quistes espontáneos de vacas con COD (B). Aumento: 40X.....**Página 75**

- Figura 31.** Niveles de expresión relativa de proteína (medida como porcentaje del área inmunopositiva) de **TIMP1** en células de la granulosa y de la teca de animales controles (barras negras) y con COD espontánea (barras verdes). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p>0,05$).....**Página 75**
- Figura 32.** Niveles de expresión relativa de ARNm correspondiente a **TIMP2** en folículos preovulatorios de animales control y quistes foliculares de animales con COD espontánea. Los valores representan la media \pm DS. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p<0,05$).....**Página 76**
- Figura 33.** Imágenes representativas de la inmunomarcación de **TIMP2** en células de la granulosa (G) y de la teca interna (T) de folículos antrales de vacas controles (A) y quistes espontáneos de vacas con COD (B). Aumento: 40X.....**Página 77**
- Figura 34.** Niveles de expresión relativa de proteína (medida como porcentaje del área inmunopositiva) de **TIMP2** en células de la granulosa y de la teca de animales controles (barras negras) y con COD espontánea (barras verdes). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p<0,05$).....**Página 77**
- Figura 35.** Análisis zimográfico para **MMP2**. *Izquierda:* Imagen representativa de zimografía en gel para la detección de la actividad enzimática de **MMP2**. *Derecha:* Actividad de **MMP2** en líquido folicular de folículos preovulatorios de los grupos Control y ACTH, representados como un porcentaje del control utilizado en la zimografía en gelatina. Los valores representan la media \pm el DS. Las letras diferentes representan diferencia significativa ($p<0,05$).....**Página 78**
- Figura 36.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP2** en el grupo control del modelo experimental. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p<0,05$).....**Página 79**
- Figura 37.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP2** en el grupo tratado con ACTH del modelo experimental. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías

foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....**Página 79**

Figura 38. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP2** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría de ($p < 0,05$).....**Página 80**

Figura 39. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP2** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números indican diferencias significativas dentro de la misma categoría de ($p < 0,05$).....**Página 81**

Figura 40. Diferentes estructuras foliculares pequeñas del ovario, inmunomarcadas para **MMP2** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna. A: En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de **MMP2** (63 kDa).....**Página 81**

Figura 41. Diferentes estructuras foliculares grandes del ovario, inmunomarcadas para **MMP2** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna.....**Página 82**

Figura 42. Análisis zimográfico para **MMP9**. Imagen representativa de zimografía en gel para la detección de la actividad enzimática de **MMP9**.....**Página 82**

Figura 43. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP9** en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....**Página 83**

- Figura 44.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP9** en el grupo tratado con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....**Página 84**
- Figura 45.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP9** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).....**Página 84**
- Figura 46.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP9** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).....**Página 85**
- Figura 47.** Diferentes estructuras foliculares pequeñas del ovario, inmunomarcadas para **MMP9** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna. A: En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de **MMP9** (92 kDa)**Página 85**
- Figura 48.** Diferentes estructuras foliculares grandes del ovario, inmunomarcadas para **MMP9** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna.....**Página 86**
- Figura 49.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP14** en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).....**Página 86**
- Figura 50.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP14** en el grupo tratado con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).....**Página 87**

- Figura 51.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP14** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p>0,05$)..... **Página 87**
- Figura 52.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP14** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p>0,05$). **Página 88**
- Figura 53.** Diferentes estructuras foliculares pequeñas del ovario, inmunomarcadas para **MMP14** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna. A: En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de MMP14 (63 kDa). **Página 88**
- Figura 54.** Diferentes estructuras foliculares grandes del ovario, inmunomarcadas para **MMP14** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna..... **Página 89**
- Figura 55.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TIMP1** en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p<0,05$)..... **Página 89**
- Figura 56.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TIMP1** en el grupo tratado con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p<0,05$). **Página 90**
- Figura 57.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TIMP1** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los

valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p>0,05$)..... **Página 90**

Figura 58. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TIMP1** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p>0,05$)..... **Página 91**

Figura 59. Diferentes estructuras foliculares pequeñas del ovario, inmunomarcadas para **TIMP1** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna. A: En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de **TIMP1** (23 kDa).
..... **Página 91**

Figura 60. Diferentes estructuras foliculares grandes del ovario, inmunomarcadas para **TIMP1** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna..... **Página 92**

Figura 61. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TIMP2** en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p<0,05$)..... **Página 93**

Figura 62. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TIMP2** en el grupo tratado con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p<0,05$)..... **Página 93**

Figura 63. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TIMP2** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p>0,05$)..... **Página 94**

- Figura 64.** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TIMP2** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p>0,05$)..... **Página 94**
- Figura 65.** Diferentes estructuras foliculares pequeñas del ovario, inmunomarcadas para **TIMP2** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna. A: En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de **TIMP2** (24 kDa).
..... **Página 95**
- Figura 66.** Diferentes estructuras foliculares grandes del ovario, inmunomarcadas para **TIMP2** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna..... **Página 95**
- Figura 67.** Concentración de **IL-4** en líquido folicular y en suero de animales control y tratados con ACTH. Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p>0,05$)..... **Página 96**
- Figura 68.** Concentración de **IL-1 β** en líquido folicular y en suero de animales control y tratados con ACTH. Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p>0,05$)..... **Página 97**
- Figura 69.** Expresión relativa de ARNm de **MMP2** determinado por PCR en tiempo real en células foliculares de cultivos celulares de pared completa de ovarios provenientes de frigorífico con estímulo de ACTH (Grupo ACTH: barra azul) y sin estímulo (Grupo Basal: barra negra). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p>0,05$)..... **Página 98**

Resumen

La enfermedad quística ovárica (COD) es una enfermedad caracterizada por una falla en la ovulación, anestro y persistencia folicular. Es una causa importante de infertilidad en bovinos, y por lo tanto una causa de pérdidas económicas para la industria lechera. El estrés es uno de los principales factores que influyen en su presentación, mediando su acción a través del cortisol, principal hormona relacionada al estrés. El objetivo de esta tesis fue caracterizar al estrés como uno de los principales factores etiopatogénicos de COD y la implicancia de las metaloproteasas (MMPs), sus inhibidores tisulares (TIMPs) y las interleuquinas 1 β y 4, en la cascada inflamatoria de la ovulación. Se utilizaron muestras de animales con COD espontánea, controles preovulatorios, ovarios de frigorífico y se desarrolló un modelo experimental de inducción de estrés mediante administraciones repetidas de adrenocorticotrofina (ACTH) exógena, en el proestro y estro. El modelo experimental resultó apropiado para estudiar las etapas previas a la formación de los quistes foliculares. Se demostró el aumento de cortisol en los animales tratados con ACTH, así como niveles subluteales de progesterona (P4), suficientes como para inhibir posteriormente la ovulación. Se evaluó la actividad de gelatinasas de MMP 2 y 9, donde se observó un incremento de las mismas en el líquido folicular de COD y folículos preovulatorios del modelo experimental. Las metaloproteasas estudiadas (MMP2, MMP9, MMP14), y sus inhibidores tisulares (TIMP1 y TIMP2), se encontraron alterados, en sus expresiones génicas, protéicas como en su actividad enzimática, en el modelo experimental y en COD. Los resultados obtenidos permiten suponer la alteración de los mecanismos reguladores fisiológicos, tanto en COD, como en el modelo experimental, posiblemente relacionados con los cambios en las hormonas esteroideas. Este desequilibrio en la expresión de factores locales puede cumplir un rol crucial en la etiopatogenia de COD, alterando sistémica y localmente el equilibrio del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Estos datos aportan nuevos conocimientos para dilucidar la etiopatogenia de COD, así como herramientas para una mejor comprensión de la enfermedad en los momentos previos a sus inicios, mejorando así las posibilidades de diagnóstico, tratamiento y consecuentemente la eficiencia reproductiva de los rodeos.

Abstract

Cystic ovarian disease (COD) is a disease characterized by follicular failure in ovulation, anestrus, and follicular persistence. It is an important cause of infertility in cattle, and therefore a cause of economic losses for the dairy industry. Stress is one of the principal factors that influence COD presentation, mediating its action through cortisol, the main hormone related to stress. The aim of this thesis was to characterize stress as the main etiopathogenic factor of COD and the implication of metalloproteases (MMPs), their tissue inhibitors (TIMPs) and interleukins 1 and 4, in the ovulation inflammatory process. Were used samples from animals with spontaneous COD, preovulatory controls, abattoir ovaries and from an experimental stress induction model that was developed by repeated administrations of exogenous adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in proestrus and estrus. The experimental model was appropriate to study early stages, prior to the formation of follicular cysts. An increase in cortisol was demonstrated in animals treated with ACTH, as well as subluteal levels of progesterone (P4), sufficient to subsequently inhibition of ovulation. The gelatinase activity of MMP 2 and 9 were increased in the follicular fluid of COD and preovulatory follicles of the experimental model. Metalloproteases studied (MMP2, MMP9, MMP14), and their tissue inhibitors (TIMP1 and TIMP2), were altered on their genic and proteic expression, and its enzymatic activity, in the experimental model and in COD. Results allow supposing the alteration of the physiological regulatory mechanisms, both in COD, as in experimental model, probably related to steroid hormones changes. Imbalance in local factors expression can play a crucial role in COD etiopathogenesis, systemic and locally, altering the hypothalamic-pituitary-ovary axis balance. These data provide new knowledge to elucidate COD etiopathogenesis, as well as tools for a better understanding of the disease in the moments before its inception, thus improving the possibilities of diagnosis, treatment and consequently the reproductive efficiency of herds.

1. Introducción

1.1.El ovario bovino

1.1.1. Anatomía e histología ovárica

En el bovino, el ovario está constituido por una médula interna y una corteza externa, rodeada por un epitelio cuboidal superficial (epitelio germinativo) el cual se encuentra ubicado por encima de una capa densa de tejido conectivo, llamada túnica albugínea. A diferencia del testículo, el ovario permanece en la cavidad abdominal. La forma y el tamaño ovárico varía con la especie y la etapa del ciclo estral. En los bovinos y ovinos, tienen forma de almendra (Hafez y Hafez, 2002). En la vaca son pequeños, miden normalmente de 3,5 a 4 cm de longitud, 2,5 cm de ancho y tienen alrededor de 1,5 de grueso en su porción mayor; el peso es de unos 15 a 20 g. (Sisson y Grossman, 1982). Es un órgano de consistencia firme, de forma irregular (Dyce y col., 1999). Durante el desarrollo embrionario, los ovarios migran hasta alcanzar la pared abdominal ventral, en posición craneal con respecto al pecten del hueso pubis (König y Liebich, 2005). Usualmente, están situados cerca de la mitad del borde lateral de la entrada pelviana, craneal a la arteria ilíaca externa en las hembras no preñadas, pero pueden estar más craneales, en especial en las hembras preñadas (Sisson y Grossman, 1982). La porción medular o central (zona vascular) del ovario es la más vascularizada, en contraste con la corteza (zona parenquimatosa), donde abunda el tejido conectivo denso e irregular y están repartidas células epiteliales emigradas desde la superficie. La capa más externa de la corteza es una capa de tejido conectivo, que toma el nombre de túnica albugínea (Frandsen y col, 2003). La médula es el área compuesta principalmente por tejido conectivo en la que se encuentran gran cantidad de fibras nerviosas, vasos sanguíneos y linfáticos, así como también los componentes de la *rete ovarii*. Por su parte, la corteza contiene folículos en distintos estadios de desarrollo, cuerpos hemorrágicos, cuerpos lúteos y cuerpos albicans (cuerpos blancos) inmersos en una malla de tejido conectivo muy celular que da sostén y es el origen de varios componentes de los folículos (células tecales) y posteriores cuerpos lúteos (células luteínicas pequeñas) (Dellmann, 1994) (Figura 1).

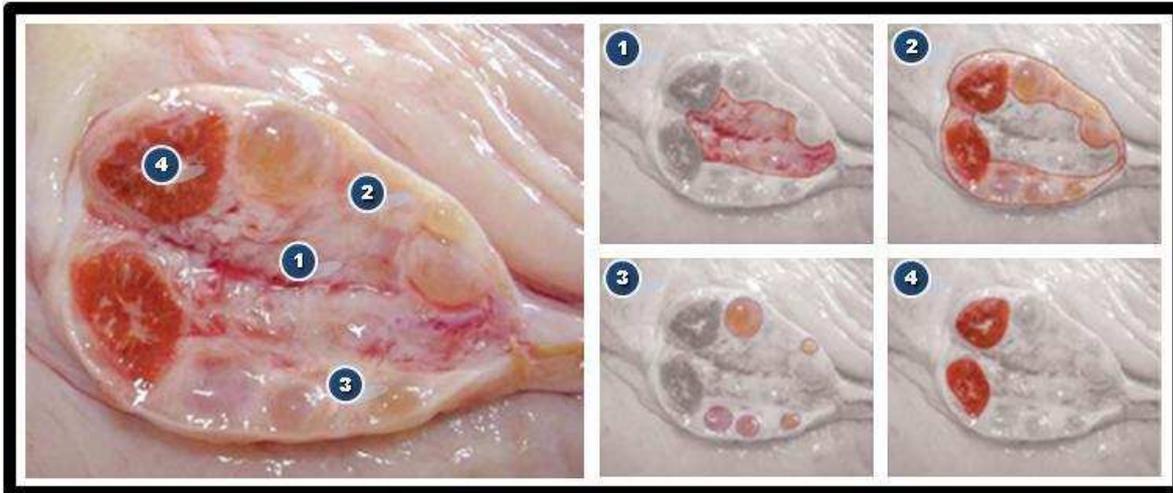


Figura 1. Anatomía del ovario bovino. El ovario se compone de dos zonas: región medular (1) (abarca la región central del ovario y se forma de tejido conectivo, vasos y fibras nerviosas) y la región cortical (2) que contiene folículos (3) en diferentes estadios, cuerpos lúteos (4) y el estroma ovario.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

1.1.2. Foliculogénesis y clasificación folicular

La configuración de los folículos primordiales comienza con un ovocito rodeado, en forma incompleta, de células planas (escamosas) llamadas pre-granulosas o células foliculares. Los mismos, constituyen el reservorio de folículos “en reposo”, los cuales se agotan progresivamente a lo largo de la vida fértil de la hembra (Dellman y Priedkalns, 1993; Nilsson y Skinner, 2001). Cuando algunos de estos folículos primordiales salen de la reserva e inician su maduración, sus células foliculares se transforman de un epitelio plano simple a uno cúbico, dando lugar a los denominados folículos primarios (Dellman y Priedkalns, 1993). Una clasificación específica para la especie bovina fue realizada por Braw-Tal y Yossefi (1997) (Figura 2). En ésta, los folículos primordiales (tipo I) están caracterizados por un ovocito quiescente, detenido en profase I de la meiosis, y rodeado por un número limitado (<10) de células de la granulosa planas. Estos folículos primordiales constituyen las reservas ováricas, a partir de las cuales los folículos son reclutados para su posterior desarrollo. En una primera fase de crecimiento, las células de la granulosa sufren una transformación y pasan de ser células planas a ser células cúbicas y su número se incrementa. Primeramente se forma una categoría folicular intermedia llamada folículo de transición (tipo I+) en donde se pueden observar una mezcla de células de la granulosa planas y cúbicas rodeando al ovocito. Un folículo primario (tipo II) está caracterizado por una capa completa o una capa y media de células de la granulosa cúbicas, rodeada por una lámina basal. En una segunda fase de crecimiento la capa de células de la granulosa continúa creciendo. Cuando éstas llegan a ser aproximadamente 40, se evidencia el inicio del crecimiento del ovocito por un rápido aumento de su

diámetro. El crecimiento del ovocito también induce la formación de la zona pelúcida, siendo esta capa parcialmente formada en los folículos preantrales pequeños (tipo III), y completa en los folículos preantrales grandes (tipo IV) (Braw-Tal y Yossefi, 1997). Del estroma intersticial se derivan células de la teca que están presentes como células individuales en la lámina basal de los folículos primarios (Hirshfield, 1991). Las primeras células de la teca interna se pueden identificar en folículos pre-antrales pequeños (tipo III), pero no se distingue claramente la teca interna hasta que no se desarrolla el estado de pre-antral grande (tipo IV). La capa externa de la teca es densamente vascularizada, y es, por lo tanto, capaz de proporcionar al folículo diversos factores endocrinos.

La formación del antro empieza cuando los folículos alcanzan más de 250 células de la granulosa. Inicialmente, varios parches llenos de líquido aparecen en las células de la granulosa, cuando estos se unen en una sola cavidad del folículo se denomina antral (tipo V) o también llamados folículos de De Graaf, en los que el ovocito ocupa una posición excéntrica rodeado de dos o tres capas de células granulosa, que componen el denominado cúmulo ovífero (Dellmann y Eurell, 1998) (Tabla 1).

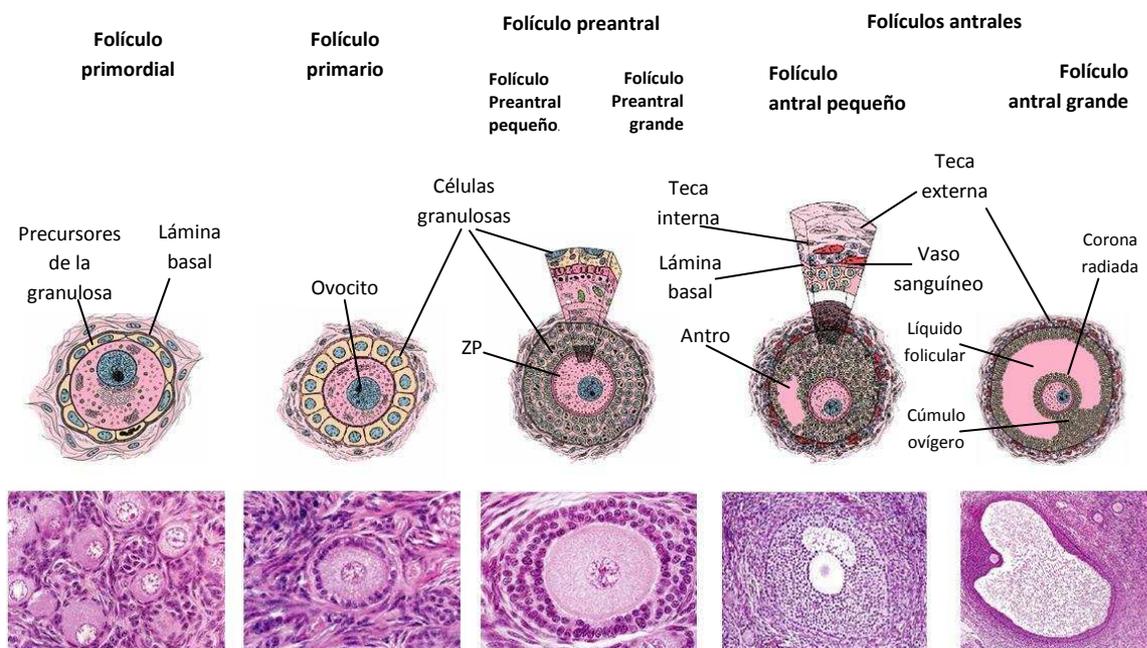


Figura 2. Clasificación folicular. Células y componentes de los diferentes estadios foliculares. ZP: Zona pelúcida. Adaptado de Ross y col., 2004.

	Capas de Granulosa	N° de Cél. De la granulosa	Diámetro Folicular (μm)	Diámetro del ovocito (μm)	Presencia de Zona Pelúcida	Teca interna bien definida	Presencia de antro Folicular
Primordial (Tipo 1)	1	<10 (aplanadas)	40	29-31	-	-	-
Primario (Tipo 2)	1-1,5	10-40 (cúbicas)	40-80	31	-	-	-
Preantral Pequeño (Tipo 3)	2-3	41-100	81-130	49	-	-	-
Preantral Grande (Tipo 4)	4-6	101-250	131-250	66-70	+	+	-
Antral (Tipo 5)	>6	>250	>250	>88	++	++	+

Tabla 1. Clasificación morfológica de folículos ováricos empleada para bovinos (Adaptado de Braw-Tal y Yossefi, 1997; Aerts y Bols, 2010)

1.1.3. Ciclo estral del bovino

Los fisiólogos clásicos, por tradición, han tratado de discernir principios que gobiernen el estado estable o de homeostasis. La característica más notable del aparato reproductor femenino es la falta total de un estado estable. En virtud de su estado funcional siempre cambiante, el aparato reproductor de la hembra constituye claramente el ejemplo principal de un sistema dinámico (McDonald, 1975). El ciclo estral representa el patrón cíclico de la actividad ovárica que lleva a las hembras bovinas a pasar de un periodo no receptivo a uno de receptividad que finalmente permite el apareamiento y el subsecuente establecimiento de la preñez. El comienzo de los ciclos estrales ocurre en el momento de la pubertad. En vaquillonas ocurre entre los 6-12 meses de edad, dependiendo de la raza y generalmente a un peso de 200-250 kg en la raza Holando Argentina. La duración normal de un ciclo estral en vacas es de 18-24 días. El ciclo consiste en dos fases: la fase lútea (14-18 días) y la fase folicular (4-6 días). La fase lútea es el período que sigue a la ovulación y es donde se presenta un cuerpo lúteo (CL) estructural y funcionalmente completo, mientras la fase folicular es el período que sigue a la lisis del CL (luteólisis) hasta la ovulación. Durante la fase folicular ocurre la maduración final y la ovulación del folículo preovulatorio. Estas fases con frecuencia son llamadas estro (etapa donde se produce el comportamiento estral), metaestro (etapa donde se produce la ovulación), diestro (etapa donde el CL es funcionalmente competente) y proestro (etapa donde se da el crecimiento final del folículo preovulatorio) (Forde y col., 2011) (Figura 3).

1.1.3.1. Regulación endocrina del ciclo estral

Las vacas son animales poliéstricos continuos y muestran comportamiento de celo aproximadamente cada 21 días. Resumidamente, el ciclo es regulado por las hormonas del

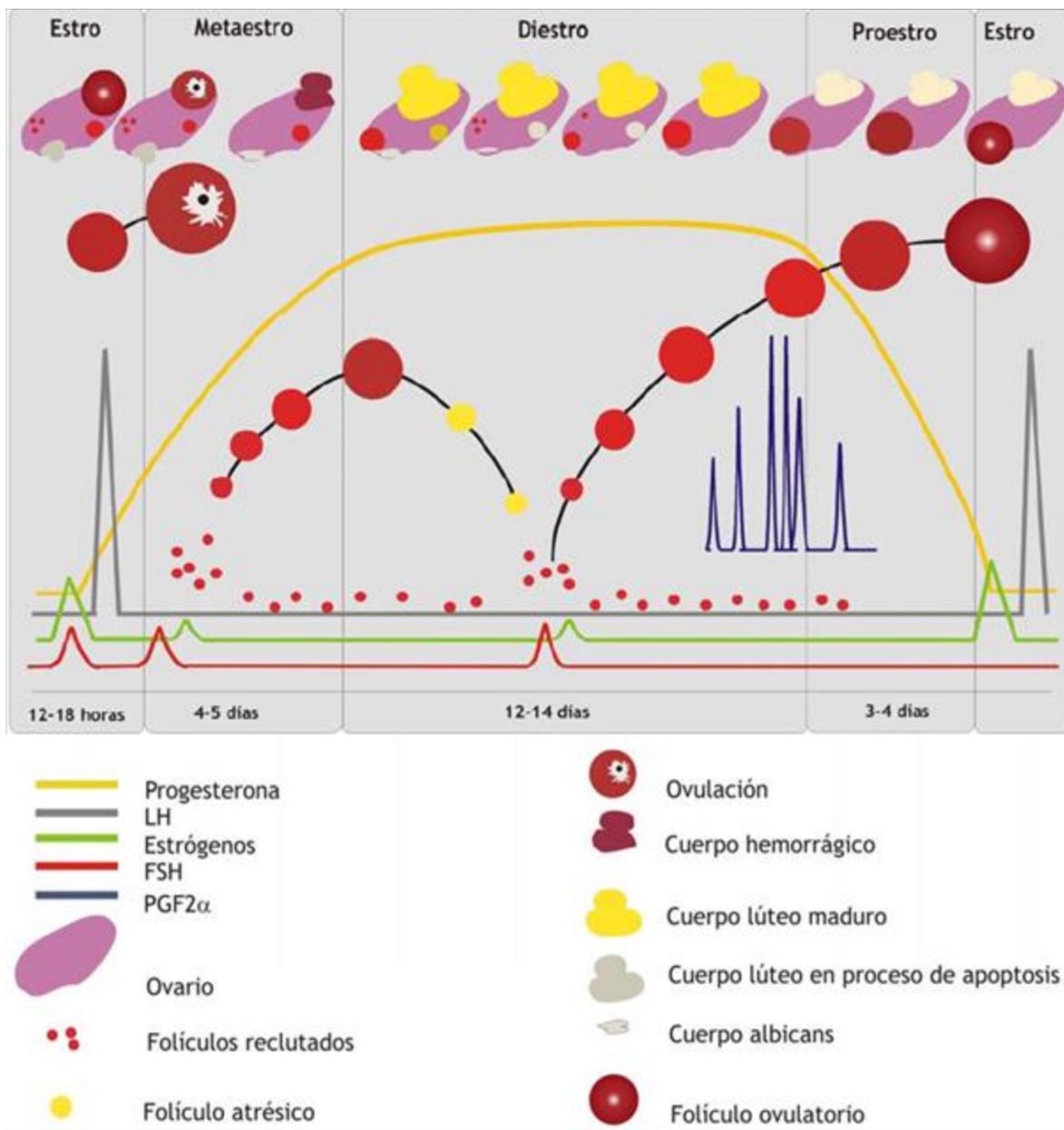


Figura 3. Diagrama del ciclo estral bovino mostrando los niveles hormonales en cada una de las etapas de las fases folicular y luteal (Adaptado de Gasque Gómez, R. 2008. Enciclopedia bovina. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. UNAM).

hipotálamo (hormona liberadora de gonadotropinas; GnRH, *del inglés: gonadotropin-releasing hormone*), la adenohipófisis (hormona foliculoestimulante; FSH, *del inglés: follicle stimulating hormone* y hormona luteinizante; LH, *del inglés: luteinizing hormone*), los ovarios (progesterona

(P4), 17β -estradiol (E2), e inhibina) y el útero (prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$)). Estas hormonas funcionan a través de mecanismos de retroalimentación negativa y positiva que regulan el ciclo estral (Roche, 1996). La GnRH controla el ciclo a través de sus acciones sobre la adenohipófisis regulando la secreción de las gonadotrofinas LH y FSH (Schally y col., 1971) (Figura 4). La secreción pulsátil de niveles basales de GnRH desde el centro tónico del hipotálamo y el pico preovulatorio de GnRH desde el centro cíclico del hipotálamo previenen la desensibilización de su receptor en las células gonadotropas de la pituitaria anterior. Después del transporte de GnRH desde el hipotálamo a la hipófisis vía el sistema porta hipofisario (Moenter y col., 1992), la GnRH se une a un receptor de membrana acoplado a proteína G presente en las células gonadotropas (Kakar y col., 1993). Esta unión produce la liberación de calcio intracelular que activa la vía de transducción de señal de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que culmina con la liberación de FSH y LH desde compartimentos de almacenaje ubicados en el citoplasma (Weck y col., 1998). La FSH es reservada en gránulos secretorios dentro del citosol por cortos períodos de tiempo, mientras LH es almacenada por largos períodos durante el ciclo estral (Farnworth, 1995). Las células gonadotropas de la adenohipófisis pueden ser mono-hormonales, liberando únicamente LH o FSH, o bi-hormonales, liberando ambas gonadotrofinas (Molter-Gérard y col., 2000).

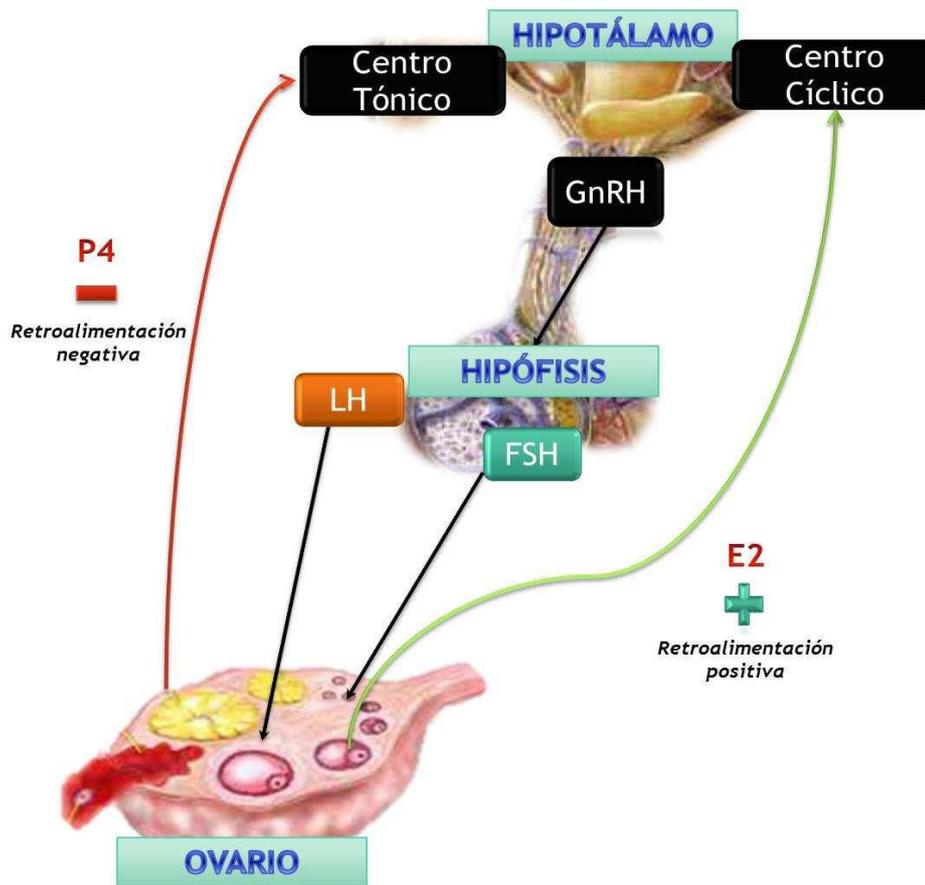


Figura 4. Esquema de los principales mecanismos de regulación endócrina del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. *GnRH*: Hormona liberadora de gonadotropinas; *P4*: Progesterona; *E2*: Estrógenos; *FSH*: Hormona folículo-estimulante; *LH*: Hormona luteinizante.

Durante la fase folicular, un incremento en las concentraciones de E2, debido al rápido crecimiento y proliferación celular que sufre el folículo dominante (FD), sumado a la caída concomitante de los niveles circulantes de P4 producidos debido a la luteólisis, inducen un pico de GnRH y permiten la aparición de conducta sexual y la receptividad a la monta (Frandsen y col., 2003). Este pico preovulatorio de GnRH induce picos coincidentes de FSH y LH (Sunderland y col., 1994). Solamente cuando la P4 se encuentra en concentraciones séricas basales y los pulsos de LH se suceden cada 40 a 70 min por 2 o 3 días, el FD puede ovular (Roche, 1996), la ovulación se da 10 a 14 horas después de finalizado el estro y es seguida por el comienzo de la fase luteal. Este período es también conocido como metaestro y tiene una duración de 3 a 4 días. Está caracterizado por la formación del CL a partir del cuerpo hemorrágico (folículo ovulado). Luego de la ovulación las concentraciones de P4 comienzan a incrementarse debido a la formación del CL, en el cual las células de la granulosa y de la teca interna se luteinizan y producen P4 que permitirá el establecimiento y mantenimiento de la preñez o la reanudación de un nuevo ciclo estral si no hubo

fertilización del ovocito ovulado (Niswender, 1981). Durante el diestro, la P4 se mantiene elevada y se suceden repetidamente ondas de crecimiento folicular estimuladas por la liberación de FSH desde la adenohipófisis. Sin embargo, los folículos dominantes que crecen durante esta fase no llegan a ovular. La P4 que es predominante en esta fase, ejerce retroalimentación negativa y sólo permite la secreción de LH en pulsos de gran amplitud pero de baja frecuencia que no desencadenan la ovulación de dicho folículo (Rahe y col., 1980). Finalmente durante el proestro, la concentración sérica de P4 cae debido al proceso de luteólisis a partir de la secreción de PGF2 α desde el útero (Hansel y Convey, 1983).

1.1.3.2. Dinámica folicular durante el ciclo estral

El perfeccionamiento de las técnicas para monitorear los niveles hormonales y la expresión de sus receptores, así como de la ultrasonografía para evaluar los cambios morfológicos en el ovario, han permitido una mayor comprensión del desarrollo folicular en el bovino. Rajakoski (1960), basado en estudios histológicos de los ovarios, fue el primer investigador que postuló una teoría planteando la existencia de ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. Sin embargo, fue recién a partir del desarrollo y difusión de la ultrasonografía ovárica cuando se pudo documentar fehacientemente que el crecimiento folicular bovino ocurre a modo de ondas (Savio y col., 1988; Sirios y Fortune, 1988; Adams y col., 1992). Desde ese momento se realizó un importante número de trabajos que demuestran que el patrón de ondas se repite en casi todos los estadios de la vida de la hembra, incluyendo el período pre-púber (Evans y col., 1994), la preñez (Ginther y col., 1989) y el período posparto (Savio y col., 1990; Bó y Caccia, 2002). El crecimiento, desarrollo y maduración de los folículos ováricos es un proceso fundamental para lograr una alta eficiencia reproductiva en los animales domésticos. Como ya hemos mencionado, un número fijo de folículos primordiales es establecido durante el desarrollo fetal. El crecimiento de los folículos ováricos toma un período de 3 a 4 meses y está dividido en una etapa independiente y otra dependiente de gonadotrofinas (Webb y col., 2004). El crecimiento dependiente de gonadotrofinas en las hembras bovinas ocurre en 2 o 3 ondas de crecimiento folicular por ciclo estral (Rajakoski, 1960; Savio y col., 1988). Cada onda de crecimiento abarca la emergencia, selección y el establecimiento de la dominancia folicular seguido por la atresia o la ovulación del FD. La FSH y la LH tienen un rol preponderante en el desarrollo folicular. El comienzo de la etapa dependiente de gonadotrofinas está caracterizado por la emergencia de una cohorte de folículos, unos 5 a 20 folículos de un tamaño mayor o igual a 5 mm, que está en relación con un incremento transitorio en

las concentraciones de FSH (Adams y col., 1992; Sunderland y col., 1994). Este suceso marca el comienzo de la dependencia de FSH de los folículos en crecimiento (Ginther y col., 2002), caracterizado por la aparición de receptores de FSH (FSHR) localizados en las células de la granulosa ya al tercer día del inicio de la onda de crecimiento (Camp y col., 1991; Evans y Fortune, 1997). Así, la FSH estimula su cascada de señalización corriente abajo que finalmente promueve el crecimiento folicular y la proliferación celular (Richards, 1994; Richards y col., 1998). Este efecto de la FSH sobre las células de la granulosa lleva al incremento en la actividad de la enzima aromatasas (P450_{arom}; CYP19A1), la cual convierte los andrógenos en E2 (Hillier, 1994). De esta cohorte de folículos en desarrollo emerge el folículo dominante, que es el folículo sano de mayor diámetro en dicha cohorte (Gougeon y Lefevre, 1983). Este aumento en su tamaño lleva a un incremento en la cantidad de E2 e inhibina contenidas en su líquido folicular, que también se presenta francamente aumentado (Hillier, 1994). Las elevadas concentraciones de E2 e inhibina ejercen retroalimentación negativa a nivel adenohipofisario reduciendo la FSH a niveles basales (Sunderland y col., 1994; Ginther y col., 2000 a, b). Este efecto negativo de los estrógenos sobre LH y FSH podría tener como blanco las células bi-hormonales (FSH y LH) directamente a nivel adenohipofisario. En consecuencia, el contenido de FSH de estas células disminuye por diversos mecanismos, pasando a ser células mono-hormonales de LH que se suman a la población mono-hormonal de LH no afectada por los E2. Estos cambios explican la capacidad de las células gonadotropas de reservar concentraciones elevadas de LH para promover el pico preovulatorio de LH (Molter-Gérard y col., 2000). El FD se vuelve cada vez más sensible a la LH (Ginther y col., 2000a) y continúa creciendo a pesar de que las concentraciones de FSH decrecen. El cambio de un crecimiento dependiente de FSH (Adams y col., 1992) a uno LH dependiente (Kulick y col., 1999) se lleva a cabo por la presencia del receptor de LH (LHR) en las células de la granulosa (Xu y col., 1995). Este receptor está localizado en las células de la granulosa y de la teca interna de folículos sanos, en diferentes estadios del desarrollo folicular (Camp y col., 1991). A medida que el folículo crece los LHR de las células de la teca se incrementan y las células de la granulosa los adquieren, siendo de esta manera, seleccionados para llegar a ser el/los FD de esa onda de crecimiento (Xu y col., 1995; Bao y col., 1997; Braw-Tal y Roth, 2005). Por otra parte, se ha sugerido que incrementos transitorios en las concentraciones de LH circulante que ocurren alrededor del momento de selección folicular (Ginther y col., 2003), permite al FD continuar la producción de E2 y crecer en un medio con bajas concentraciones de FSH (Ireland y Roche, 1983). Durante la fase luteal temprana se dan pulsos de LH de menor amplitud y mayor frecuencia (20–30 pulsos/24 h), en

la mitad de la fase lútea (mitad de diestro) los pulsos incrementan su amplitud y reducen su frecuencia (6–8 pulsos/24 h). En ambos casos los pulsos son de una amplitud y frecuencia insuficiente para lograr la maduración y subsecuente ovulación del FD (Rahe y col., 1980). Así, el FD producido en la fase luteal del ciclo sufre atresia, caída en la producción de E2 e inhibina y como consecuencia queda abolida la retroalimentación negativa que ejercía sobre el eje hipotálamo-hipofisario y la secreción de FSH puede aumentar, conduciendo a la emergencia de una nueva onda de crecimiento folicular. La producción de altas concentraciones de E2 es una característica distintiva del FD (Ireland y Roche, 1982; Ireland y Roche, 1983) y antes de que aparezcan diferencias visibles en el diámetro folicular, el futuro FD tiene mayores concentraciones de E2 en el líquido folicular comparado con los demás folículos en su cohorte (Fortune, 1994; Sunderland y col., 1994; Mihm y col., 2000).

La síntesis de E2 es dependiente de la producción de andrógenos en las células de la teca y su subsecuente aromatización en las células de la granulosa, a este mecanismo dónde dos células participan conjuntamente en la producción de andrógenos se lo denomina, dos células/dos gonadotrofinas (Fortune y Quirk, 1988). La producción de E2 por los folículos en crecimiento depende de la correcta frecuencia pulsátil de LH (Crowe y col., 2001a,b). La unión de LH a su receptor en las células de la teca conduce a la conversión del colesterol a testosterona a través de una serie de reacciones catalíticas. Una vez producida, la testosterona difunde hacía las células de la granulosa donde es convertida a E2 por la CYP19A1 (Dorrington y col., 1975). El E2 sintetizado tiene roles locales sobre el desarrollo folicular y sistémicos ejerciendo retroalimentación positiva sobre el eje hipotálamo/hipofisario. Durante la fase folicular del ciclo, cuando las concentraciones de P4 son bajas, estas altas concentraciones de E2 producidas por el FD inducen un pico de GnRH desde el hipotálamo que estimula un pico de LH hipofisario de amplitud y frecuencia suficiente para estimular la maduración final y la ovulación de este FD (Sunderland y col., 1994). Las concentraciones elevadas de E2 también inducen la expresión de manifestaciones de celo necesarias para un apareamiento exitoso (Ireland, 1987) (Figura 5). Otros factores intra-ováricos juegan un rol importante en la regulación del ciclo estral actuando indirectamente al modificar la síntesis de E2 o directamente ejerciendo retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo/hipofisario. En este sentido la biodisponibilidad del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1, del inglés: *insulin like growth factor 1*), contribuye al crecimiento, proliferación y capacidad esteroideogénica del futuro FD (Mihm y col., 2000; Rivera y Fortune, 2003; Canty y col., 2006), afectando indirectamente la retroalimentación negativa del E2 sobre el eje hipotálamo-hipofisario. Este

mecanismo en adición a la adquisición temprana de LHR en las células de la granulosa son considerados los mecanismos más importantes que dirigen el proceso de selección del FD (Lucy, 2007). La superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β , del inglés: *transforming growth factors β*), conformada por más de 30 proteínas estructuralmente relacionadas, también tiene un rol de importancia en el control del ciclo estral. La activina puede incrementar la producción de E2 en el líquido folicular (Knight y Glister, 2003), mientras la foliculostatina impide esta acción de la activina, en conjunto ambas pueden alterar el mecanismo de retroalimentación ejercido por E2 (Phillips y de Kretser, 1998). Asimismo, la inhibina, cuya expresión ha sido descrita en las células de la granulosa de la vaca, juega un rol de importancia impidiendo la secreción de FSH desde la adenohipófisis (Findlay y col., 2002).

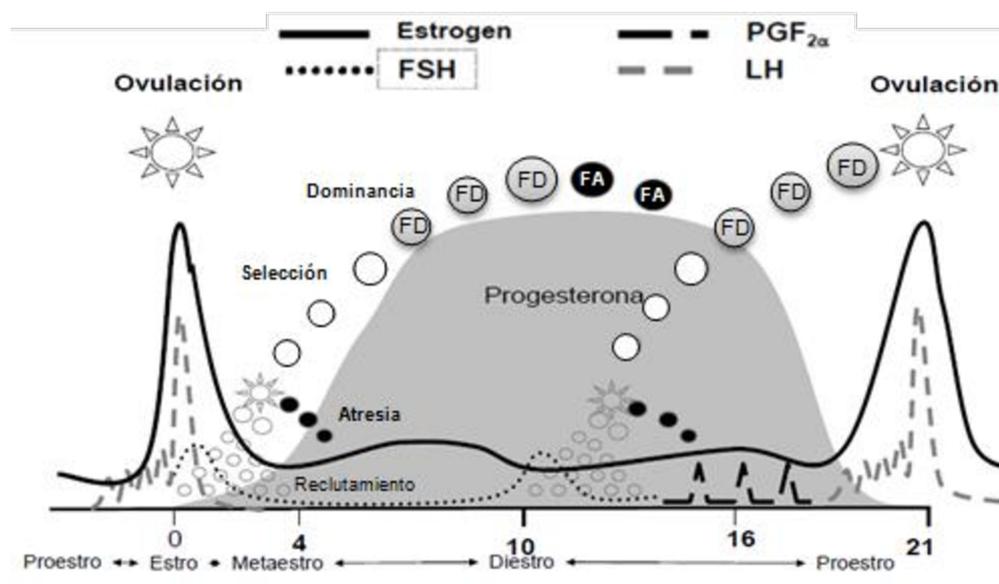


Figura 5. Esquema de las concentraciones hormonales y la dinámica de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. *FSH*: hormona folículo-estimulante. *LH*: hormona luteinizante. *PGF_{2α}*: prostaglandina F_{2α}. *FD*: folículo dominante. *FA*: folículo atrésico. (Adaptado de Rippe, 2009).

1.1.3.3. Función del cuerpo lúteo durante el ciclo estral

El CL se origina a partir de las células del folículo ovulatorio. La LH es la mayor hormona luteotrófica en las vacas (Hansel, 1966), y es la responsable de estimular la luteinización de las células de la granulosa y de la teca interna del folículo preovulatorio (Alila y Hansel, 1984). Una de

las funciones del CL es producir suficiente P4 para poder asegurar el mantenimiento de una gestación si el proceso de fertilización se llevó a cabo y existe un embrión dentro del útero. En este sentido, la P4 secretada por el CL produce una reducción en la secreción de gonadotrofinas y previene la aparición del estro (Forde y col., 2011). Por otra parte, las concentraciones elevadas de P4 durante la fase lútea del ciclo alteran el patrón de expresión de genes en el útero (Forde y col., 2009). Durante la mitad de la fase lútea, estas concentraciones elevadas de P4 producen una regulación hacia abajo del receptor nuclear de P4 en el epitelio luminal del endometrio (Kimmins y MacLaren, 2001). Si hacia el día 16 del ciclo, no ha sido detectada en cantidad suficiente la señal de reconocimiento materno de la preñez (interferón tau), se desencadena el proceso de luteólisis del CL. Así, la PGF2 α , el mayor agente luteolítico en rumiantes, es secretado por el útero (Baird y col., 1976; Kindahl y col., 1976; Nett y col., 1976; Lamothe y col., 1977). El mecanismo de secreción involucra al receptor de oxitocina existente en el útero que liga a la oxitocina proveniente de la neurohipófisis y del propio CL, propagándose la secreción episódica de PGF2 α desde el útero hacia el ovario a través de un mecanismo de contracorriente que le permite pasar desde la vena uterina directamente a la arteria ovárica. Así, durante la luteólisis se reducen las concentraciones circulantes de P4, las concentraciones de E2 se incrementan, la GnRH se libera del hipotálamo y el animal entra en una nueva fase folicular (Forde y col., 2011).

1.1.3.4. La ovulación

Hasta hace poco tiempo se asumía que la ovulación era un proceso relativamente simple, que involucraba a un pequeño número de factores reguladores, activados por el pico preovulatorio de LH. Esto se basaba en los pocos cambios metabólicos necesarios para activar a las enzimas proteolíticas que degradan el área más apical del folículo ovulatorio (estigma). Sin embargo, los nuevos métodos para el estudio de expresión génica, han permitido relacionar a más de 100 genes con el proceso de ovulación. La mayoría de estos han sido asociados directa o indirectamente con reacciones inflamatorias agudas en los siguientes procesos fundamentales: 1) elementos de respuesta temprana que inician la reacción inflamatoria; 2) eventos pro-inflamatorios que llevan a la degradación proteolítica de la pared folicular; 3) antiinflamatorios endógenos que promueven la cicatrización y reparación de las áreas afectadas del ovario; y 4) protección del tejido frente al estrés oxidativo generado localmente durante el proceso ovulatorio. En la actualidad, numerosas evidencias experimentales refuerzan la hipótesis de que la ovulación es un proceso inflamatorio

agudo, incluyendo el hecho de que determinados agentes antiinflamatorios que afectan la respuesta aguda, tales como la indometacina, son capaces de bloquear la ovulación (Espey, 1994; 2004).

La llamada cascada de la inflamación consiste en la activación de agentes que median y moderan el proceso inflamatorio por una acción directa e indirecta sobre el tejido afectado. Colectivamente los eventos fisiológicos provocan la vasodilatación, hiperemia, exudación, edema, colagenólisis, proliferación celular y remodelación en el tejido. Durante las últimas décadas, un gran número de moléculas comúnmente asociadas a la cascada inflamatoria han sido estudiadas en el tejido ovárico (Espey y col., 2004).

Por lo expuesto, la ovulación es un fenómeno morfológico que se produce durante la transformación de un folículo ovárico en un CL (Espey, 1999). Los cambios que se producen en el tejido, en particular en el sitio de ruptura, requieren una disrupción aguda de las capas densas de los tejidos colágenos que consisten en la teca externa alrededor de los folículos individuales y la túnica albugínea que encapsula todo el ovario. Los cambios locales incluyen hemorragia en la proximidad de la disrupción de la superficie del ovario. Sin embargo, los cambios estructurales no se limitan únicamente al área en la que se degrada la superficie folicular. El proceso ovulatorio afecta a todo el estrato granuloso y a la teca interna adyacente (Espey, 1994).

Concomitante con la cascada inflamatoria, hay un grupo de genes relacionados con la expresión de proteínas que actúan para contrarrestar el estrés oxidativo que se genera en los tejidos inflamados, y estos genes "protectores" se representarán como una parte separada, pero integral, de la reacción inflamatoria ovárica. Las reacciones inflamatorias pueden subdividirse en elementos proinflamatorios que causan daño tisular como parte de un mecanismo de defensa natural y elementos antiinflamatorios que son responsables de la reparación secuencial y la curación del tejido dañado (Espey y col., 2004).

Las respuestas inflamatorias se asocian con el desarrollo local de estrés oxidativo en el tejido afectado (Li, 2002; Holmes-McNary, 2002). Como componente de las respuestas inflamatorias de los mamíferos, las especies reactivas de oxígeno (ROS), junto con las especies reactivas de nitrógeno (RNS), se generan especialmente en la vecindad de la mitocondria hipóxica o reoxigenada (Davies, 1995; Mills, 1997; Li, 2002; Melov, 2002). Los superóxidos y derivados reactivos de oxígeno, incluyendo O_2^- , OH^- y H_2O_2 , contribuyen a la lesión celular local mediante la liberación de proteasas y eicosanoides (Mills, 1997), la secreción de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias (Bautista, 2001) y el reclutamiento de leucocitos en el tejido afectado (Laroux y col., 2001). Para prevenir la necrosis excesiva y la apoptosis en el área (y especialmente en las

células endoteliales altamente sensibles), la cascada inflamatoria incluye la activación de genes para minimizar las consecuencias deletéreas del estrés oxidativo (Espey y col., 2004).

Cuando un folículo ovula y comienza a transformarse en tejido luteínico, la angiogénesis es esencial para establecer y mantener un CL metabólicamente viable. La angiogénesis es una secuencia de eventos que ocurre en procesos fisiológicos normales y en una variedad de condiciones patológicas (Bouma-ter Steege y col., 2001). Comúnmente comienza con la vasodilatación y un aumento de la permeabilidad vascular en el tejido afectado (Distler, 2002). Además, las etapas iniciales del proceso requieren degradación proteolítica de la matriz extracelular (MEC) que rodea los capilares existentes. Una vez que la matriz es más flexible y ha sido infiltrada por las proteínas plasmáticas, las condiciones locales son favorables para la proliferación y migración de las células endoteliales que componen las paredes de los capilares ya en la zona (Distler y col., 2002). Después de la ovulación, el CL funcional surge de la proliferación de las células remanentes y de un proceso que requiere una redefinición de los límites entre tejido luteal y estromal (Smith y col., 1994). Por lo tanto, la remodelación controlada de la MEC y de las membranas basales son procesos fundamentales durante el ciclo estral o menstrual (Inderdeo y col 1996).

1.2.Estrés

1.2.1. Fisiología del estrés

Los procesos fisiológicos normales se mantienen debido a un equilibrio dinámico y complejo denominado homeostasis, el cual constantemente es desafiado por los estresores. Estos factores actúan interna o externamente sobre el organismo induciendo un esfuerzo adicional para mantener un estado de equilibrio con su medio interno y con el ambiente externo. Los estresores alteran la homeostasis, provocando una respuesta conocida como estrés (Charmandari y col., 2005; Möstl y Palme, 2002). Ante situaciones de estrés, el organismo de la mayoría de los mamíferos reacciona activando una serie de mecanismos fisiológicos y conductuales. Cuando dichos mecanismos resultan inadecuados (por prolongados o excesivos) se pueden presentar consecuencias negativas sobre otras funciones fisiológicas importantes, como por ejemplo la reproducción (Chrousos y col., 1998; Dobson y Smith, 2000; Dobson y col., 2001; Charmandari y col., 2005). Para sobrellevar estas perturbaciones, el organismo posee dos sistemas neuroendocrinos de

protección encargados de mediar en forma bidireccional las adaptaciones de los organismos a situaciones potencialmente peligrosas. Uno de ellos, es el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (eje HHA): un conjunto complejo de influencias directas y de interacciones de retroalimentación entre el hipotálamo, la hipófisis y las glándulas adrenales. El núcleo paraventricular del hipotálamo, sintetiza y secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que actúa sobre la hipófisis estimulando la secreción de hormona adrenocorticotropa o adrenocorticotrofina (ACTH). La ACTH induce la liberación de cortisol en la corteza adrenal, lo cual induce una retroalimentación negativa del sistema e inhibe la secreción de hormonas desde el hipotálamo y la hipófisis. Esto reduce la secreción de CRH y la vasopresina, y también reduce directamente la escisión de proopiomelanocortina (POMC) en ACTH y β -endorfinas (Engelmann y col., 2004). La ACTH actúa en la glándula adrenal incrementando la producción y liberación de corticosterona, el principal glucocorticoide fisiológico en ratas y ratones, y cortisol, el principal glucocorticoide en mamíferos, como los humanos y los bovinos, incluyendo otros tipos de roedores (Nemeth y col. 2014, Magomedova & Cummins 2016). El segundo sistema es el simpático-adrenérgico, donde la adrenalina y la noradrenalina se producen en la médula adrenal como consecuencia de la estimulación simpática y los efectos locales del cortisol. Estas hormonas producen una retroalimentación positiva a nivel de la hipófisis e incrementan la transformación de la POMC en ACTH y β -endorfinas (Engelmann y col., 2004). La ACTH ejerce sus acciones principalmente a través de los receptores de melanocortinas (MCRs), habiéndose caracterizado 5 receptores (MC1R-MC5R) que son comunes a toda esta familia de péptidos (ACTH y hormona estimulante de melanocitos) (Getting y col., 2006). Los MCRs están implicados en las respuestas fisiológicas de ACTH y α -, β - y γ - hormonas estimulantes de melanocitos (α -, β - y γ -MSH). Su expresión ha sido previamente analizada en diferentes tejidos bovinos (Liakos y col., 1998; Liakos y col., 2000), incluyendo en el ovario, detectándose los 5 tipos existentes (Amweg y col., 2011). Además, en ensayos *in vitro*, realizados por nuestro grupo de trabajo, se ha comprobado una liberación de cortisol en respuesta a ACTH en folículos medianos así como un incremento de la testosterona y del cortisol en folículos grandes (Amweg y col., 2011, 2013), así como también se ha propuesto que los glucocorticoides (GC) son producidos *de novo* en el ovario (Amweg y col., 2017) (Figura 6).

1.2.2. El estrés en la reproducción

Como se detalló previamente, para lograr que el pico de LH se produzca en el momento adecuado, una serie de eventos, ajustadamente controlados deben ocurrir en el hipotálamo y la

hipófisis. Una vez removida la actividad inhibitoria de la P4 durante la luteólisis, se incrementa la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH, para culminar con el pico peovulatorio de LH en respuesta al efecto de retroalimentación positiva del E2 sobre el eje hipotálamo-hipofisario. Los estresores reducen la fertilidad por interferir con los mecanismos que regulan el cronograma de estos eventos dentro de la fase folicular del ciclo estral. Esto ocurre principalmente a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, donde se reducen los pulsos de GnRH y LH por acciones tanto en la hipófisis como en el hipotálamo, privando al ovario de adecuados niveles de LH (Jordan, 2003).

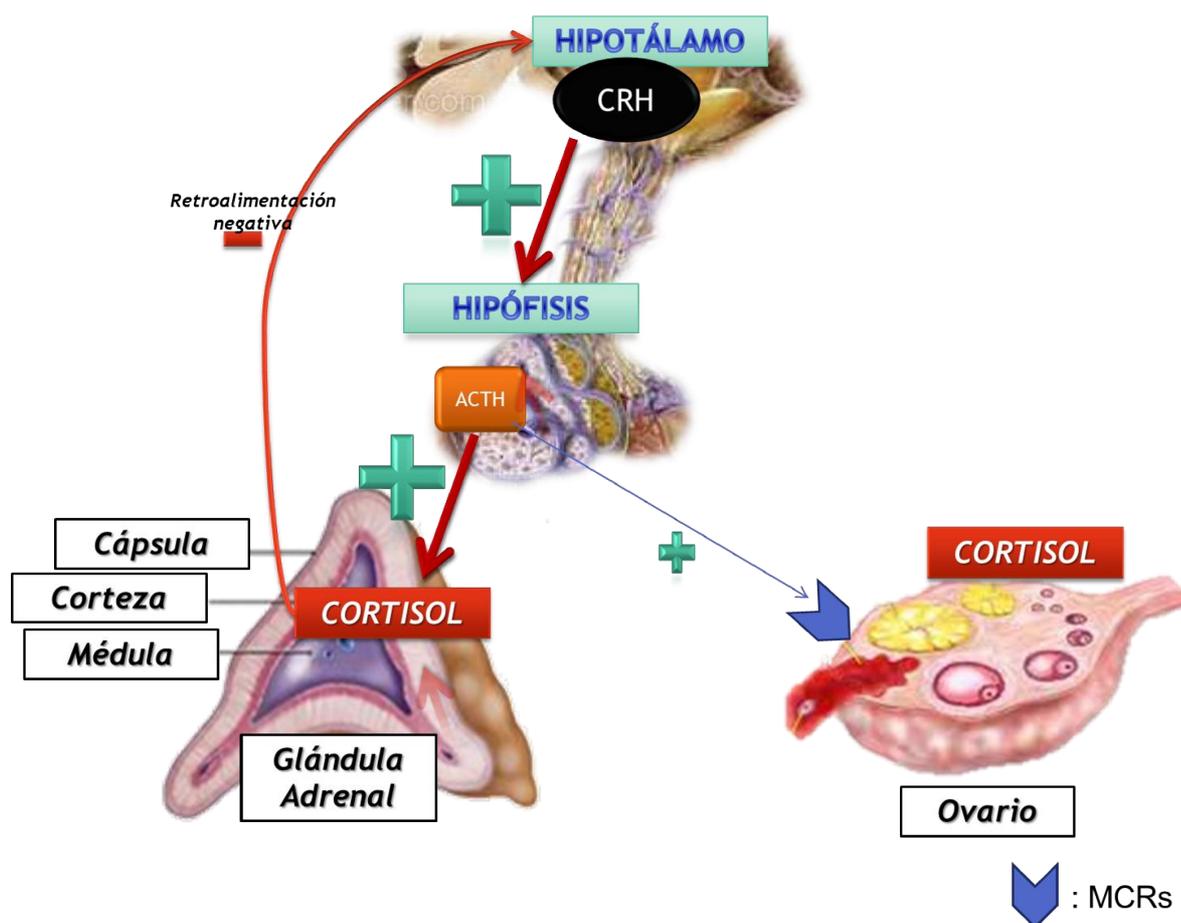


Figura 6. Esquema de la regulación endócrina del estrés en el eje Hipotálamo-hipófisis-adrenal y su relación con el ovario. *CRH*: Corticotrofina; *ACTH*: Adrenocorticotrofina; *MCRs*: Receptor de melanocortinas.

Los bovinos lecheros se encuentran sometidos diariamente a numerosas situaciones estresantes metabólicas, ambientales y de manejo, a lo largo del ciclo productivo y reproductivo, las cuales pueden potencialmente inhibir la productividad del rodeo y el bienestar, como resultado de la disrupción neuroendocrina e inmunosupresión inducida por estrés (Carrol and Forsberg 2007). Los estresores reducen la fertilidad por interferir con los mecanismos que regulan el cronograma de eventos dentro de la fase folicular. De hecho, se ha demostrado que el transporte de los animales

(un estresor agudo) durante 4 a 8 hs, reduce la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH, en la fase folicular tardía y puede afectar la ovulación (Dobson y col., 1999; Phogat y col., 1999). En bovinos se ha detectado una reducción en la tasa de gestaciones cuando la inseminación artificial y los muestreos sanguíneos se realizan en ambientes no familiares, en contraste con lo observado después de un proceso de adaptación a dicho manejo (Dobson y Smith, 2000; Smith y col., 2003). En algunas situaciones, como ocurre durante el estrés crónico debido a laminitis o fiebre, la frecuencia pulsátil de GnRH/LH puede ser más lenta, de modo tal que el desarrollo folicular comienza, pero no puede continuar a estadios avanzados donde se necesita la mayor frecuencia de liberación. De esta manera, el animal no es capaz de desarrollar ciclos estrales normales y se produce anestro. Esta situación ha sido descrita por nuestro grupo de trabajo en animales expuestos a luz permanente durante más de 10 semanas (Palomar y col., 2007). En otros casos, la frecuencia del pulso de GnRH/LH puede ser suficiente para soportar el desarrollo folicular pero con alteraciones en la liberación de GnRH o la sensibilidad de la hipófisis al estradiol. De esta forma, se genera una liberación inadecuada de LH, incapaz de producir la ovulación y luteinización, ocasionando la persistencia folicular y el desarrollo de quistes foliculares (Dobson y Smith, 1995). En adición a lo anteriormente expuesto, hay acciones locales en la cascada de enzimas relacionadas al metabolismo de los glucocorticoides que pueden interferir con el proceso inflamatorio asociado a la ovulación (Thurston y col., 2003a). Los glucocorticoides también tienen importantes efectos clínicos, principalmente la inhibición de la respuesta inflamatoria. Una de las vías por las que estas hormonas llevan a cabo esta inhibición es mediante la supresión de la formación de sustancias que promueven la inflamación, como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Cunningham, 2003).

Los GC son agentes antiinflamatorios que actúan para modular la producción y acción de las citoquinas y prostaglandinas necesarias para la ovulación, luteólisis, implantación embrionaria, crecimiento fetal y desarrollo de la placenta (Duong y col., 2012). Las funciones de los GC en el ovario se han descrito en diversas especies e incluyen tanto efectos estimulantes como inhibitorios sobre las funciones ováricas (Tetsuka y col., 2010). Los GC actúan directamente sobre las células ováricas inhibiendo la acción de las gonadotropinas y la síntesis de esteroides (Michael y col., 2003; Acosta y col., 2005; Sunak y col., 2007). Se ha demostrado en estudios *in vitro* que la acción de cortisol sobre las células de la granulosa bovinas aumenta la producción de oxitocina (Luck y Jungclas, 1988) y la síntesis de P4 (Kawate y col., 1993) mientras que estímulos con FSH incrementan la producción de andrógenos en cultivos de células de la teca (Kawate y col., 1993; Spicer y Chamberlain, 1998). Además, se ha demostrado que los corticoides suprimen la actividad

de la CYP19A1 y disminuyen el número de LHR en ratas (Hsueh y Erickson, 1978; Schoonmaker y Erickson, 1983), vacas (Kawate y col., 1993) y cerdas (Danisová y col., 1987). En el ovario humano, el cortisol aumenta su concentración en el líquido folicular luego del pico preovulatorio de LH en los folículos ovulatorios (Hillier y Tetsuka, 1998). Como la ovulación es un evento inflamatorio caracterizado por un incremento en la síntesis de citoquinas y prostaglandinas, el aumento de los GC antiinflamatorios alrededor del periodo ovulatorio puede representar un mecanismo fisiológico para limitar el daño causado por los componentes proinflamatorios antes mencionados. En este sentido, el nivel de GCs en la pared folicular se regula a nivel local en los folículos ovulatorios bovinos. Este mecanismo puede proteger a los folículos de los efectos adversos proinflamatorios, previniendo el exceso de reacciones inflamatorias asociadas con la ovulación, incrementando temporalmente las concentraciones locales de los GC, constituyendo de esta manera una parte integral del mecanismo regulatorio de la fisiología ovárica (Acosta y col., 2005).

1.3. Matriz extracelular: el rol de las MMPs y TIMPs en el ovario

1.3.1. La matriz extracelular y el ovario.

La MEC es una estructura tridimensional, acelular que está presente en todos los tejidos y es esencial para la vida. Cada órgano tiene una MEC con una composición única que se genera en etapas tempranas del desarrollo embrionario. La función de la MEC va más allá de proveer soporte para la integridad y elasticidad de los tejidos: es una estructura dinámica que es remodelada constantemente para controlar la homeostasis de los tejidos (Hynes y col., 1999). En los mamíferos, la MEC se compone de alrededor de 300 proteínas, conocidas como el núcleo matricial, e incluye proteínas como el colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas. Hay dos principales tipos de MEC que difieren en cuanto a su ubicación y composición: la matriz de tejido conectivo intersticial, que rodea a las células y proporciona andamiaje para los tejidos; y la membrana basal, que es una forma especializada de MEC que separa el epitelio del estroma circundante (Bonnans y col., 2014) (Figura 7).

El ovario es uno de los órganos más dinámicos del cuerpo ya que se somete a la remodelación de tejidos continuamente durante cada ciclo estral. El desarrollo folicular implica la expansión localizada del estroma ovárico y la proliferación de las células de la teca y de la granulosa. La degradación proteolítica de la MEC en el momento previo a la ovulación, es un paso crucial en la compleja cascada de eventos iniciados luego de que se ha producido la onda preovulatoria de LH (Fata y col., 2000; Ny y col., 2002). En ese momento, las tres capas de la MEC que separan al ovocito de la superficie ovárica, así como las dos membranas basales que se encuentran adyacentes a las células de la granulosa y al epitelio germinal deben ser degradadas a nivel local para la liberación del mismo (Espey y col., 1981). Después de la ovulación, el CL funcional surge de la proliferación de las células remanentes y de un proceso que requiere una redefinición de los límites entre tejido luteal y estroma (Smith y col., 1994). Por lo tanto, la

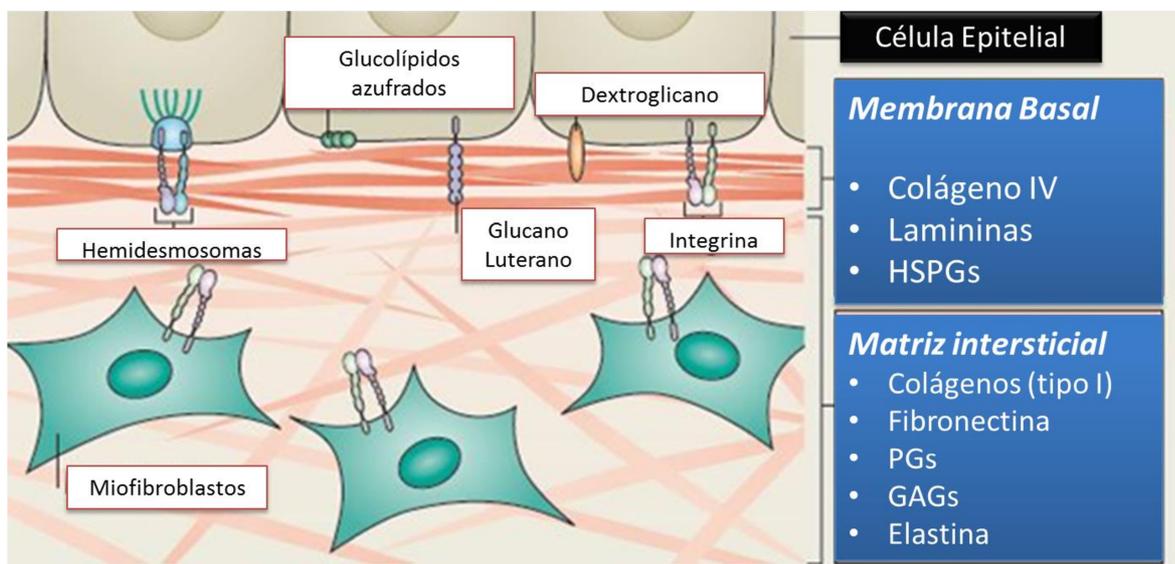


Figura 7. Esquema de los componentes de la matriz extracelular de los mamíferos. *HSPGs*: Proteoglicanos tipo Heparán Sulfato. *PGs*: Proteoglicanos. *GAGs*: Glucosaminoglicanos. (Adaptado de Bonnans y cols., 2014).

remodelación controlada de la MEC y de las membranas basales son procesos fundamentales durante el ciclo estral (Inderdeo y col., 1996).

1.3.2. Metaloproteasas de matriz y sus inhibidores tisulares

Las metaloproteasas son enzimas proteolíticas que necesitan de la presencia de átomos de zinc para su correcto funcionamiento. Las MMPs son una familia de más de 26 enzimas que digieren componentes específicos de la MEC, tales como colágeno, laminina, fibronectina, y proteoglicanos. Se caracterizan por su papel en la remodelación tisular, la degradación de dicha

matriz y reparación de los tejidos (Alexander y Werb, 1989; Marchenko y Strongin, 2001). Las MMP están reguladas estrictamente en múltiples niveles, incluyendo la transcripción génica y a través de mecanismos post-traduccionales, tales como la activación de pro-MMPs y la regulación por los inhibidores humorales como α 2-macroglobulina y los inhibidores endógenos, en particular los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs: del inglés *Tissular Inhibitors of Metalloproteases*). Dentro del ambiente extracelular, las MMPs latentes como pro-enzimas pueden ser activadas por serin-proteasas como plasmina y calicreínas (Espey, 1994), proteasas de mastocitos (Suzuki y col., 1995) y otras MMPs incluyendo aquellas asociadas a la membrana plasmática (Sato y col., 1994). Aunque la mayoría son activadas luego de su secreción, algunas como por ejemplo la estroma-lisina-3, la MMP23 y todas las MMP asociadas a la membrana (MT-MMPs: del inglés *Trans-Membrane Metalloproteases*) pueden ser activadas intracelularmente por furina, una serin-proteasa, o por otros activadores desconocidos (Strongin y col., 1995; Cao y col., 1996; Nguyen y col., 1998; Nagase y col., 1999; Sato y col., 1999; Smith y col., 2002). Su rol relevante en el proceso de ovulación es la degradación de los componentes de la MEC. Las capas de colágeno en la teca externa, la túnica albugínea, y el epitelio de la superficie en el ápice del folículo deben ser degradados para que ocurra la ruptura del folículo y consecuente liberación del ovocito. Además intervienen en la disolución de la membrana basal que separa las células de la teca y de la granulosa y cuyo componente principal es el colágeno de tipo IV. La remodelación de la MEC a través de las MMPs puede tener efectos drásticos sobre la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Smith y col., 2002). Existen cuatro tipos de TIMP (TIMP1 al -4) que son los principales reguladores de la remodelación de MEC en varios órganos (Brew y col., 2000; Gomez y col., 1997; Lambert y col., 2004; Woessner y Nagase 2000; Ries, 2013). Cada TIMP es codificado por diferentes genes. Contienen 12 residuos de cisteínas que forman seis puentes disulfuro y otorgan estabilidad a estas moléculas. Si bien los TIMPs se unen de manera no covalente con las MMPs con alta afinidad y con una estequiometría de 1:1, algunos TIMPs son capaces de unirse a pro-MMPs (Edwards y col., 1996; Bigg y col., 1997; Butler y col., 1999; Nagase y col., 1999). Los TIMP1, -2 y -4 son solubles dentro del ambiente extracelular mientras que el TIMP3 tiene un dominio específico de unión a la MEC. Es por ello que probablemente este inhibidor tenga una importante función en la preservación de la integridad de la MEC. Estudios recientes han llegado a la conclusión de que los TIMP también exhiben actividad similar a la de factores de crecimiento y acción inhibidora de la angiogénesis (Lambert y col., 2004), actividades que parecen ser independientes de la actividad inhibidora de las MMP (Brännström y col 2010). La inhibición de las

MMPs a través de los TIMPs mantiene la estabilidad de la MEC y promueve la deposición de nuevos componentes de la MEC. El control de la relación MMP:TIMP establece diversos procesos celulares asociados con la función ovárica incluyendo la diferenciación, migración, proliferación, apoptosis y expresión génica (Brooks y col., 1996). Adicionalmente, los TIMPs pueden alterar directamente la actividad celular actuando como factores de crecimiento y/o estimulando la esteroidogénesis, posiblemente a través de su unión con receptores de membrana (Avalos y col., 1988; Boujrad y col., 1995). La familia de las MMPs se subdivide en función de su especificidad por el sustrato y la estructura molecular en colagenasas, gelatinasas, estroma-lisinas, matriz-lisinas y MMP de tipo membrana (Birkedal-Hansen y col., 1993; Nagase y Woessner 1999; Visse y col., 2003; Brännström y col 2010). En bovinos, las descripciones se abocan principalmente a la participación de las MMPs y sus inhibidores en la formación y remodelación del cuerpo lúteo, durante el diestro (Curry y Osteen, 2001 y 2003; Zhang y col., 2003), así como también a estudios en momentos puntuales del ciclo estral (Bakke y col., 2002; Khandoker y col., 2002; Curry and Smith, 2006; Portela y col., 2009; Aly y Mutlag, 2015), pero no se encuentran descripciones de este complejo de enzimas y proteínas, a lo largo de la folículoogénesis de las vacas.

1.3.2.1.Colagenasas

Las colagenasas (MMP1, MMP8, MMP13 y MMP18) son conocidas por su capacidad de degradar las fibras de colágeno tipo I y III (Nagase, 1997). La ovulación es un proceso dependiente del debilitamiento de este tipo de fibras de la MEC que se encuentran principalmente en la teca externa, túnica albugínea y estroma cortical del ovario (Espey, 1994). Estudios realizados en ratas y ovejas indican que la actividad colagenolítica se ve incrementada en los folículos preovulatorios luego de la onda preovulatoria de gonadotrofinas (Murdoch y McCormick, 1992; Reich y col., 1985). Esta actividad es atribuida principalmente a los miembros de la subfamilia de colagenasas de las MMPs (Bakke y col., 2004). Estudios realizados en folículos preovulatorios indican que las MMP1 y MMP13 aumentan en respuesta al estímulo con LH en bovinos (Bakke y col., 2004) o gonadotrofina coriónica humana (hCG, del inglés: *human corionic gonadotropin*) en ratas (Reich y col., 1991) y monos (Chaffin y col., 1999), con diferencias temporales en los eventos posteriores, principalmente en la expresión de la MMP1 en bovinos (Bakke y col., 2004).

1.3.2.2. Gelatinasas

Las MMP2 y 9 (gelatinasas) desempeñan un papel clave en la degradación de la lámina basal que separa las capas de células de la granulosa y la teca, así como en la hidrólisis de las moléculas de colágeno fibrilar desnaturalizado después de su escisión inicial por las colagenasas. En el ovario de rata, la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la MMP2 es estimulada por LH, mientras que la expresión de la MMP9 se mantiene invariable a lo largo del período periovulatorio (Curry y col., 2000). Sin embargo, es probable que existan diferencias entre especies ya que en el ovario de ratón existe un incremento del ARNm para MMP9 frente al estímulo con LH, mientras que el ARNm para MMP2 permanece sin cambios (Hagglund y col., 1999; Robker et al., 2000). No obstante, incluso considerando los resultados de los estudios en ratones que sugieren la participación de MMP9 en la remodelación durante la ovulación, los estudios de silenciamiento de genes han indicado que la MMP9 por sí misma no ejerce un rol esencial en la ovulación (Hagglund y col., 1999). La falta de efecto podría explicarse por una redundancia en el sistema, de modo que otras MMP podrían compensar la falta funcional de la MMP9. Un factor clave en la regulación de las gelatinasas dentro del ovario puede ser la citoquina interleuquina (IL)-1, ya que la IL-1 β induce la secreción dosis-dependiente de MMP9 en cultivos de ovario (Hurwitz y col., 1993). La IL-1 β , inhibe además la actividad del activador de plasminógeno (PA) en células de la granulosa de rata en cultivo (Hurwitz y col., 1995), lo que sugiere que la IL-1 interacciona tanto con el sistema la MMP como con el de PA. Estas MMPs, las gelatinasas, son identificadas por zimografía en gelatina como 2 proteínas distintas de 72 y 92 kDa, respectivamente (McIntush y Smith, 1998; Curry y col., 2001; Imai y col., 2003). Para la activación de la MMP2 se requiere de proteinasas MT-MMPs (Curry y Osteen, 2003). Las MT-MMPs poseen dominios transmembrana cerca de su región carboxilo-terminal para su anclaje a la membrana plasmática y un dominio extracelular que direcciona el componente proteolítico de la enzima a la cara exterior de la célula.

1.3.2.3. Metaloproteasa de transmembrana 1

La MMP14 (MT-MMP-1) es notable tanto por su capacidad de activar otras MMP (MMP2, MMP13) y focalizar su actividad en la superficie de la célula, como por su propia capacidad para degradar numerosos sustratos de la MEC (Strongin y col., 1995; Ohuchi y col., 1997; Knauper y col., 1996). Se ha demostrado que la MMP14 tiene la capacidad de activar a la MMP2 (pro-gelatinasa A) y su actividad se localiza en un complejo con el TIMP2 en la superficie celular

(Strongin y col., 1995). La MMP14 también podría desempeñar un papel directo en la degradación de la pared del folículo preovulatorio a través de su capacidad para escindir el colágeno tipo I y III, la fibronectina, la laminina y los proteoglicanos (Ohuchi y col., 1997). Sin embargo, el papel específico de la MMP14 en la mediación de la ruptura del folículo es desconocido.

1.3.2.4. Inhibidores tisulares de las metaloproteasas

TIMP1 y -2 son los dos inhibidores tisulares más comúnmente estudiados y son capaces de inhibir la actividad de la mayoría de las MMPs y como tales desempeñan un papel clave en el mantenimiento del equilibrio entre la deposición de componentes y la degradación de la MEC (Gomez y col., 1997). Ambos son secretados como glicoproteínas y se unen a la forma activa de diversas MMPs, siendo más afin la unión de TIMP1 a la MMP9, y TIMP2 a MMP2. Si bien, la expresión del ARNm de TIMP2 en ovario no sufre cambios durante la ovulación en ratones (Indereo y col., 1996) y en ratas, en estas últimas se observó que el ARNm de TIMP1, localizado en el estroma y teca de folículos en desarrollo, se incrementa notablemente después del estímulo con hCG (Curry y col., 2001). Los niveles de ARNm de TIMP1 alcanzan su máxima expresión en proestro tardío en el ciclo estral del ratón (Inderdeo y col., 1996). En estudios más detallados en modelos de roedores inmaduros estimulados con eCG, se observó un aumento del ARNm de TIMP1 después de la estimulación con hCG tanto en rata (Chun y col., 1992; Curry y Nothnick, 2000) como en ratón (Hagglund y col., 1999). La localización de TIMP1 durante la ovulación en la rata pasa de ser de origen tecal a ser derivado de las células de la granulosa (Curry y col., 2001). Se ha sugerido que existe una modulación de TIMP1 sobre otros componentes del sistema de MMP-TIMP debido a los niveles reducidos de expresión de TIMP2 y TIMP3 en ovario de ratones deficientes en TIMP1 (Nothnick y col., 1997). Además de participar en la regulación de la actividad de las MMPs, el TIMP1, derivado de las células de la granulosa fue relacionado con la regulación de la esteroidogénesis. Así, se determinó que una proteína similar a TIMP1 indujo la producción de P4 en células de la granulosa de rata (Boujrad y col., 1995). Por otra parte, TIMP1 estimula la producción de E2 en células de la granulosa de ratón en cultivo (Nothnick y col., 1997), mientras que los ratones deficientes en TIMP1 muestran la reducción de los niveles en sangre de E2 y P4 (Nothnick, 2003). Este inhibidor tisular puede unirse a las formas activas de todas las MMPs conocidas y a la forma latente de MMP9, así como también podría regular la esteroidogénesis estimulando la producción de P4 en células de la granulosa de ratas. El TIMP2 puede unirse a

MMPs activas e inhibir su actividad proteolítica (Boujrad y col., 1995; Woessner, 2000; Zhang y col., 2003).

Además de su papel potencial en la activación de pro-MMP2 y focalización de la actividad de MMP2 en la superficie celular, TIMP2 es más conocido por su capacidad para unirse a las MMPs e inhibir su actividad. La regulación de MMP2 y TIMP2 durante el período periovulatorio también es específica de especie. El ARNm de la MMP2 y la actividad enzimática se incrementan en el ovario de rata después de una dosis ovulatoria de hCG (Reich y col., 1991; Cooke, 1999), mientras que la expresión en ovario de ratón en respuesta a un estímulo ovulatorio es constitutiva (Hagglund y col., 1999). La expresión de TIMP2 es constitutiva en ovarios de rata (Curry y Nothnick, 2000) y ratón (Hagglund y col., 1999; Inderdeo y col., 1996) y en folículos preovulatorios de ovejas (Smith y col., 1995) después de un estímulo ovulatorio, pero se incrementa en las células de la granulosa de macacos (Chaffin y col., 1999). Diversos estudios han reportado que las condiciones estresantes y los GC cambian la expresión de las MMPs y los TIMPs en los diferentes tejidos (Szymanowski y col., 2011; Buckham Sporer y col., 2007; Cury y col., 2007; Yang y col., 2002). En los bovinos

1.4. Citoquinas en el proceso ovulatorio: Interleuquina 1 (L-1) e Interleuquina 4 (IL-4)

Las citoquinas son proteínas de señalización pequeñas y solubles, más conocidas por sus propiedades inmunorreguladoras, pero cada vez más reconocidas como factores de crecimiento que rigen la proliferación, diferenciación, función y destino de las células (Orsi y Tribe, 2008). Incluyen a las interleuquinas (ILs), factor estimulante de colonias (CSFs, del inglés: *colony stimulating factors*), factor de necrosis tumoral (TNFs, del inglés: *tumour necrosis factors*), factores de crecimiento transformantes (TGFs, del inglés: *transforming growth factors*) producidas por una amplia gama de tipos de células. Las citoquinas son fundamentales para el éxito reproductivo, creando un ambiente inmune-permisivo, embriotrófico que apoya la gametogénesis, la fertilización, el desarrollo embrionario temprano, la implantación de blastocitos y el crecimiento fetal (Knight and Glister, 2006; Orsi y Tribe, 2008; Forbes y Westwood, 2010; Arsenescu y col., 2011, Witkin y col., 2011). Muchos de los efectos de las citoquinas, como son proliferación celular, diferenciación celular, apoptosis, angiogénesis y producción hormonal, se evidencian en las distintas fases del ciclo ovulatorio, como la foliculogénesis, esteroideogénesis, la ruptura folicular y ovulación, la remodelación folicular con formación y posterior regresión del cuerpo lúteo (Inza y Van Thillo, 2011) (Figura 8). Se describen evidencias de que las citoquinas no solo actúan durante reacciones

inmunológicas sino también regulando otros procesos fisiológicos como la ovulación (Dhillon y col., 2006). Las citoquinas son mediadores que operan en redes en lugar de aislarse, exhibiendo características como pleiotropismo, sinergismo, antagonismo y redundancia funcional (Frankenstein

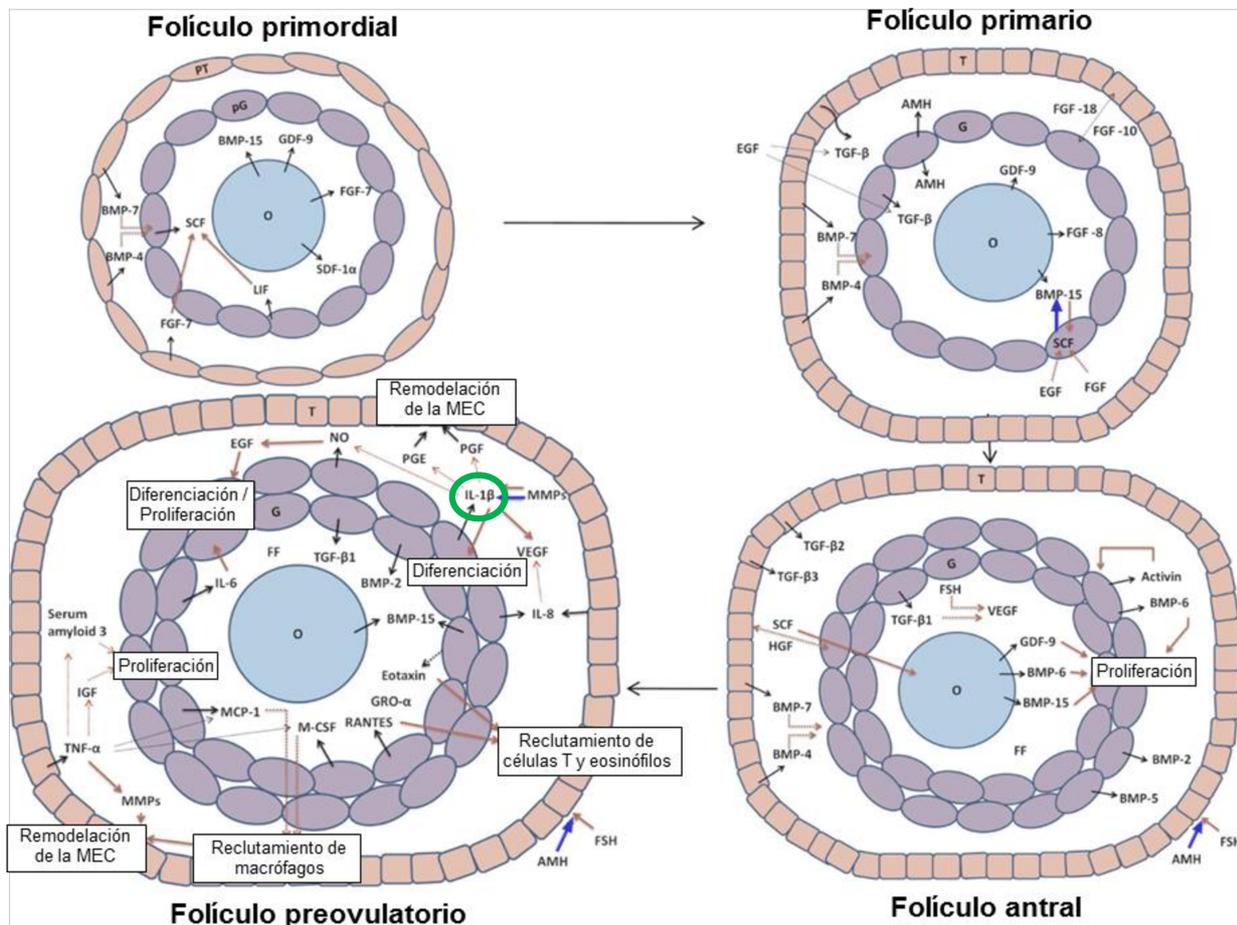


Figura 8. Representación esquemática de la implicancia de citoquinas a lo largo de la foliculogénesis. Interacciones y localizaciones basadas en foliculogénesis humana, con inferencias a partir de modelos animales. Las capas celulares se separan y reducen para mayor claridad. O: ovocito; PG: células pre-granulosa; G: células de la granulosa; PT: células pre-teca; T: células de la teca. Las flechas negras indican sitios de producción de citoquinas; Las flechas rojas sólidas indican interacciones positivas mientras que las flechas azules indican interacciones negativas. Las flechas punteadas indican interacciones presumidas; aquellas alineadas indican sinergismo potencial. Las citoquinas modulan la foliculogénesis en todas las etapas, aumentando el número de citoquinas conocidas hacia la ovulación. Destacada con un óvalo verde, una de las estudiadas en este trabajo (Adaptado de Field y col., 2014).

y col., 2006, Orsi, 2008, Orsi y Tribe, 2008). Por tanto, el efecto de cualquier citoquina dada no depende sólo de su concentración absoluta, sino más bien de un equilibrio entre sus propios efectos y los inducidos por otros mediadores locales, incluidas otras citoquinas (Orsi, 2008; Field y col., 2014).

1.4.1. Interleuquina 1 β

Uno de los mediadores más prominentes de la inflamación es la familia de la IL-1 (Mu y col., 2010). El sistema IL-1 está compuesto por dos ligandos bioactivos, IL-1 α e IL-1 β (Dinarello, 1994), dos tipos de receptores, el IL-1RI y IL-1RII; y el IL-1RA, este último que actúa como antagonista del receptor para IL-1, siendo su función principal la de regular la actividad biológica de IL-1 mediante una fijación competitiva en los receptores (Arend, 1991). Durante la foliculogénesis, la IL-1 promueve la proliferación y suprime la diferenciación, mientras que durante el proceso ovulatorio, IL-1 aumenta la producción local de eicosanoides, esteroides, metaloproteasas y sustancias vasoactivas para promover la ovulación (Brännström, 2004). Passos y col. (2016) evaluaron la expresión proteica y génica de los miembros del sistema de la IL-1 en los folículos ováricos bovinos y los efectos de la IL-1 β sobre la activación del folículo primordial y la supervivencia *in vitro*. Después de 6 días de cultivo, la IL-1 β (10 y 50 ng / ml) contribuyó a mantener la supervivencia temprana del folículo.

IL-1 β controla la transición de las células foliculares facilitando su proliferación y diferenciación (Brännström, 2004). En células de la granulosa de folículos bovinos se determinó que la IL-1 β modifica la síntesis de progesterona y estradiol (Baratta y col., 1996) y durante la ovulación incrementa la producción local de esteroides, MMPs y sustancias vasoactivas (Brännström, 2004). La producción de progesterona por las células de la granulosa bovinas aumenta *in vitro* debido a la IL-1 β (Baratta y col. 1996).

1.4.2. Interleuquina 4

La IL-4 se clasifica generalmente como una citoquina antiinflamatoria, pero puede tener efectos proinflamatorios, dependiendo del tejido y tipos de estímulos (Woods y Judd, 2008). El papel potencial de la IL-4 en la ovulación está íntimamente asociado con su capacidad para interactuar con el receptor alfa de IL-4 (IL-4R α) y suprimir la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α (Bonder y col., 1998).

Se ha confirmado la expresión de IL-4 e IL-4R en la glándula adrenal bovina y los efectos de IL-4 sobre la liberación de cortisol y andrógenos adrenales. Esto demuestra que en condiciones inflamatorias, existe una comunicación estrecha entre el sistema inmune y el endocrino, donde IL-4 juega un rol importante y coordinado con la respuesta de la adrenal a dicho estrés (Woods y Judd, 2008).

1.5. Enfermedad quística ovárica

Dentro de los trastornos reproductivos que afectan a los bovinos, la enfermedad quística ovárica (COD, del inglés *cystic ovarian disease*) constituye una de las causas más frecuentes de infertilidad y subfertilidad en vacas lecheras de alta producción, presentándose con menor frecuencia, en animales destinados a la producción de carne (Youngquist, 1986; Lopez-Díaz y Bosu, 1992; Garverick, 1997; Peter, 1997). Esta enfermedad es factible de presentarse en cualquier etapa de la lactancia (Bartolomé y col., 2005). La incidencia de COD en los rodeos lecheros varía desde un 5 a un 30% (Vanholder y col., 2006; Cattaneo y col., 2014, Ortega y col., 2015). El impacto económico de la COD está en directa relación con el alargamiento de los intervalos parto-concepción y parto-parto (Silvia y col., 2002; Peter, 2004), estimándose que cada evento de la enfermedad agrega entre 22 y 64 días al intervalo parto-concepción. A esto se le suma una mayor tasa de descarte de animales enfermos y un aumento directo en los costos en tratamientos veterinarios (Probo y col., 2011).

1.5.1. Definición

Existen numerosas revisiones en la manera de definir la COD, en este sentido, Silvia y col. (2002) caracterizan a la enfermedad con la presencia de quistes foliculares ováricos, con un diámetro mínimo de 17 mm, que persisten en el ovario más de 6 días en ausencia de CL y que interfieren con la ciclicidad ovárica normal. Por su parte, Wiltbank y col. (2002) la definen con la presencia de estructuras foliculares con un diámetro mayor o igual a 20 mm, con una persistencia de al menos 7 días en ausencia de CL. En el 2006, Vanholder y col., la definieron con la presencia de folículos de un diámetro de al menos 20 mm, presentes en uno o ambos ovarios en ausencia de cualquier tejido luteal activo y con interferencia de la ciclicidad ovárica normal. Sumándose a estas definiciones, Bartolomé y col. (2005) establecieron una definición que permite realizar un correcto diagnóstico a campo de la enfermedad sin la necesidad de hacer dos controles para definir el estado de persistencia folicular. En este sentido, definieron a la COD como la presencia de uno o múltiples folículos ováricos, en uno o ambos ovarios, de un diámetro de 18 mm o más, en ausencia de CL y con falta de tonicidad uterina a la palpación. La incorporación del concepto de tonicidad uterina es clave para diferenciar un folículo preovulatorio de un quiste, y se basa en las características del útero durante el proestro, en el cual aumentan los receptores de oxitocina y, por ende, aumenta

también la tonicidad en respuesta a las altas concentraciones de estrógenos. En el caso de quistes foliculares, la falla en la ovulación y la persistencia por varios días determinan la pérdida de los receptores de oxitocina y, por consiguiente, la falta de tonicidad. A la definición de COD se puede adicionar que los quistes ováricos no son estructuras estáticas, sino que pueden persistir, luteinizarse o atresarse. Además, de manera similar a lo que ocurre en vacas con ciclos estrales normales, las vacas con COD tienen ondas de crecimiento folicular que pueden terminar en una ovulación espontánea o en la formación de otro quiste. (Cook y col., 1990; Hamilton y col., 1995; Garverick, 1997; Bartolomé y col., 2005). La presencia de más de una estructura quística no es rara, en un estudio realizado por Silvia y col. (2002), el 47% de las vacas con quistes ováricos tuvieron 2 o más quistes en el momento de la detección. Es por ello que dichos autores consideraron que la condición poliquística es más frecuente en las vacas con quistes que la aparición de ovulaciones múltiples en vacas normales. Todas estas posibilidades que pueden ocurrir durante el desarrollo y persistencia de la COD evidencia el gran y complejo dinamismo de esta enfermedad.

1.5.2. Factores predisponentes

Dentro de los factores predisponentes se describen factores generales y específicos. Dentro de los factores generales se encuentran la *herencia* (Kesler y Garverick, 1982; Hooijer y col., 2001); *alta producción de leche* (Bartlett y col., 1986; Laporte y col., 1994; Hooijer y col., 2001; Rajala and Gröhn 1998); la *edad*, la tasa de COD aumenta con la edad (Garverick, 1997; Peter, 2004); el *período de lactancia*, la incidencia es mayor entre 40 y 150 días después del parto (Bierschwal, 1966; Romaniuk, 1972) o entre 31 y 60 días y entre 120 y 210 días después del parto (Bartlett y col., 1986; Bartolomé y col., 2005); el *índice de condición corporal* (CC), animales con CC superior a 4 (escala de 0 a 5) suelen presentar quistes con una frecuencia 2,5 veces superior, respecto a aquellas vacas cuya CC es menor o igual a 3 (Salvetti y col., 2007a); *estacionalidad*, tiene una distribución variable según la estación del año (Bartlett y col., 1986; Garverick, 1997; Peter, 2004; López-Gatius y col., 2002; Nelson y col., 2010). Dentro de los factores específicos se describen la *alimentación*, la privación aguda de energía está asociada a la supresión de la liberación pulsátil de LH (Diskin y col., 2003); otras *enfermedades*, incluyendo mastitis clínica, retención de placenta, endometritis, metritis, hipocalcemia y anestro posparto (Kesler y col., 1980; Bosu y Peter, 1987; Nakao y Grünert, 1990; Garverick, 1997; Cattaneo y col., 2014) y por último el *estrés*. El estrés se ha postulado como uno de los factores predisponentes más importantes de la

COD (Vanholder y col., 2006; Amweg y col., 2016). Los glucocorticoides (GC) son hormonas inducidas por el estrés y agentes antiinflamatorios que modulan la producción de citoquinas y prostaglandinas en diferentes procesos reproductivos (Amweg y col., 2016). La generación de GCs durante la ovulación ayudaría a limitar el proceso inflamatorio en el ovario (Hillier y Tetsuka, 1998; Andersen, 2002; Michael y col., 2003). Sin embargo, situaciones extremas podrían afectar el mecanismo ovulatorio normal, alterando el ciclo estral y bloqueando la ovulación (Amweg y col., 2017). Se ha demostrado que la ACTH aumenta la secreción endógena de cortisol, induciendo así la persistencia folicular y la formación de quistes en el ganado (Dobson y col., 2000; Salvetti y col., 2010; Amweg y col., 2013).

1.5.3. Etiopatogenia

La patogenia de la COD involucra un trastorno plurifuncional de la ovulación, siendo la hipótesis más aceptada aquella que postula que su desarrollo se asocia a un desequilibrio neuroendocrino a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal con la concomitante falla en la ovulación, luego de que uno o varios folículos de una onda de crecimiento folicular se desarrollan y superan el tamaño ovulatorio (Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000; Peter, 2004; Vanholder y col., 2006). Si bien se sabe que existen numerosos factores que influyen en la presentación de la enfermedad, descritos con anterioridad en este apartado, la etiopatogenia de la COD en vacas lecheras es un complejo proceso que involucra disfunciones en numerosos procesos fisiológicos del ovario, que incluyen a la foliculogénesis, esteroidogénesis y la ovulación. En este sentido, es aceptado actualmente que la persistencia de los folículos quísticos está relacionada a importantes cambios a nivel de componentes moleculares intraováricos (Silvia y col., 2002, Ortega y col., 2015). Asimismo, aunque diversos estudios han caracterizado la dinámica del crecimiento folicular, la comprensión de los cambios celulares y moleculares que ocurren dentro del ovario previo al proceso de anovulación aún es escasa.

1.5.3.1. Disfunción hipotálamo-hipofisaria

En esta hipótesis, la causa principal de la formación de quistes estaría relacionada con una liberación aberrante de LH desde la hipófisis, ya sea porque el pico preovulatorio de LH está ausente, la magnitud es insuficiente u ocurre en un momento inadecuado durante la maduración del FD. (Hamilton y col., 1995; Yoshioka y col., 1996; Vanholder y col., 2006, Díaz y col., 2015). Esta falla en la liberación de LH parece ser causada por una alteración en el mecanismo de

retroalimentación positiva de los estrógenos secretados por el folículo preovulatorio, lo cual resultaría en una falla en la liberación de GnRH y por ende, de su acción a nivel hipofisario (Vanholder y col., 2006). Las vacas con COD y con niveles elevados de estrógenos endógenos fallan en generar un pico de LH en respuesta a una dosis de E2 exógeno, indicando que se ha perdido la capacidad de responder a la retroalimentación positiva de los E2 sobre el eje hipotálamo-hipofisario (Zaied y col., 1981; Refsal y col., 1988; De Silva y Reeves, 1988). En este sentido, si la onda preovulatoria de GnRH/LH ocurre inoportunamente durante el crecimiento folicular, puede ocasionar la pérdida de sensibilidad del hipotálamo al efecto de retroalimentación positiva del E2, llevando a la anovulación y consecuente formación de quistes (Gümen y Wiltbank, 2002; Gümen y col., 2002). En un estudio realizado por Hamilton y col. (1995) se detectó una concentración promedio mayor tanto de LH como de E2 circulantes en las vacas con quistes, si se las comparaba con vacas con ciclos normales o con recuperación espontánea, sin registrar un pico preovulatorio de LH en las hembras con COD. La secreción aumentada de LH en las hembras bovinas con quistes podría estimular un incremento en el E2 y este incremento podría causar un aumento en la secreción de LH, creando así un efecto cascada que afectaría la respuesta ovárica a la secreción de LH. En resumen, una falta de sensibilidad a la retroalimentación positiva del E2 a nivel del hipotálamo, desencadenaría la falta del pico preovulatorio de LH debido al menor contenido de GnRH en el área preóptica-supraquiasmática, y los elevados niveles de la misma en el tallo hipofisario-eminencia media desde donde se libera LH de manera tónica. Como consecuencia, los niveles basales de LH durante la fase de crecimiento folicular serían más elevados (mayor frecuencia como resultado de un mayor contenido de GnRH en la eminencia media) y al momento de la ovulación, no habría niveles suficientes de GnRH en el centro cíclico (área preóptica-supraquiasmática) para inducir el pico preovulatorio de LH desde la hipófisis, conduciendo a la formación de quistes. Por otra parte, esos niveles basales persistentemente elevados de LH podrían actuar sobre los receptores de las células de la granulosa, estimulando el desarrollo folicular más allá del tamaño ovulatorio (Vanholder y col., 2006; Salvetti y col., 2007a).

Con respecto al rol de los niveles de P4 en la formación de los quistes, Hatler y col. (2003) encontraron que el 66% de las vacas con quistes foliculares tenían concentraciones plasmáticas intermedias de P4 (0,1-0,93 ng/ml) al momento de la detección del quiste. En otro estudio, Vanholder y col. (2005), evidenciaron que al momento de la formación, solamente un 25% de los quistes fueron asociados con niveles intermedios de P4 (0,3-2 ng/ml), siendo estas concentraciones capaces de bloquear el pico preovulatorio de LH y la ovulación. Un estudio más reciente realizado

por Probo y col. (2011) determinó que las concentraciones de P4 en todos los animales con COD evaluados, se mantenía en niveles intermedios (0,3 a 1,2 ng/ml). Precisamente, el efecto de estas concentraciones intermedias de P4 (por encima de los niveles basales aunque insuficientes para inducir la regresión de un folículo dominante y el inicio de una nueva onda) sería inhibir la ovulación, bloqueando el pico de LH y aumentando su frecuencia pulsátil. Sin embargo, esta hipersecreción basal de LH no se asociaría a las causas de formación de los quistes sino a su crecimiento y persistencia a lo largo del tiempo. En este sentido, algunos autores definen a la persistencia como una etapa en el desarrollo de los quistes (Cook y col., 1990; Hamilton y col., 1995; Ortega y col., 2015).

1.5.3.2. Disfunción ovárica

Aunque diversos estudios han caracterizado la dinámica del crecimiento folicular, aún es escasa la información de las modificaciones celulares y moleculares ocurridas en el folículo ovárico previo al proceso de anovulación (Wiltbank y col., 2002; Salvetti y col., 2007a; Ortega y col., 2015). En nuestro grupo de trabajo se han descrito alteraciones en la producción de factores de crecimiento por parte de células de la granulosa (Ortega y col., 2008; Rey y col., 2010; Rodríguez y col., 2015), en sus proteínas de unión (Rodríguez y col., 2011; 2013) así como también, síntesis aberrante de proteínas en la MEC de los quistes (Salvetti y col., 2004). Una disfunción primaria a nivel del folículo puede provocar una disrupción del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y causar la formación del quiste (Vanholder y col., 2006). De este modo, las variaciones en la expresión y en el número de receptores de hormonas hipotálamo-hipofisarias así como de hormonas esteroides, parecen estar implicadas en la anovulación del FD. En este sentido, se ha sugerido que alteraciones en la expresión de receptores de gonadotrofinas podrían ser un factor relevante en el desarrollo de los quistes (Kawate y col., 1990; Calder y col., 2001; Wiltbank y col., 2002). De acuerdo con Kawate y col. (1990), el número de receptores de FSH y LH en las células de la granulosa de los quistes se redujo en comparación con los folículos normales. Recientemente, Marelli y col. (2014) estudiaron la expresión del ARNm de los receptores de gonadotrofinas, LHCGR (receptor de hormona luteinizante/coriogonadotrofina) y FSHR, detectando menores niveles en las células de la granulosa de quistes que aquellos detectados en todos los estadios de desarrollo folicular en los controles. En contraste, los niveles de expresión de receptores de gonadotrofinas en células de la teca de quistes fueron menores que los encontrados en folículos antrales grandes. De la misma forma, se han determinado desbalances en la expresión de los receptores de estrógeno (ESR) en los componentes del folículo ovárico que podrían también estar involucrados en la patogénesis de la

formación de quistes en vacas (Garverick 1997, Salvetti y col., 2007b, 2012, Alfaro y col., 2012), oveja (Ortega y col., 2009), humanos (Shushan y col., 1996, Jakimiuk y col., 2002) y roedores (Salvetti y col., 2009). Además, estudios realizados en vacas con COD inducida con ACTH mostraron cambios en la expresión del receptor de estrógenos-2 en los folículos quísticos, y no así en los folículos controles, lo que coincide con los hallazgos realizados en animales con COD espontánea. En este último grupo también fue hallado un incremento en la expresión de receptor de estrógenos-1 (Salvetti y col., 2007b, 2012; Alfaro y col., 2012; Ortega y col., 2015). Estos cambios en los niveles de expresión de ESR-1 y ESR-2 podrían alterar el desarrollo folicular y la ovulación (Mosselman y col., 1996; Pettersson y col., 1997), al modificar la proliferación y apoptosis celular, la expresión de receptores hormonales, la esteroidogénesis y diversos aspectos moleculares de la COD (Velázquez y col., 2011; 2013; Ortega y col., 2015).

Tratando de dilucidar el mecanismo de formación de los quistes se han desarrollado estudios evaluando la acción del estrés a nivel ovárico proponiendo que la acción de los GC sobre la función ovárica podría ser antagónica a la función reproductiva (Acosta y col., 2005) y contribuir a la formación de quistes (Baravalle y col., 2007), ejerciendo un efecto directo sobre las células de la granulosa, reduciendo la producción de esteroides gonadales, prostaglandinas y la expresión de receptores de LH (Kawate y col., 1990; Kol y col., 1998). Se cree también, que el cortisol producido en condiciones de estrés podría ser almacenado en el líquido folicular e inducir cambios notables en la esteroidogénesis y expresión de LHR a nivel de la pared folicular, contribuyendo al desarrollo de COD (Moberg, 1991). De la misma forma, y como se describe anteriormente, la ovulación es un proceso inflamatorio caracterizado por un incremento en la síntesis de interleuquinas y prostaglandinas (Espey, 1980; Ando y col., 1998). Un incremento en la producción de GC antiinflamatorios durante la ovulación, en respuesta a situaciones de estrés, podría limitar este proceso inflamatorio en el ovario (Hillier y col., 1998; Michael y col., 2003; Acosta y col., 2005). Se ha comprobado que un estímulo con ACTH es capaz de estimular la secreción de cortisol en cultivos celulares de pared folicular bovina (Wiltbank y col., 2002; Amweg y col., 2011; 2013). Además, la disponibilidad de cortisol activo en los tejidos blanco es regulada por la expresión relativa de dos enzimas 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-1 y -2 (11 β HSD-1 y -2), que respectivamente catalizan la activación e inactivación del cortisol en el ovario bovino. Amweg y col. (2013) documentaron la expresión de estas dos enzimas en las paredes de folículos quísticos, donde tanto quistes espontáneos a campo como inducidos con ACTH mostraron inmunomarcación positiva para las dos enzimas, siendo la 11 β HSD-1 la que mostró un nivel mayor de expresión en

células de la granulosa en relación a los folículos terciarios controles. Asimismo, Amweg y col. (2011) demostraron expresión de ARNm que codifica a MCRs en la pared de folículos ováricos, a los cuales se une la ACTH para ejercer su efecto. Estos trabajos evidencian que los folículos ováricos podrían estar expuestos a altas concentraciones activas de GC, ejerciendo así un rol local en la etiopatogenia de la COD. Además, en trabajos recientes de nuestro grupo de trabajo, se ha propuesto al ovario bovino como productor de GC *de novo* (Amweg y col., 2017).

Otros componentes importantes en el control de la actividad ovárica son los miembros de la superfamilia del TGF- β , que actúan como moléculas regulatorias intraováricas involucradas en la proliferación y diferenciación celular, esteroidogénesis, maduración ovocitaria y función del cuerpo lúteo. En este sentido, Stangaferro y col. (2014) evaluaron la expresión de activina, inhibina y foliculostatina en animales con COD inducida con ACTH, con COD espontánea y en controles. Se determinó que existe un incremento en la expresión de la subunidad alfa de activina A/inhibina A, la subunidad alfa de inhibina y foliculostatina en las células de la granulosa de los animales con COD espontánea, y una disminución en las concentraciones de inhibina B ($\alpha\beta$ B) en el líquido folicular. Por otro lado, Matiller y col. (2014), evaluaron la participación de tres isoformas del TGF- β (isoformas TGF- β 1, 2 y 3) en los mismos grupos de animales y hallaron un incremento en la expresión de TGF- β 1 y TGF- β 2 en los animales con COD espontánea en relación a los folículos antrales y atrésicos del grupo control. Además, la expresión de las tres isoformas se presentó alterada durante la foliculogénesis en los animales con COD espontánea e inducida con ACTH. Estos hallazgos establecen alteraciones importantes en los sistemas activina-inhibina-foliculostatina y del TGF- β que pueden conducir a trastornos en las funciones dependientes de los mismos a nivel folicular, favoreciendo la persistencia folicular y la formación de quistes. Es importante destacar que en estudios recientes se evaluaron las metaloproteasas y sus inhibidores en los quistes foliculares, demostrando alteraciones en estas entidades patológicas (Mutlag y col., 2015).

La expresión y mecanismo de acción de numerosos factores intraováricos han sido analizados en ovarios de numerosas especies bajo circunstancias fisiológicas, no así en situaciones patológicas evidenciando una escasa información disponible en la bibliografía. Una de las dificultades en el estudio de la etiología de la COD es diferenciar las causas del desbalance endocrino que están asociadas a ella. En este sentido, las muestras obtenidas en frigorífico, con las que frecuentemente se trabaja debido a la accesibilidad en la obtención de las mismas, suelen

encontrarse “contaminadas” por los numerosos e infructuosos tratamientos a los que fueron sometidos los animales. A esto se le suma la ausencia de datos disponibles relacionados con una historia reproductiva y de manejo, siendo estos datos fundamentales para un correcto análisis e interpretación de la etiopatogenia de una enfermedad. Diversos modelos han ayudado a entender los cambios endocrinos asociados a los trastornos ováricos. Sin embargo, la mayoría se han utilizado para el estudio de los quistes ya formados, sin poder establecer como un folículo en desarrollo puede fallar en su ovulación, persistir en el ovario y formar finalmente un quiste. Entendiendo esto, y considerando que se postula al estrés como un factor etiopatogénico, resulta de gran utilidad el empleo de modelos de inducción de estrés para la evaluación de los procesos previos a la formación de los quistes ováricos en condiciones más controladas, pudiendo correlacionar las distintas variables entre la enfermedad de presentación espontánea con lo ocurrido en el modelo experimental.

Hemos descripto la importancia del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal manifestado a través de las funciones de las hormonas gonadotróficas, esteroides, y el rol preponderante de los factores locales y sus vías de señalización en el funcionamiento normal del ovario. Además, se han caracterizado algunas de las rutas y cambios metabólicos endocrinos, paracrinos y autocrinos que interaccionan para determinar la complejidad y dinamismo que presentan los folículos persistentes que van a dar lugar a la aparición de la COD.

La comprensión de los mecanismos de control implicados en el crecimiento folicular en ovarios bovinos es altamente relevante y contribuirá a explicar los procesos que ocurren durante situaciones patológicas que afectan la ciclicidad ovárica normal del ganado. Además, esto permitirá aumentar el caudal de conocimientos hasta ahora comprendidos en la formación inicial de folículos persistentes como base de la etiopatogenia de la COD y en consecuencia tomar acciones preventivas para mejorar el sistema reproductivo y en consecuencia, productivo del sistema lechero.

2. *Objetivos*

2.1. Objetivo general:

Analizar la expresión y localización intraovárica específica de las principales enzimas efectoras de la cascada inflamatoria asociada a la ovulación, procurando esclarecer la posible acción del estrés como agente patogénico de la Enfermedad Quística Ovárica (COD: del inglés *Cystic Ovarian Disease*) bovina.

2.2. Objetivos específicos:

1. Caracterizar la expresión de Metaloproteasas de Matriz (MMP) 2, 9, y 14 , como enzimas efectoras asociadas a los procesos inflamatorios de mayor relevancia funcional, en los diferentes compartimientos del folículo ovárico bovino, y establecer relaciones con la dinámica folicular.

2. Caracterizar la expresión de los Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas (TIMP) 1 y 2 como agentes reguladores de la remodelación de la Matriz Extracelular (MEC) de relevancia funcional en el ovario, en los diferentes compartimientos del folículo ovárico bovino, y establecer relaciones con la dinámica folicular.

3. Evaluar en un modelo experimental de estrés *in vivo* el efecto de la ACTH sobre el folículo preovulatorio y la dinámica folicular mediante la evaluación de la expresión de los genes previamente detallados así como también citoquinas involucradas en el proceso ovulatorio.

4. Evaluar *in vitro*, en cultivos de pared folicular ovárica bovina, el efecto de la ACTH sobre la expresión de las MMP2 y MMP9.

5. Caracterizar la expresión de las proteínas detalladas previamente en muestras provenientes de bovinos con COD, procurando establecer un patrón de expresión y localización asociado a esta enfermedad.

3. *Materiales y Métodos*

3.1. Procedimientos generales efectuados con animales

Los procedimientos con animales fueron realizados de acuerdo a la guía internacional de la FASS (Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching. Tercera Edición. Federation of Animal Science Societies. 2010). A su vez, el protocolo fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética y Seguridad de la FCV-UNL en el marco del proyecto PICT 2011: “Análisis de los componentes de la cascada inflamatoria asociados con la ovulación y estudio del estrés como factor etiopatogénico de alteraciones reproductivas en bovinos” (director: Dr. Hugo Ortega) bajo el número 84/11. Para los modelos experimentales se utilizaron vacas de la raza Holando Argentino, en lactancia y/o con destino de faena, que no presentaran alteraciones reproductivas y con el aval del productor y médico veterinario de los establecimientos lecheros de procedencia, ubicados en la zona rural cercanos a la FCV-UNL.

3.1.1. COD espontánea

Se realizó la identificación de casos de COD espontánea a través de controles reproductivos de rutina en rodeos comerciales de la zona, mediante la cooperación de numerosos profesionales del área de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral. Estos médicos veterinarios nos informaron al primer indicio de alteraciones foliculares compatibles con COD, las cuales fueron verificadas por nosotros mediante ultrasonografía (transductor lineal transrectal 5 MHz, Honda HS101V, Japón), teniendo en cuenta para su correcto diagnóstico la definición de COD reportada por Bartolomé y col. (2005) (Figura 9).

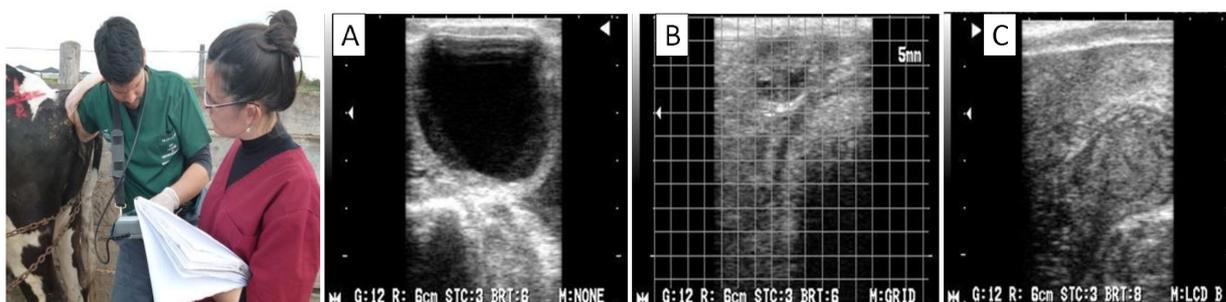


Figura 9. Diagnóstico ecográfico de COD. A: ovario con un quiste folicular, B: ovario contralateral con escaso desarrollo folicular. En ambos ovarios no se detecta la presencia de cuerpo lúteo (en la imagen se aprecia la grilla de medición), C: cuerno uterino con ausencia de tono a la palpación transrectal.

A partir del diagnóstico de COD y dependiendo de la categoría de los animales, se tomaron dos tipos de muestras: ovarios enteros (de vacas en lactancia con indicación de rechazo por motivos no reproductivos) o líquido folicular rico en células de la granulosa (en vacas en lactancia sin indicación de rechazo). La obtención de ovarios enteros se efectuó mediante ovariectomía bilateral, mientras que la obtención de líquido folicular se realizó por aspiración folicular guiada por ecografía, técnicas detalladas más adelante en este apartado.

Sumado a esto, y para un posterior análisis en trabajos que se desarrollaron en paralelo dentro de nuestro grupo, en todos los casos se tomaron muestras de sangre por punción de vasos coccígeos y se confeccionó una anamnesis completa del animal, recabando datos sobre la alimentación, niveles de producción, manejo, índices de productividad y reproductivos. Además, durante estas mismas visitas se tomaron muestras de animales controles, considerándose como tales, a vacas que en comparación con el caso de COD, tenían el mismo número de lactancias, la misma edad, se encontraban en el mismo momento de la lactancia (días en lactancia, DEL), pertenecían al mismo lote y no presentaban ningún tipo de enfermedades.

3.1.2. Modelo experimental de inducción de estrés mediante la administración de ACTH.

Para el mismo se utilizaron 16 vacas de la raza Holando Argentino, examinadas clínica y ultrasonográficamente por vía transrectal, antes del comienzo de la experiencia para comprobar la ausencia de alteraciones clínicas del tracto reproductor y regularidad de sus ciclos estrales. Las mismas fueron mantenidas durante el ensayo, en sus respectivos rodeos productivos.

El desarrollo del protocolo experimental se realizó en tres réplicas de manera tal de poder obtener muestras para la totalidad de los estudios que se efectuaron.

Los animales destinados al desarrollo del protocolo experimental fueron aleatoriamente asignados en dos (2) grupos. Los ciclos estrales de todos los animales fueron sincronizados utilizando el protocolo G6G-ovsynch, con algunas modificaciones (Pursley y col., 1995; Bello y col., 2006). Para la selección del protocolo de sincronización a utilizar se combinaron las características de dos protocolos muy utilizados en la producción lechera de la región (cuenca lechera de la provincia de Santa Fe): el G6G (de presincronización) y el ovsynch (de sincronización de ciclos estrales).

El diseño experimental consistió en la administración de 150 µg de un análogo sintético de PGF2α (Enzaprost, Biogénesis-Bagó S.A.®) seguida de una segunda dosis de PGF2α a las 12 horas para asegurar una completa luteólisis (Hatler y col., 2008). Pasados dos días se administraron 20 µg de un análogo sintético de GnRH (Gonaxal, Biogénesis-Bagó S.A.®) y seis días después, correspondiéndose con el comienzo del ovsynch, se administró una segunda dosis de esta hormona. Siete días después, se inyectaron dos dosis de PGF2α separadas por 12h (Figura 10). En cada réplica se procedió de la misma manera. Sobre los animales de ambos grupos se realizaron ecografías periódicas para selección de animales a tratar, y toma de muestras de sangre para distintas mediciones hormonales. En el grupo tratado con ACTH, las muestras de sangre fueron tomadas a partir del día 15 (tomando como día 0 el comienzo del protocolo G6G-Ovsynch), previo al tratamiento de cada animal; en el grupo control, dichas muestras se tomaron el día 18 del protocolo. Se realizaron ovariectomías bilaterales por flanco izquierdo al momento previo al esperado de ovulación (día 19).

Los animales del grupo control no recibieron tratamientos adicionales a los ya descritos para la sincronización del ciclo estral. A los animales del grupo de animales tratados se les administró ACTH de acuerdo a lo descrito previamente por Biran y col. (2015), con algunas modificaciones. El protocolo consistió en la aplicación de 100 UI de ACTH (formulación realizada a partir de adrenocorticotrofina porcina liofilizada provista por Laboratorios ELEA-Buenos Aires, Argentina) intramuscular cada 12 horas a partir del día 15 del ciclo estral, coincidente con la primera dosis de PGF2α, hasta el día esperado de ovulación (día 18 del protocolo de la FCV-UNL). Se tomaron muestras de sangre cada 12 horas desde el día de la última aplicación de PGF2α (día 15 del protocolo) hasta el final del protocolo (día 18 inclusive, previo al momento de la cirugía) en los animales controles y tratados; se almacenaron a -80°C hasta la medición de cortisol sérico.

Los exámenes ultrasonográficos de los ovarios fueron realizados en todos los animales, empleando un ecógrafo portátil equipado con un transductor lineal transrectal de 5 MHz HS101V (Honda, Tokio, Japón). La efectividad del protocolo de sincronización fue monitoreada mediante ultrasonografía los días 0, 2, 8 y 15. Además, se realizaron ecografías diarias desde el día de la última administración de PGF2α hasta el día esperado de ovulación, tanto en los animales controles como así también en los tratados con ACTH (Figura 10). Mediante el monitoreo se caracterizó el crecimiento de los folículos preovulatorios, así como también los CLs (según corresponda).

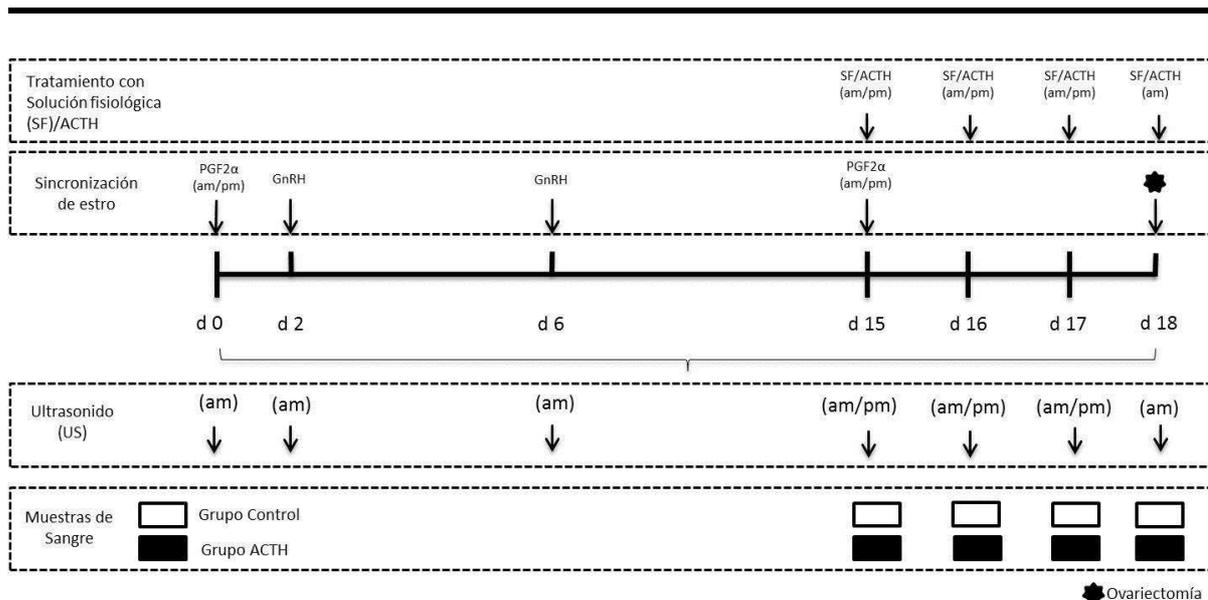


Figura 10 Protocolo de inducción de estrés mediante administración de adrenocorticotrofina (ACTH). Se indican tratamientos hormonales, seguimiento con ultrasonografía (US), momentos de muestreo de sangre (MS), y de la ovariectomía bilateral. SF: Solución fisiológica.

3.2. Técnicas utilizadas para la obtención de muestras *in vivo*

3.2.1. Aspiración de líquido folicular guiada por ecografía

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



Figura 11. Técnica de aspirado folicular guiado por ecografía. A: Anestesia epidural; B: Ecógrafo y sonda transvaginal; C: Bomba de aspiración; D: Momento del aspirado; E: Tubo colector falcón con líquido folicular luego de la extracción.

3.2.2. Ovariectomía bilateral

Para la obtención de los ovarios se utilizaron dos técnicas diferentes de acuerdo al momento y tipo de animales. En ciertas vacas controles y con COD se realizó la ovariectomía transvaginal, utilizándola principalmente en vacas adultas, ya que la maniobrabilidad en el espacio vaginal es mucho mayor que en vaquillonas. En otros casos, se utilizó la técnica de ovariectomía por laparotomía con abordaje por flanco izquierdo, principalmente en animales de menor tamaño.

3.2.2.1 Técnica por colpotomía (transvaginal)

La ovariectomía bilateral por colpotomía se realizó a través de abordaje transvaginal con el animal en pie (Figura 12), para lo cual en primer lugar se realizó una sedación con 150 mg totales de clorhidrato de ketamina (Ketamina 50%, Hollyday Scott®) y se efectuó anestesia epidural baja con 100 mg totales de clorhidrato de lidocaína (Lidocaína 2%, Chinfield®). En segundo lugar, se realizó la limpieza y desinfección del área perineal y de la

cavidad vaginal con una solución de cloroxilenol (5%). Mediante un tensor de vagina se posicionó a ésta craneoventralmente alejando su pared dorsal del recto, posteriormente con un bisturí de hoja oculta se incidió unos 2 cm el techo de la vagina y el peritoneo. Se continuó con la divulsión de la incisión hasta lograr una abertura que permitió introducir una mano dentro de la cavidad pélvica, se localizaron y retrajeron los ovarios dentro de la vagina y se colocó una pinza hemostática Kocher modificada *ad hoc* (sin dientes) en el pedículo ovárico. A continuación se realizó la ligadura del mismo y los vasos contenidos en él (arteria y vena ovárica) por transfixión con hilo no absorbible simple (lino N°14), atravesando el pedículo ovárico con una aguja semicircular traumática enhebrada, dejando solo el hilo simple a través del tejido. Posteriormente se desenhebró la aguja y se realizó el primer seminudo que tomó la mitad del pedículo, luego se rodeó la totalidad del tejido a ligar con una nueva lazada y se realizó el último nudo, logrando así una buena manipulación, tensión y fijación de los nudos. Luego se procedió a la sección y extracción de ambos ovarios. Para evitar rupturas de las estructuras foliculares, previo a la ovariectomía se realizó la extracción del líquido folicular mediante el sistema de aspiración anteriormente descrito. Finalmente los animales fueron tratados con antibióticos, coagulantes, antiinflamatorios/analgésicos y antiparasitarios externos.



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

3.2.2.2. Técnica de laparotomía por flanco izquierdo

Para la escisión bilateral de los ovarios mediante laparotomía por flanco izquierdo con el animal en pie, primero se realizó la sedación mediante la aplicación por vía subcutánea de 0,5 ml (0,1 mg totales) de Xilacina 2% (Xylacina 2%[®] Alfasán) y luego se realizó anestesia local infiltrativa según la técnica de Magda modificada, utilizando 160 ml de clorhidrato de lidocaína (2%) (Lidocaína 2%, Chinfield[®]). Se procedió a realizar una incisión desde dorso-caudal hacia ventro-craneal de la piel del flanco izquierdo, así como del tejido subcutáneo, fascias y planos musculares que se encuentran por debajo de la misma, para permitir el acceso a cavidad abdominal. Una vez dentro de la cavidad se continuó con la técnica descrita en el apartado anterior hasta la obtención de los ovarios. Posteriormente se prosiguió con la sutura de los planos musculares con hilo de nylon N°50 y puntos simples en “X”, y de la piel con hilo de nylon N°60 realizando una sutura continua de Reverdin (Garnero y Perusia, 2002) (Figura 13). Para finalizar, los animales fueron tratados con antibióticos, coagulantes, antiinflamatorios/analgésicos y antiparasitarios externos y con seguimiento médico periódico hasta su alta clínica.



Figura 13. Técnica de ovariectomía bilateral por laparotomía por flanco izquierdo. A y B: equipo de trabajo. C y D: animales dados de alta clínico, post-quirúrgico.

3.2.3. Obtención de muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de los vasos coccígeos, para extracción de suero y plasma., el suero se utilizó para determinar los niveles de 17- β estradiol, Progesterona, Testosterona y Cortisol, mientras que el plasma se almacenó para estudios posteriores.

Para la extracción de sangre se utilizaron agujas 18G (calibre 25 mm x 1,2 mm) acopladas a jeringas de 10 ml. Se procedió a punzar aleatoriamente la arteria y/o las venas coccígeas medias en la región ventral de los cuerpos de las primeras vertebrae coccígeas, previa higienización de la región a punzar (figura 14).

Se extrajeron 20 ml de sangre, de los cuales 10 ml se los depositaron en tubos de Khan sin anticoagulante, y otros 10 ml en tubos de Khan con anticoagulante EDTA en una dosis de 1 gota cada 5 ml de sangre entera, para la posterior obtención de suero y plasma sanguíneo respectivamente. Las muestras de sangre fueron conservadas a temperatura ambiente (22-25 °C) por 30 min, luego colocadas a 4-8 °C por 1 h y finalmente centrifugadas a 1500g por 20 min. El suero y plasma obtenidos fueron separados y conservados a -80 °C hasta su análisis.

3.2.4. Recolección y preparación de muestras de tejido ovárico

Los ovarios obtenidos fueron destinados a la realización de exámenes histológicos y de determinación de las proteínas de interés. Tanto los ovarios, como las estructuras foliculares de interés fueron medidos y fotografiados.

Luego se obtuvieron muestras de pared folicular de folículos preovulatorios controles y de folículos preovulatorios de animales tratados con ACTH para posteriores evaluaciones.

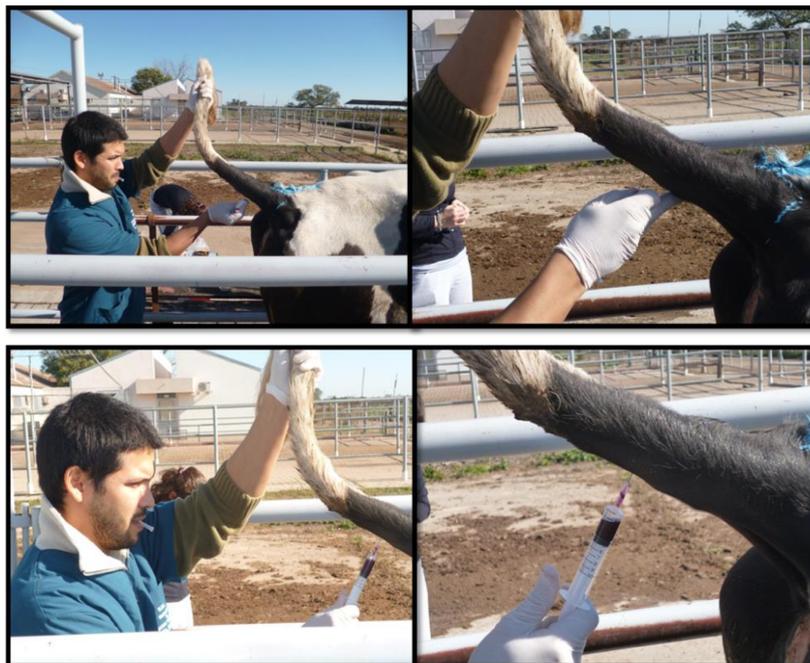


Figura 14. Extracciones de sangre por punción de los vasos coccígeos.

3.3. Evaluación *in vitro* mediante cultivos de pared folicular completa

Con la finalidad de estudiar la respuesta de la pared como un todo, incluyendo las interacciones entre teca y granulosa, se tomaron diferentes porciones de folículos de ovarios bovinos obtenidos en playa de faena, las que se utilizaron como controles o fueron sometidas a tratamientos hormonales, como previamente se describió en nuestro grupo de trabajo (Amweg y col., 2011 y 2013).

Se realizaron visitas programadas al Frigorífico Recreo (Ciudad de Recreo, Santa Fe), donde se procedió a la recolección de ovarios con folículos terciarios dentro de los 20 minutos de muerte de los animales en la playa de faena (Figura 15). Los ovarios se obtuvieron de 40 hembras bovinas de raza Holando Argentino, evaluadas visualmente como vacas no preñadas, sin la presencia de anormalidades macroscópicas del sistema reproductivo y sin un cuerpo lúteo activo. Inmediatamente los ovarios fueron colocados en un termo conservador con solución fisiológica estéril entre 30 a 37 ° C y trasladados al laboratorio.

Bajo cabina de seguridad biológica, se lavaron los ovarios con buffer fosfato salino (PBS) estéril. Previo a la disección de los ovarios, se midió con calibre el diámetro de los diferentes folículos. Se procedió a la obtención de los folículos antrales grandes con la ayuda de un bisturí. Se utilizaron un total de 6 folículos terciarios grandes (las piezas de tejido fueron cultivadas en medios de cultivos como se explica más adelante en esta sección). Cada folículo se seccionó en 2 porciones de aproximadamente 100 mg cada una, una porción destinada al tratamiento con ACTH y otra para control basal. Los folículos que presentaban atresia aparente (por ejemplo: detritus en el antro) fueron descartados.



Figura 15. Ovarios provenientes de playa de faena. Ovarios sanos con folículos terciarios grandes y sin CL activo.

Las distintas porciones de tejido se colocaron en placas de cultivo (Nunc plate, Applied Scientific®, South San Francisco, CA, USA) de 24 pocillos (1,5 ml medio/pocillo) y

en medio de cultivo buffer bicarbonato Krebs-Ringer pH 7,4 (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM; KH_2PO_4 1,2 mM, MgSO_4 1,2 mM, CaCl_2 25 mM; NaHCO_3 , 2,5 mM, glucosa 11,5 mM, albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *bovine seric albumin*) 0,1% y ácido ascórbico 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; todos obtenidos de Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). El medio de cultivo, fue equilibrado previamente durante 2 horas en una estufa de cultivo (Forma Scientific 3154 Water-Jacketed Incubator, 178 Asheville, NC, USA) gaseada con 95% O_2 y 5% CO_2 a 37°C. Las placas preparadas de esta manera se incubaron durante 20 minutos.

Luego del pre-cultivo, una de las porciones de tejido de los distintos folículos terciarios se suplementó con 100 nM de ACTH (Laboratorios ELEA®, Buenos Aires, Argentina) en medio de cultivo, durante 7 horas a 37°C. Esta concentración fue descrita en estudios previos de nuestro grupo de trabajo como inductora de una respuesta de elevada secreción de cortisol de folículos antrales, en cultivos de pared folicular *in vitro* (Amweg y col., 2011; Amweg y col., 2013). La porción de tejido usada como control (secreción basal) se incubó de la misma manera pero sin el estímulo de ACTH. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se aspiró el medio de cultivo y se extrajo el tejido de cada pocillo, para ser procesados como se explica más adelante y se los guardó a -80°C hasta la realización de los ensayos pertinentes (Amweg y col., 2017).

3.4. Procesamiento de las muestras

Los distintos tipos de muestra provenientes de casos de COD espontánea a campo, del modelo experimental, de los ovarios provenientes de frigorífico y de los animales controles fueron procesados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA) del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL)/CONICET.

Las muestras fueron acondicionadas para su posterior utilización, según la finalidad en las distintas técnicas aplicadas en este trabajo (Figura 16).

a) Muestras de líquido folicular (LF), obtenidas por aspiración folicular guiada por ecografía de COD espontánea a campo o mediante aspirado con jeringa (1 ml) y aguja (25G) en folículos intactos de ovarios enteros obtenidos por ovariectomía (de ovarios: quísticos, del modelo experimental o controles). Una vez recolectado el LF fue centrifugado (ver punto siguiente) para separar las células foliculares contenidas en él. Luego, el LF fue conservado a -80°C hasta su utilización para mediciones hormonales o en el caso de algunas enzimas

(MMP2 y MMP9), para la evaluación de su actividad mediante zimografía.

b) Muestras de pared folicular, tanto de quistes foliculares espontáneos como de folículos preovulatorios (animales control y tratados), así como también de ovarios obtenidos en playa de faena (Parrott y Skinner, 1998). Todas estas muestras fueron conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento (extracción de proteínas para la técnica de western blot), a excepción de los ovarios de frigorífico (ver más adelante).

c) Luego de la extracción de las muestras de pared folicular y de líquido folicular, los ovarios enteros obtenidos por ovariectomía fueron acondicionados y fijados en formaldehído bufferado (4%) durante 8-12 hs a temperatura ambiente y se procesaron siguiendo protocolos de rutina para su inclusión en parafina.

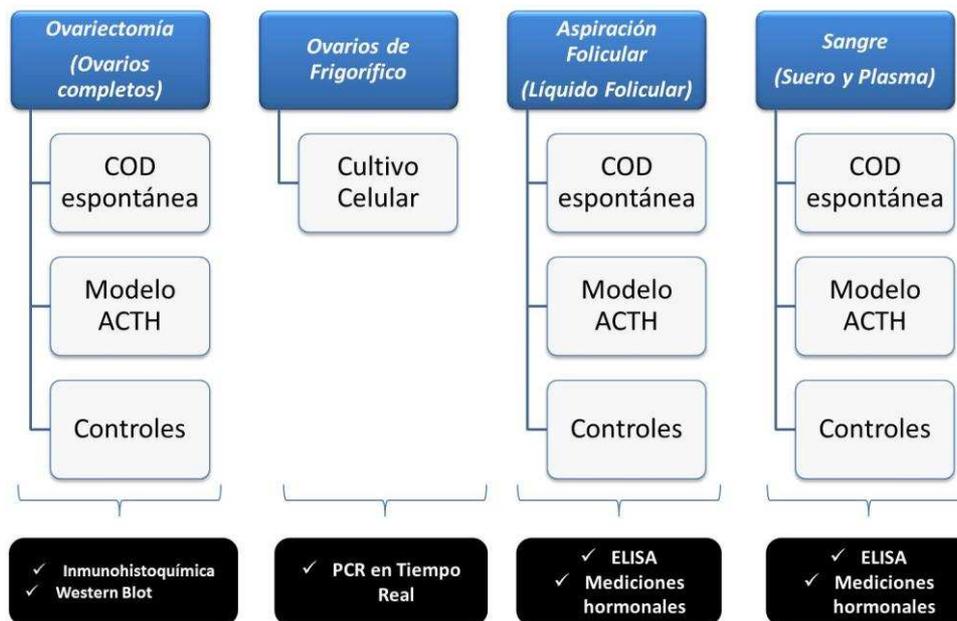


Figura 16. Esquema de la procedencia y destino de las muestras obtenidas.

3.4.1. Procesamiento del líquido folicular rico en células de la granulosa

El LF proveniente de ovarios de animales con COD espontánea, animales tratados y controles, luego de ser obtenido como se describió previamente, fue transportado en condiciones de refrigeración al laboratorio, centrifugado por 10 minutos a $2700g$ (centrifuga refrigerada IEC Multi RF, Thermo, USA). Se separó el LF de las células contenidas en él, seguidamente el mismo fue separado del pellet de células foliculares y se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.2. Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas

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

Se efectuaron cortes seriados de 4µm de espesor con un micrótomo rotativo (Leica Biosystems, Illinois, USA), se montaron en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropil-triethoxisilane (Sigma, USA), y luego se secaron en estufa a 37°C durante 24 horas. Para hacer una caracterización inicial y evidenciar la morfología de las distintas estructuras ováricas se utilizó la coloración de hematoxilina-eosina.

3.4.3. Procesamiento de las muestras para la técnica de western blot

Se tomaron fracciones de aproximadamente 60 mg de pared folicular de folículos antrales pequeños y grandes sanos, que fueron colocadas en buffer RIPA (del inglés: *radioimmunoprecipitation assay buffer*) con inhibidores de proteasas, y homogeneizadas con un homogeneizador de mano Ultra Turrax®. El sobrenadante se obtuvo luego de centrifugar las muestras a 14000g en centrifuga refrigerada durante 20 minutos. Una vez obtenidos los extractos de proteínas se determinó la concentración proteica de cada muestra mediante espectrofotometría usando un espectrofotómetro (SPECTROstar Nano, BGM / LABTECH, Ortemberg, Alemania). Previamente a las lecturas, se utilizó un patrón de referencia para realizar la curva de calibrado.

3.4.4. Procesamiento de las muestras para reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

3.4.4.1. Purificación de ARN

El ARN total fue aislado de pellets de células foliculares provenientes de las muestras de líquido folicular de los folículos preovulatorios controles y de quistes foliculares del grupo COD espontánea, así como también de los pellets obtenidos de los cultivos celulares, después del tratamiento con el reactivo TRIzol LS (Invitrogen, Life Technology, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Marelli y col., 2014).

3.4.4.2. Transcripción reversa

Para evitar la contaminación con ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico, las muestras de ARN fueron tratadas con ADNasa I (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las cadenas de ADN copia (ADNc) fueron sintetizadas usando una mezcla de reacción conteniendo MMLV (del inglés: *Moloney Murine Leukemia Virus*) buffer 5X, dithiothreitol (DTT, 100mM), inhibidor de ribonucleasas (40U/μl, RNaseOUT), retrotranscriptasa (MMLV, 200U), dexoxiribonucleotidos trifosfatos (dNTP) y cebadores con secuencia al azar. Se utilizó para ello una cantidad constante de ARN y fueron utilizadas las siguientes condiciones para la transcripción reversa:

- 10 minutos a 25°C para el anillado,
- 50 minutos a 37°C para la síntesis de ADNc y
- 15 minutos a 70°C para la inactivación de la ADNasa.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μl utilizando un termociclador estándar (TC-3000, Techne Inc., NJ, USA). El producto de estas reacciones fue guardado a -20 °C hasta su utilización.

3.5. Cuantificación de hormonas en suero y líquido folicular

Se determinaron los niveles diarios de cortisol y de hormonas esteroides en líquido folicular y séricos, en los grupos controles y tratados con ACTH. Las determinaciones hormonales para COD espontanea fueron realizadas previamente y han sido publicadas por nuestro grupo de trabajo (Amweg y col., 2013).

Los niveles séricos de cortisol, E2, P4 y testosterona en suero y líquido folicular fueron medidos por electroquimioluminiscencia inmunoensayo (ECLIA del inglés: *electrochemiluminescence immunoassay*) utilizando kits comerciales (Roche Diagnostics GmbH, Germany) en un sistema COBAS e411 (Roche Diagnostics), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 0,97 μg/dl para Cortisol, 6,12 pg/mL para 17-β-Estradiol, 0,31 ng/mL para P4 y 0,01 ng/mL para Testosterona. Para validar las pruebas de ECLIA para esteroides, pooles de líquido folicular y suero de vacas ovariectomizadas fueron tratados con carbón para generar muestras libres de esteroides (McNeilly y col., 1991; Díaz y col., 2015). Diluciones seriadas de E2, testosterona y P4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) fueron preparadas usando líquido folicular o suero libre de esteroides como diluyente. La recuperación de dichos estándares de esteroides que se

agregaron a las muestras individuales antes del ensayo estuvo entre el 86% y el 97% para las muestras con alta concentración y entre 80% y 94% para las muestras con baja concentración. El coeficiente de variación intra- e interensayo fue <6% y <5% respectivamente.

3.6. Detección y cuantificación de metaloproteasas y sus inhibidores tisulares

3.6.1. Inmunohistoquímica simple

Mediante esta técnica se logró la identificación *in situ* y cuantificación de las siguientes proteínas: MMP2, MMP9, MMP14, TIMP1 y TIMP2 en tejido ovárico de animales controles, con COD espontánea (excepto para MMP14) y de aquellos provenientes del modelo experimental, utilizando anticuerpos específicos disponibles comercialmente, detallados en la tabla 2.

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

- I- Desparafinización en xilol
 - 1 pasaje de 15 minutos.
 - 1 pasaje de 10 minutos.
- II- Hidratación en una serie de alcoholes de graduación decreciente:
 - Etanol absoluto (2 pasajes de 3 minutos),
 - Etanol 96° (2 pasajes de 3 minutos),
 - Etanol 70° (un pasaje de 3 minutos).
- III- Lavados con PBS pH7:
 - 2 lavados de 5 minutos cada uno.

IV- Tratamiento de recuperación antigénica. Se realizó en un horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 800W). Como solución de recuperación se usó buffer citrato 0,01M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en un coplin sumergido en un recipiente con agua, y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación: 3 minutos a 100% de potencia, 6 minutos al 40%, recarga del coplin con agua destilada, 6 minutos al 40 % y 20 minutos dentro del microondas apagado.

Para MMP9 se utilizó una recuperación intensa en el microondas, aumentando a 5 minutos los tiempos de la potencia al 100%, se recargó el coplin con agua destilada caliente y nuevamente otros 5 minutos al 100% de potencia. Se volvió a recargar el coplin con agua destilada y se colocó dentro del microondas durante 6 minutos al 40%, recarga del coplin con agua destilada, 6 minutos al 40 % y 20 minutos dentro del microondas apagado. Este

tratamiento se utilizó para detectar MMPs o TIMPs, según se detalla en la tabla 2 según correspondiera.

V- Bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa, sumergiendo las muestras durante 10 minutos en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto, agregando nuevamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno a los 10 minutos.

VI- Lavados con PBS

- 2 lavados de 5 minutos cada uno.

VII- Bloqueo de los sitios de unión no-específicos incubando 15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda con una solución de suero normal de cabra al 5%, a excepción de MMP9, en el cual se utilizó suero normal de burro al 5 %.

VIII- Incubación con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C (en heladera): se usaron anticuerpos específicos en las diluciones adecuadas según la proteína a detectar (tabla 2). Para los controles de especificidad se sustituyó el anticuerpo primario por PBS-BSA.

IX- Después de la incubación con el anticuerpo primario la cámara se retiró de la heladera y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

X- Lavados con PBS

- 2 lavados de 5 minutos cada uno.

XI- Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado monoclonal o policlonal (según corresponda y en la dilución apropiada), o con el secundario Universal del kit Cytoscan HRP Detection System, durante 30 minutos a temperatura ambiente (tabla 3).

XII- Lavados con PBS

- 2 lavados de 5 minutos cada uno.

XIII- Incubación con complejo streptavidina (Cytoscan HRP Detection System Cell Marque- en su concentración comercial) o (Dako-dilución 1:500, para MMP-9)-peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente.

<i>Anticuerpos</i>			<i>Dilución del anticuerpo</i>	
			<i>IHC</i>	<i>WB</i>
<i>Primarios</i>	<i>Clon (Proveedor)</i>	<i>Condiciones para IHC</i>		
MMP2	Policlonal de conejo, sc-8835-R (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA)	Sin recuperación antigénica	1 en 100	1 en 3000
MMP9	Policlonal de cabra sc-6840 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA)	Recuperación antigénica con buffer citrato en microondas intenso	1 in 50	1 en 250
MMP14	Policlonal de conejo, sc-12367 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA)	Sin recuperación antigénica	1 en 75	1 en 200
TIMP1	Policlonal de conejo, sc-6832R (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA)	Recuperación antigénica con buffer citrato en microondas	1 en 100	1 en 250
TIMP2	Monoclonal de ratón, ab1828 (Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA)	Recuperación antigénica con buffer citrato en microondas	1 en 100	1 en 400

Tabla 2. Detalle de los anticuerpos primarios utilizados, y las condiciones de uso en la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) y western blot (WB).

XIV- Lavados consecutivos con PBS

- 2 lavados de 5 minutos cada uno.

XV- Revelado de la reacción con 3-3'-diaminobencidina (Kit DAB Plus, Invitrogen).

- Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y estandarizarlo.

XVI- Lavados con agua destilada:

- 2 lavados de 5 minutos cada uno.

XVII- Coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur®).

XVII- Deshidratación y montaje con bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur®) y cubreobjetos apropiados.

En aquellos ensayos donde se empleó como anticuerpo primario anti-MMP2 y anti-MMP14, se realizó una modificación a la técnica de rutina, omitiendo la recuperación antigénica.

Para la evaluación de MMP2, MMP9, MMP14, TIMP1 y TIMP2 en los grupos COD espontánea, controles y del modelo experimental, se digitalizaron imágenes de cada una de las capas de la pared folicular de folículos primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales, antrales preovulatorios, atrésicos y los folículos quísticos, estos últimos solamente en los grupos con COD espontánea, según correspondiera.

<i>Anticuerpos</i>		<i>Dilución del anticuerpo</i>	
		<i>IHC</i>	<i>WB</i>
<i>Secundarios</i>	<i>Clon (Proveedor)</i>		
Polyclonal HRP-anti-rabbit IgG	HRP-anti-rabbit IgG sc-2004 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA)	-	1:7500
Monoclonal HRP-anti-mouse IgG	HRP-anti-mouse IgG sc-2005 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA)	-	1:6000
Goat anti-rabbit IgG	Goat anti-rabbit sc-2040 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA)	1:100	
Donkey anti-goat IgG-B	Donkey anti-goat Sc-2042 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA)	1:100	1:80000

Tabla 3. Detalle de los anticuerpos secundarios utilizados en las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y western blot (WB).

3.6.2. Western blot

Esta técnica fue utilizada para la determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados para IHQ. Se realizó la electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida, 29:1) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). El tamaño del poro para el gel de resolución se correspondió con una concentración de acrilamida del 10% (MMP2 y MMP9), del 12% (MMP14) y del 15% (TIMP1 y TIMP2). Se utilizaron homogeneizados de pared folicular de folículos antrales medianos y grandes (Parrott y Skinner, 1998) (Figura 17).

Se prepararon las muestras diluyendo 1:2 con buffer de muestra en condiciones reductoras para SDS-PAGE, y posteriormente se incubaron en baño termostático a 95°C por 5 minutos. Se utilizó una cuba vertical y el buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1 % de SDS, pH 8,3. De acuerdo a los valores obtenidos de la cuantificación mediante el método fluorimétrico (Quant-iT Protein Assay Kit, Qubit, Invitrogen, Nueva York, Estados Unidos), se sembraron 40 µg de proteínas y se realizó la electroforesis a 25 mA para el gel de apilamiento, y se continuó a 50 mA hasta la visualización del frente de corrida en el borde inferior del gel de resolución. Los marcadores de peso molecular (PM) que se utilizaron se detallan en la figura 17. Para la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de las proteínas separadas en el gel, se empleó la solución de transferencia tamponada Towbin modificada, compuesta por Tris-

Glicina y 20 % de metanol. Dicha transferencia se realizó en frío, a 100V durante 2 horas y 30 minutos, condiciones utilizadas para todos los casos. Al término de este periodo se coloreó la membrana con el colorante Rojo Ponceau para ver la efectividad de la transferencia. Una vez verificada, se procedió al lavado de la membrana y posterior guardado de la misma a 4-6°C hasta proceder a la inmunodetección de las proteínas detalladas previamente en la tabla 2.

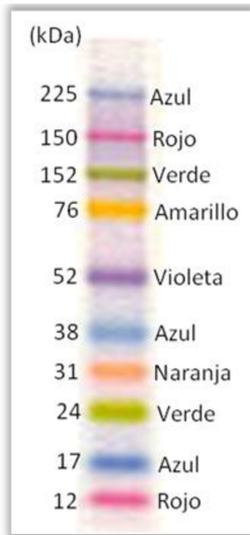


Figura 17. Marcadores de peso molecular para SDS-PAGE, amplio espectro (Rainbow™, RPN800E, GE Healthcare)

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

I- Bloqueo de los sitios de unión inespecíficos con buffer salino tris con tween (TBS-T) y leche al 5%, 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

II- Lavado a temperatura ambiente en agitación (agitador orbital BOECO OS-10, Germany) con TBS-T.

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

III- Incubación con el anticuerpo primario (Tabla 2) durante toda la noche en heladera. Para la dilución del anticuerpo primario se utilizó buffer de bloqueo.

IV- Lavado a temperatura ambiente con TBS-T:

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

V- Incubación con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Para la dilución se utiliza buffer de bloqueo. Los datos y las condiciones de uso de estos anticuerpos están descritos en la tabla 3.

VI- Lavado a temperatura ambiente con TBS-T:

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

VII- Preparación del reactivo quimioluminiscente (GE Healthcare), colocación de la membrana en un recipiente con el reactivo e incubación durante 5 minutos.

VIII- Escurrido de la membrana y colocación entre dos hojas de papel celofán.

IX- Revelado de la membrana en cuarto oscuro con los reactivos de revelado y fijado (Kodak); y placas radiográficas (GE Healthcare)

X- Lavado con agua destilada.

XI- Secado de la placa a temperatura ambiente.

3.6.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Los niveles de las citoquinas IL-1 β e IL-4 en suero y líquido folicular fueron cuantificados mediante un kit de ELISA sándwich comercial, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific Inc., Waltham, Estados Unidos). Las muestras utilizadas líquido folicular provenían de folículos preovulatorios de los animales tratados con ACTH y de folículos preovulatorios controles. La placa se sensibilizó durante toda la noche con el anticuerpo de captura y se bloqueó con una solución de BSA al 4%, sacarosa al 5% en D-PBS. Los patrones o estándares se sembraron en diluciones seriadas para realizar la curva de calibrado. Las muestras de líquido folicular y de suero, fueron sembrados sin diluir en los pocillos de la placa. Las muestras a evaluar y la curva de calibrado se sembraron por duplicado, se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora (IL-1 β) o 1 hora y media (IL-4). Las muestras se lavaron y se añadió el anticuerpo de detección (anticuerpo conjugado con biotina) y se incubó durante 1 h. Después de 3 lavados con solución de lavado, se añadió estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa y se realizó la incubación durante 30 min. La reacción fue evidenciada mediante el agregado de una solución de tetrametilbenzidina (TMB) como cromógeno, el cual fue incubado durante 20 minutos. La reacción se detuvo con solución de H₂SO₄ 0,16 M y se realizaron lecturas a 450 nm con un lector de microplacas para ELISA (Microplate Reader, SPECTROstarNano, BGM / LABTECH, Ortemberg, Alemania). El límite inferior de detección fue de 15,6 pg/ml para IL-4 y 19,5 pg/mL para IL-1 β .

3.6.4. Análisis de la expresión de ARNm de MMP2, MMP9, TIMP1 y TIMP2

3.6.4.1. Diseño de cebadores específicos, clasificación de las muestras y validación de las condiciones de la PCR en tiempo real

Los cebadores específicos para amplificar los genes de interés para MMP2, MMP9, TIMP1 y TIMP2 se diseñaron empleando el software libre Primer-Quest (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>).

Cada par de cebadores fue obtenido a partir de la secuencia codificante genómica de los genes en estudio publicada en National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para su diseño, se tuvo en cuenta el tamaño del amplicón, la ubicación de cada cebador (sentido y antisentido) en la hebra molde (preferentemente hacia el extremo 3' del ARNm), el número de nucleótidos de la secuencia, la temperatura de hibridación (o temperatura de annealing, T_a), el porcentaje de bases C-G y la formación de heterodímeros, homodímeros y estructuras secundarias como los 'hairpins'. Además, en los casos en que fue posible, los pares de oligonucleótidos se diseñaron de forma tal que el sentido y el antisentido fueran complementarios a secuencias ubicadas en exones diferentes del gen de interés, a fin de evitar amplificaciones inespecíficas a partir de ADN genómico.

Las especificidades de todos los cebadores se cotejaron por comparación directa contra el genoma completo de *Bos taurus* mediante el uso de la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Por otro lado, se emplearon cebadores específicos para amplificar las secuencias codificantes de los genes CYP19A1 (específico de células de la granulosa, correspondiente a la enzima P450arom) y CYP17A1 (específico de células de la teca, correspondiente a la enzima P450c17), con el objetivo de confirmar la presencia de células de la granulosa y teca bovinas en las muestras obtenidas por aspiración folicular. A través de esta identificación las muestras pudieron ser clasificadas según la población celular existente y sólo fueron destinadas a su análisis aquellas muestras provenientes de animales con COD espontánea y de animales controles que fueron positivas para ambos estratos celulares. En estos dos casos, las secuencias de los cebadores empleados fueron obtenidas de publicaciones previas (Lagaly y col., 2008).

También se emplearon cebadores específicos para amplificar el gen de expresión constitutiva (β -actina) lo que permitió llevar a cabo una cuantificación relativa de los niveles de ARNm de interés, detallado en publicaciones previas de nuestro grupo de trabajo (Baravalle y col., 2015) (tabla 4).

3.6.4.2. PCR en tiempo real

Se utilizó un protocolo optimizado de PCR en tiempo real para analizar la expresión de ARNm de MMP2, MMP9 en LF de ovarios provenientes de animales controles de frigorífico, en aspirados de LF de quistes de COD y en células de las porciones de tejidos de pared folicular cultivados *in vitro*, provenientes de ovarios de frigorífico (estimuladas y sin estímulo de ACTH); TIMP1 y TIMP2 en LF de ovarios controles de frigorífico y aspirados de LF de quistes de COD, usando SYBR Green I (Invitrogen) (Pfaffl, 2001). La cantidad relativa de los ARNm de las distintas MMPs fue normalizada a una cantidad constante de ARNm del gen de referencia β -actina (Robinson y col., 2007). La PCR fue realizada usando concentraciones definidas de cebadores sentido/antisentido detallados en la tabla 4.

Cada reacción de PCR fue realizada por duplicado en un volumen total de 20 μ l, conteniendo 4 μ l de ADNc (500 ng/ml), 4 μ l de buffer de reacción Phire 5X, 0,5 μ l de cada cebador, 10 μ M de cebadores sentido/antisentido, 0,2 mM dNTPs, 1 μ l SYBR Green I (Invitrogen), 0,05 μ l Phire Taq polimerasa (Thermo Fisher Scientific Company, Finland) y 14 μ l de agua tratada con DEPC estéril.

Los niveles relativos de transcritos se midieron en un sistema StepOne Real Time PCR (Applied Biosystems, Life Technology, CA, USA) y se analizaron mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

La eficiencia de las PCRs y las cantidades relativas fueron evaluadas a través de una curva estándar de 6 puntos. Estas curvas fueron construidas con una serie de diluciones de un pool de ADNc. La eficiencia fue calculada usando el programa informático StepOne v2.2 (Applied Biosystems).

Los niveles de expresión de los genes se analizaron según los valores de sus *C_t*s (ciclo umbral, del inglés: *cycle threshold*) los que fueron calculados por el software StepOne v2.2 (Applied Biosystems). Dicho valor corresponde al ciclo en el que la señal de fluorescencia puede ser detectada como valor de corte o umbral. La pureza de los productos fue establecida

por curvas de disociación, y muestras aleatorias fueron destinadas a la corrida de un gel de agarosa para verificar el tamaño de los productos.

<i>Cebador</i>	<i>Secuencia cebador 5'→3'</i>	<i>N° acceso NCBI</i>	<i>Tamaño amplicón (pb)</i>	<i>Ta (°C)</i>
BV-TIMP-1	F:TCGTGGGGACCGCAGAAGT R:CTCCATGGCAGGGGTGTAGAT	NM_174471.3	134pb	60
BV-TIMP-2	F:CCCATCAAGCGGATTCAGTAT R:ACTCCTTCTTTCCTCCAATGTC	NM_174472.3	136pb	62
BV-MMP-2	F:TCTTCGCCGGAGACAAATTCTGGA R:ATCCAGGTTATCAGGGATGGCGTT	NM_174745.2	133pb	60
BV-MMP-9	F:AGGGTAAGGTGCTGCTGTTC R:CTGAAAGATGTCGTGCGTGC	NM_174744.2	137pb	62
BV-CYP17A1	F:GGAGGCGACCATCAGAGAAGTGC R:CAGCCGGGACATGAAGAGGAAGAG	NM_174304	319pb	60.8
BV-CYP19A1	F:TAAAACAAAGCGCCAATCTCTACG R:GGAACCTGCAGTGGGAAATGA	BTCYP19	341pb	55.4
BV-β-actina	F:CGGAACCGCTCATTGCC R:ACCCACACTGTGCCCATCTA	BT030480	290pb	60

Tabla 4. Pares de primers usados para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Ta: Temperatura de annealing. Pb: pares de bases.

3.6.4.3. Secuenciación de nucleótidos

Los productos obtenidos por RT-qPCR de los diferentes genes en estudio se enviaron a secuenciar a un laboratorio privado (Macrogen, Seúl, Korea) a los fines de confirmar su identidad. Para esto se realizó una PCR convencional para cada uno de los genes evaluados utilizando los cebadores detallados en la tabla 4 y con las condiciones allí especificadas.

Las secuencias obtenidas fueron inicialmente analizadas con el programa BioEdit© y luego cotejadas con la base de datos del NCBI empleando una herramienta de BLAST para tal fin, BLAST nucleotide (BLASTn), para confirmar la especificidad de los genes y para determinar la ubicación de los nucleótidos, asegurándonos así que ellos no fueron diseñados desde alguna región homóloga que codifique para otros genes.

3.6.5. Determinación de la actividad de MMP2 y MMP9 por zimografía de gelatina

La actividad enzimática de MMP2 y MMP9 en LF se determinó mediante zimografía en geles de poliacrilamida con el agregado de gelatina, para tal fin, se enviaron muestras de LF al Laboratorio Diagnóstico de Metabolismo Óseo y Mineral (FCV-UBA-Buenos Aires).

Inicialmente se determinó la concentración de proteínas de las muestras de líquido folicular del día esperado de ovulación (día 18) de los animales controles y tratados con ACTH así como en LF de animales con COD, por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se mezclaron 100 µg de cada muestra con un buffer de muestra y se sembraron en un gel SDS-PAGE al 10% conteniendo gelatina al 0,2% (Sigma). La gelatina constituye el sustrato de las enzimas en estudio, y copolimeriza junto al acrilamida durante la preparación del gel.

Luego de la electroforesis los geles fueron lavados con 50 mM Tris-HCl pH 7,5 con el agregado de 2,5% de Tritón X-100 durante 45 min, seguido de lavados con 50 mM Tris-HCl 5 mM CaCl₂ 1 μM ZnCl₂ pH 7,5 con el agregado de 2,5% de Triton X-100 pH 7,5 durante 45 min. Estos lavados permitieron que las enzimas desnaturalizadas durante la electroforesis se renaturalicen de forma reversible y recuperen parcialmente su actividad. A continuación los geles se incubaron en un buffer de activación que contenía 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 200 mM NaCl pH 7,5 a 37 °C por 24 h. Finalmente se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 0,2% (w/v) durante 2 h y luego se clarificaron con una solución decolorante (25% v/v isopropanol plus 10% v/v de ácido acético). Los controles de inhibición se llevaron a cabo mediante incubación con EDTA 5 mM. La actividad gelatinolítica se visualizó como bandas que luego fueron analizadas.

Las bandas generadas por la actividad gelatinolítica se analizaron por densitometría utilizando el software Image J (NIH, Maryland, EE.UU.). La actividad zimográfica se expresó como porcentaje de actividad referido al control positivo (Marcador) (MMP2 o MMP9) sembrado simultáneamente en el mismo gel (De Simone y col., 2015).

3.7. Análisis digital de imágenes

Se realizó el análisis digital de imágenes de cortes histológicos usando el programa informático Image Pro-Plus 3.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA). Las imágenes que se analizaron, fueron previamente obtenidas usando una cámara digital Nikon DS-Fi2 (Tokyo, Japan), acoplada a un microscopio óptico Nikon Eclipse Ni utilizando un objetivo de 40X de aumento. La resolución de las imágenes fue establecida en 1200 x 1600 pixeles.

El área inmunomarcada se calculó a través de la segmentación de colores seleccionando los objetos con reacción marrón moderado/intenso (dada por la reactividad del cromógeno utilizado) como rango positivo. Dicha coloración fue elegida con una sensibilidad de 4 (máximo 5). Posteriormente fue aplicada una máscara para la separación permanente de los colores y se realizó un histograma para determinar el porcentaje del área marcada sobre el área total evaluada, tal como fue descrito en trabajos previos (Salveti y col., 2010).

Las placas obtenidas del revelado por quimioluminiscencia fueron escaneadas con un escáner de oficina (HP Officejet J5700) con alta resolución (600 dpi) y formato tiff.

3.8. Evaluación estadística

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 11.0.1 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Antes de iniciar el análisis estadístico se comprobó la normalidad de la población de datos evaluados y homogeneidad de la varianza mediante las herramientas disponibles en el programa SPSS 11.0.1.

Las concentraciones séricas de E2, P4, testosterona y cortisol en los animales controles y tratados durante todo el período experimental fueron analizadas mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías para determinar los efectos del tiempo y el tratamiento, así como también la interacción entre cada tratamiento por el tiempo. Los niveles hormonales en suero y líquido folicular en los distintos grupos de animales (tratados y controles) al momento de la toma de muestras, fueron comparados mediante (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Dunnet. El nivel de significancia utilizado para ANOVA fue $p < 0,05$. Los resultados se expresan como la media \pm el desvío estándar (DE).

Para evaluar la expresión proteica mediante inmunohistoquímica, se realizó un análisis de la varianza de los datos aplicando pruebas paramétricas para varios grupos (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan. Se analizaron por separado las estructuras foliculares análogas (folículos primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales, antrales preovulatorios, atrésicos y quísticos) de cada grupo en estudio. También se compararon los quistes (inducidos o espontáneos) con los folículos antrales y atrésicos del grupo control (como estructuras similares de referencia). Además, se evaluó el comportamiento de la expresión proteica a lo largo de la foliculogénesis dentro de cada grupo en estudio. La comparación entre dos grupos de muestras se realizó mediante la prueba *t-Student*. Esta misma prueba se utilizó para comparar los resultados de las mediciones de ELISA, de PCR en tiempo Real y de la zimografía en gelatina. El nivel de significancia utilizado para ANOVA fue $p < 0,05$. Los valores se expresaron como el promedio \pm el desvío estándar (DE).

4. Resultados

4.1. Resultados de los procedimientos con animales

4.1.1. Desarrollo, seguimiento y caracterización del modelo de inducción de estrés mediante aplicaciones repetidas de ACTH

Durante el desarrollo del protocolo de inducción de estrés mediante ACTH, fue posible evidenciar, mediante el seguimiento ecográfico y por palpación rectal, el crecimiento de folículos preovulatorios en por lo menos uno de los dos ovarios, en el 100% de los animales tratados (n=7). Los folículos preovulatorios se observaron como estructuras anecogénicas presentes en la misma posición y ovario, respetando el tamaño propio de la raza Holando Argentino. Asimismo, con el análisis de las imágenes ecográficas se verificó el correcto funcionamiento del protocolo hormonal. En ambos grupos, en los ovarios se observaron cuerpos lúteos en regresión o inactivos (Figura 18).

Al análisis microscópico, los cortes histológicos de ovarios de los animales controles presentaron folículos normales en todos los estadios de desarrollo y atresia, incluyendo un cuerpo lúteo en regresión. Los ovarios de las vacas tratadas con ACTH presentaron estructuras en todos los estadios de crecimiento y desarrollo, incluyendo folículos primordiales, de transición, primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales, folículos con diferentes grados de atresia y un único folículo preovulatorio. Todos los folículos preovulatorios presentaban una capa de células de la granulosa sanas y una teca interna muy vascularizada. Las células de la granulosa mostraron una apariencia típica de células normales en dicho estadio de desarrollo (Braw-Tal y Yossefi, 1997), denotando su integridad y salud.

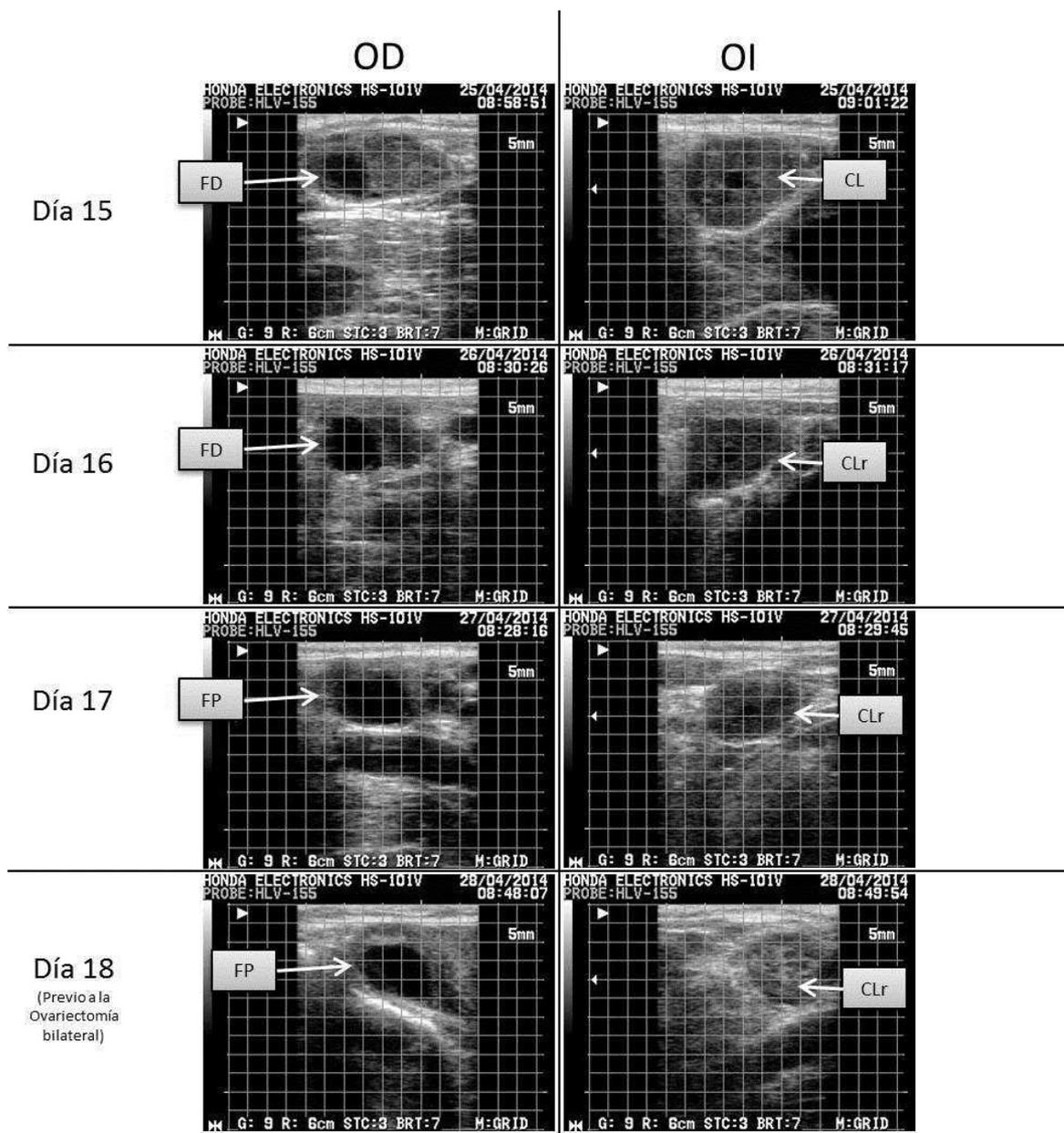


Figura 18. Imágenes del seguimiento Ultrasonográfico en el período de aplicaciones de ACTH. *OI:* Ovario Izquierdo; *OD:* Ovario derecho; *FD:* Folículo dominante; *FP:* Folículo preovulatorio; *CL:* Cuerpo lúteo; *CLr:* Cuerpo lúteo en regresión.

4.1.2. Efectos de las dosis de ACTH sobre la concentración de hormonas esteroides.

Las hormonas esteroideas fueron analizadas en muestras de líquido folicular y suero obtenidas antes de la ovariectomía, y se compararon entre los animales tratados con ACTH y los controles. También se compararon los niveles séricos de las hormonas esteroides, respecto del momento previo a la primera administración de ACTH utilizando este valor como parámetro basal, y los valores subsiguientes se catalogaron desde T1 a T7, existiendo una diferencia de 12 horas entre cada muestra.

Los resultados obtenidos muestran que el cortisol presentó una concentración mayor ($p < 0,05$) en los animales tratados con ACTH, tanto en el líquido folicular (LF), como en el suero. Se pudo determinar que hubo un incremento progresivo en la concentración sérica de esta hormona, siendo más elevado ($p < 0,05$) en el último día de ensayo (T6 y T7), coincidiendo con el momento del proestro (Figura 20).

Los niveles séricos de P4 fueron mayores en los animales tratados con ACTH ($p < 0,05$), observándose valores de hasta 1,22 ng/ml, mientras que en el LF, la concentración de P4 fue menor en los animales tratados con ACTH (Figura 19). En el análisis comparativo, la concentración de P4 fue disminuyendo desde las 24 horas posteriores al comienzo del tratamiento experimental hasta la ovariectomía ($p < 0,05$) (Figura 20).

El 17- β estradiol no mostró diferencias entre grupos para suero y LF ($p > 0,05$) (Figura 19), aunque se pudo determinar que en el día 18 del protocolo aumentó su concentración sérica, con respecto al comienzo del tratamiento ($p < 0,05$) (Figura 20).

Por último, se observó una menor concentración sérica de testosterona en los animales tratados ($p < 0,05$) (Figura 19), previo a la ovulación, y se pudo observar una tendencia a disminuir en relación al tiempo basal ($p = 0,06$). Los resultados se exponen en la figura 20.

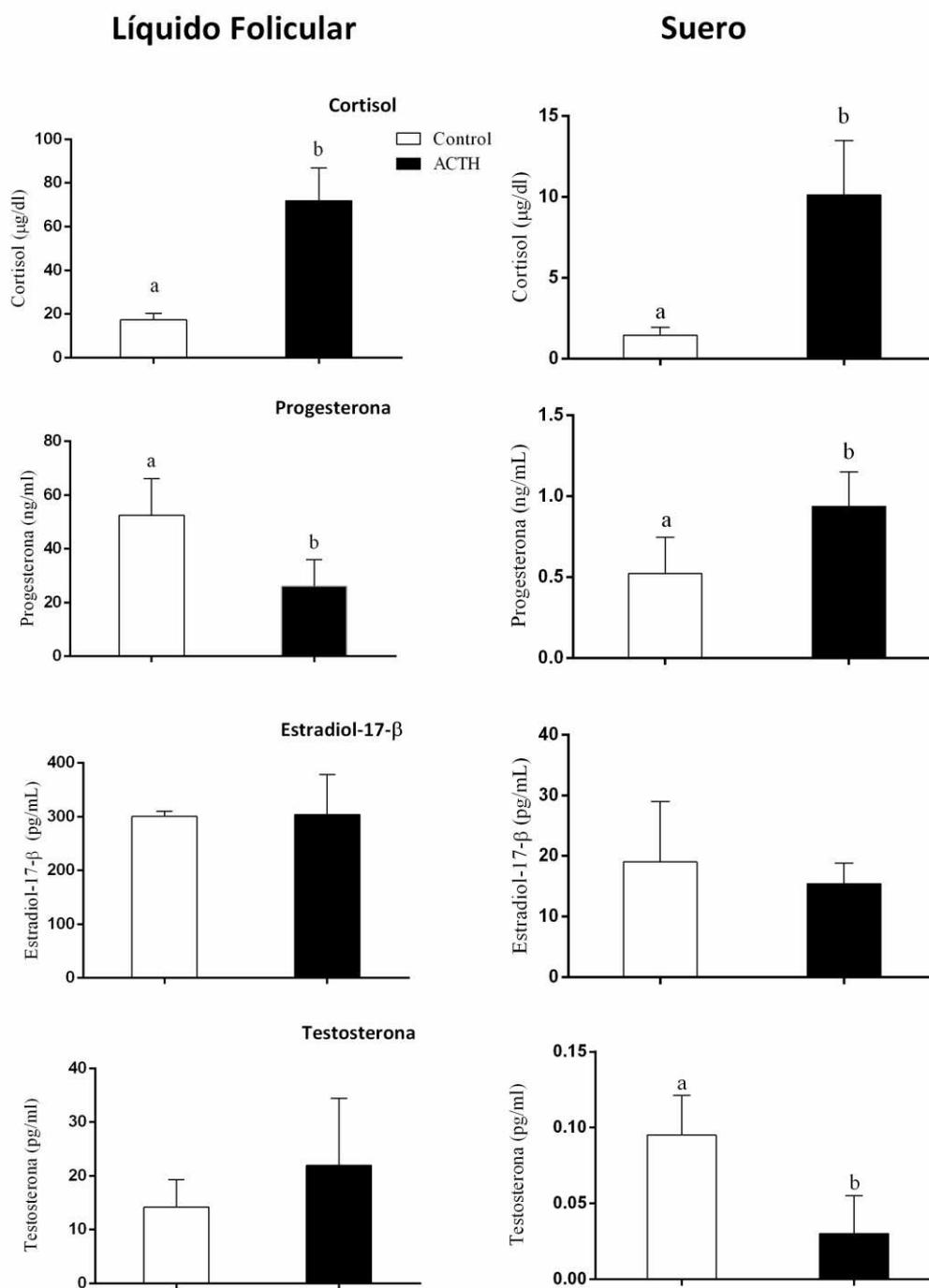


Figura 19. Medición de hormonas esteroideas en el grupo control (barras blancas) y en respuesta a las dosis de ACTH (barras negras) al momento de la ovariectomía. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

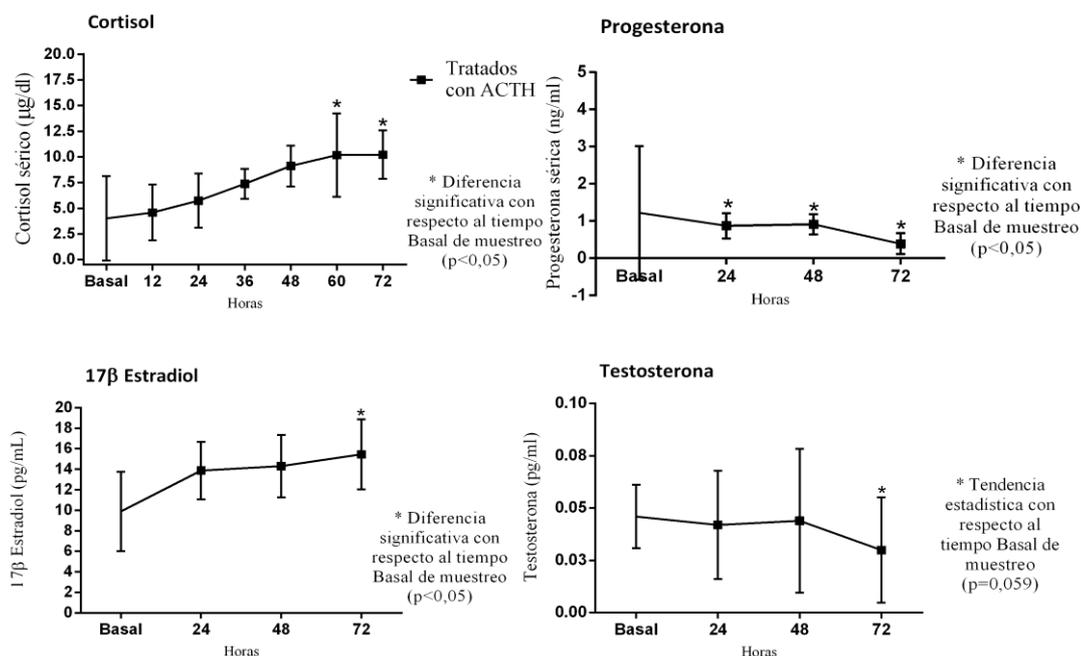


Figura 20. Niveles séricos diarios de hormonas esteroideas en los animales del modelo de ACTH, en relación al momento previo al tratamiento con ACTH (Basal: previo al inicio de la administración de ACTH). Test estadístico de Dunnet. Los valores representan la media \pm DE ($p < 0,05$). El asterisco muestra diferencias en relación al basal.

4.1.3. Diagnóstico, seguimiento y caracterización de COD espontánea

Se obtuvieron ovarios con quistes espontáneos de 15 vacas de la raza Holando Argentino, provenientes de establecimientos lecheros cercanos a la FCV-UNL. El diagnóstico fue realizado mediante ecografía y palpación rectal. Los folículos quísticos presentaron un diámetro promedio de 35 ± 6 mm con una morfología compatible con la descrita en la bibliografía (Silvia y col., 2002; Wiltbank y col., 2002; Bartolomé y col., 2005; Vanholder y col., 2006). Todas las vacas diagnosticadas con COD presentaban folículos únicos o múltiples, pared folicular menor a 3 mm, ausencia de cuerpo lúteo y falta de tono uterino. Microscópicamente se evidenciaron folículos en varios estadios de desarrollo incluyendo folículos primarios, preantrales pequeños, preantrales grandes, antrales y atrésicos y, en todos los casos, ausencia de tejido luteal activo. Las capas granulosa y teca presentaron células aparentemente sanas, sin procesos degenerativos. La persistencia de los folículos quísticos en estas vacas no pudo ser determinado de manera exacta, pero se estimó en más de 10 días debido a la falta de tono uterino a la palpación rectal (Bartolomé y col., 2005). A nivel microscópico, este hecho quedó reflejado en la morfología de las células de la granulosa, donde algunos quistes presentaron ausencia total o parcial de dicha capa como consecuencia de una persistencia muy prolongada (Figura 21). Las evaluaciones histológicas e

inmunohistoquímicas se realizaron solo en los folículos quísticos que presentaban células de la granulosa (n=10).

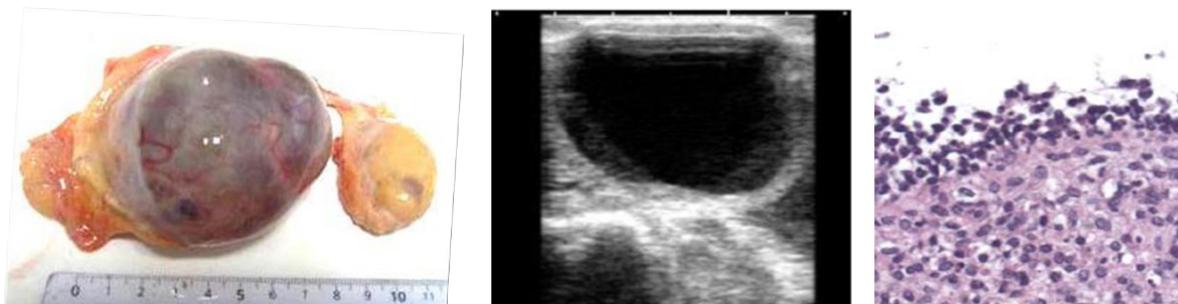


Figura 21. Izquierda: Quiste folicular obtenido por ovariectomía. Centro: Imagen ultrasonográfica de un quiste folicular. Derecha: Imagen microscópica de la pared de un quiste, tinción de Hematoxilina-Eosina (40x).

Se obtuvo información brindada por el personal de los establecimientos que colaboraron aportando animales en el ensayo: edad, número de lactancias, padre, madre, producción de leche, fecha del último parto, producción de la lactancia anterior, fecha del último celo, condición corporal, patologías, fecha de diagnóstico del quiste, época del año, intervalo parto-diagnóstico, hallazgos a la ecografía, tratamiento, respuesta al tratamiento y relación Energía/Proteína de la dieta. Dichos datos fueron destinados a estudios paralelos a la presente tesis. Por otro lado se obtuvieron muestras de LF de quistes foliculares de animales con COD espontánea de 15 animales y muestras de LF de folículos preovulatorios de 10 animales controles. Estas muestras se destinaron a la evaluación de hormonas esteroides, cuyos resultados han sido publicados paralelamente en nuestro grupo de trabajo (Amweg y col., 2015) y otras hormonas que forman parte de los resultados de la presente tesis.

4.2. Localización, actividad y expresión de MMPs y TIMPs en COD

La expresión de las proteínas MMP2, MMP9, TIMP1 y TIMP2 fue detectada en las células de la granulosa y teca interna de todas las categorías de los animales controles y quistes foliculares. Los controles negativos no mostraron inmunomarcación en ninguna de las categorías foliculares. Además, se detectó actividad enzimática para MMP2 y MMP9 en el LF analizado.

4.2.1. MMP2

4.2.1.1. Expresión génica de MMP2

El resultado de la secuenciación correspondiente al amplificado obtenido por PCR tuvo un 98% de homología con la secuencia de *Bos Taurus* reportada en el banco de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) empleando los cebadores específicos diseñados para tal fin. Los niveles de expresión relativa del ARNm correspondiente a la MMP2 fueron menores en quistes foliculares provenientes de animales con COD espontánea que en los folículos preovulatorios controles ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 22.

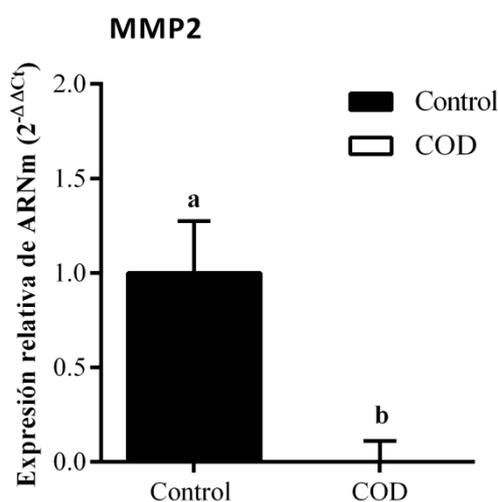


Figura 22. Niveles de expresión relativa de ARNm correspondiente a **MMP2** en folículos preovulatorios de animales control y quistes foliculares de animales con COD espontánea. Los valores representan la media \pm DS. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2.1.2. Expresión proteica y localización de MMP2 en COD

La expresión de MMP2 fue evaluada y detectada en las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos preovulatorios de animales controles como así también en los quistes foliculares de animales con COD espontánea (Figura 23).

La inmunomarcación no mostró diferencias significativas entre los quistes foliculares y los folículos antrales de animales del grupo control ($p > 0,05$) (Figura 24).

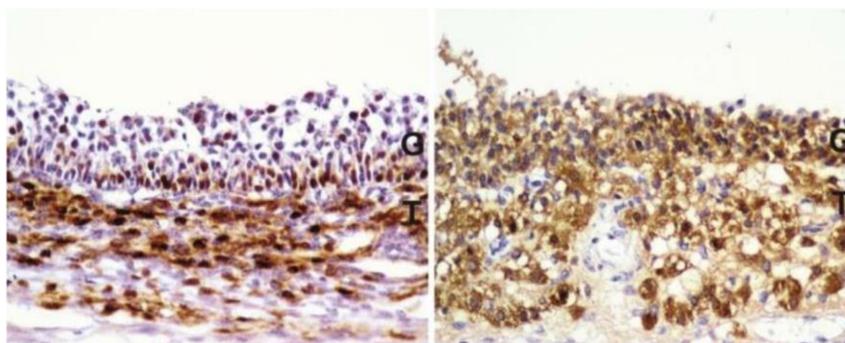


Figura 23. Imágenes representativas de la inmunomarcación de **MMP2** en células de la granulosa (G) y de la teca interna (T) de folículos antrales de vacas control (A) y quistes espontáneos de vacas con COD (B). Aumento: 40X.

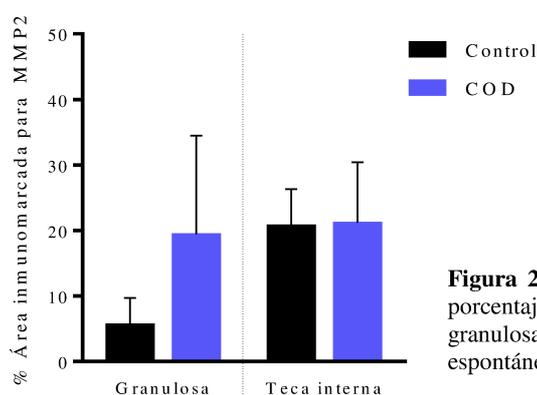


Figura 24. Niveles de expresión relativa de proteína (medida como porcentaje del área inmunopositiva) de **MMP2** en células de la granulosa y de la teca de animales control (barras negras) y con COD espontánea (barras azules). Los valores representan la media \pm DE.

4.2.1.3. Actividad enzimática de MMP2 en el líquido folicular en COD

La actividad gelatinolítica de MMP2 fue detectada mediante zimografía en todas las muestras de líquido folicular de los folículos preovulatorios de los grupos control y quistes del grupo COD espontánea. El análisis zimográfico reveló mayor actividad en el líquido folicular de los quistes que en los folículos preovulatorios control (p<0,05) (Figura 25).

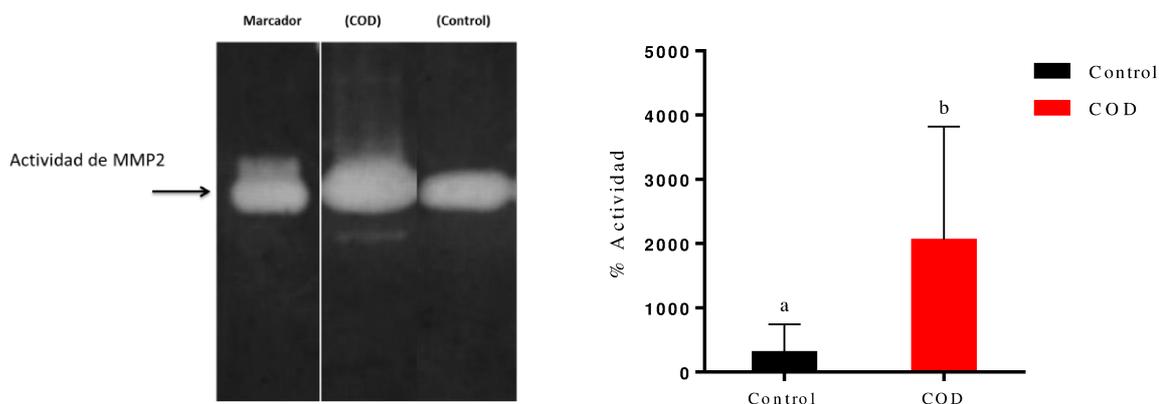


Figura 25. Análisis zimográfico para **MMP2**. *Izquierda:* Imagen representativa de zimografía en gel para la detección de la actividad enzimática de MMP2. *Derecha:* Actividad de **MMP2** en líquido folicular de folículos preovulatorios de los grupos Control y COD, representados como un porcentaje del control utilizado en la zimografía en gelatina. Los valores representan la media \pm el DS. Las letras diferentes representan diferencia significativa (p<0,05).

4.2.2. MMP9

4.2.2.1. Expresión génica de MMP9

El resultado de la secuenciación correspondiente al amplificado obtenido por PCR tuvo un 98% de homología con la secuencia de *Bos Taurus* reportada en el banco de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) empleando los cebadores específicos diseñados para tal fin.

Para MMP9 no fue posible realizar la cuantificación de los niveles de expresión génica ya que el 75% de las muestras expresaron dicho gen fuera del rango dinámico determinado por la curva estándar, con valores de Ct elevados.

4.2.2.2. Expresión proteica de MMP9 en COD

Se detectó expresión proteica en el citoplasma de células de la granulosa y de la teca de ambos grupos estudiados. En la figura 26 se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación obtenida en cada caso.

Si bien se obtuvo una intensa inmunomarcación específica, no se observaron diferencias significativas de MMP9 entre los quistes foliculares y folículos antrales provenientes de animales del grupo control ($p > 0,05$) (Figura 27).

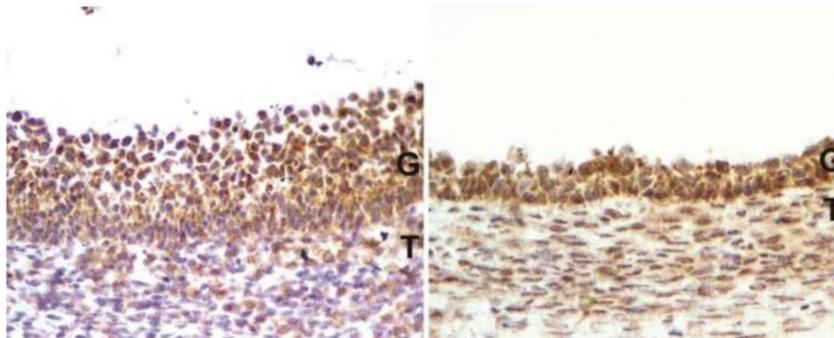


Figura 26. Imágenes representativas de la inmunomarcación de MMP9 en células de la granulosa (G) y de la teca interna (T) de folículos antrales de vacas control (A) y quistes espontáneos de vacas con COD (B). Aumento: 40X.

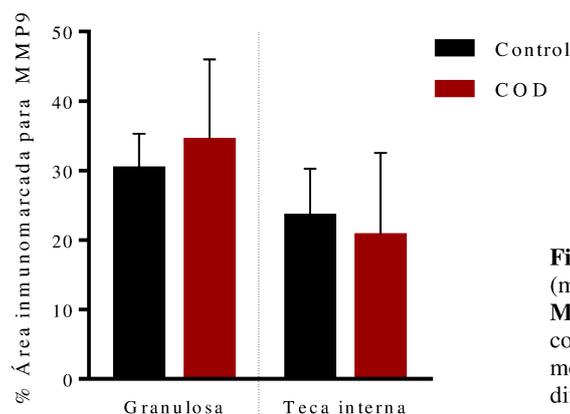


Figura 27. Niveles de expresión relativa de proteína (medida como porcentaje del área inmunopositiva) de MMP9 en células de la granulosa y de la teca de animales control (barras negras) y con COD espontánea (barras moradas). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.2.2.3. Actividad enzimática de MMP9 en el líquido folicular en COD

La actividad gelatinolítica de MMP9 fue detectada mediante zimografía sólo en las muestras de líquido folicular de quistes foliculares de COD espontánea (Figura 28).

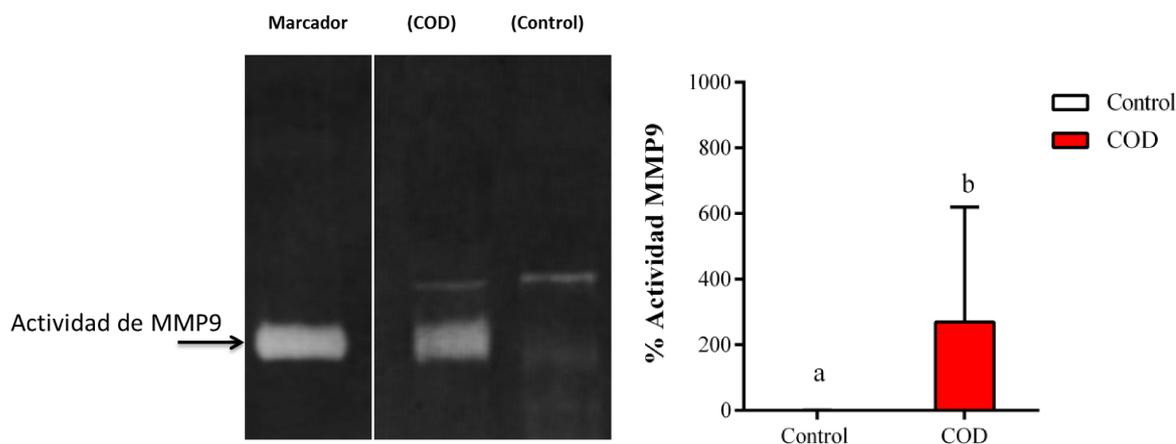


Figura 28. Análisis zimográfico para MMP9. *Izquierda:* Imagen representativa de zimografía en gel para la detección de la actividad enzimática de MMP9. *Derecha:* Actividad de MMP9 en líquido folicular de folículos preovulatorios control y quistes espontáneos de COD. Media \pm el DE. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2.3. TIMP1

4.2.3.1. Expresión génica de TIMP1

La secuenciación del amplificado correspondiente al inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1) obtenido por PCR convencional tuvo un 100% de homología con la secuencia de *Bos Taurus* reportada en el banco de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) empleando los cebadores específicos diseñados para tal fin.

Los niveles de ARNm encontrados en células foliculares de animales controles fueron significativamente mayores que los niveles encontrados en células foliculares provenientes de animales con COD ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 29

4.2.3.2. Expresión proteica y localización de TIMP1 en COD

La expresión proteica se detectó en el citoplasma de células de la granulosa y teca de quistes y folículos antrales. En la figura 30 se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación obtenida en cada caso.

No se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de área inmunomarcada entre quistes espontáneos y folículos antrales de animales controles tanto para las células de la granulosa como para las de la teca ($p > 0,05$) (figura 31).

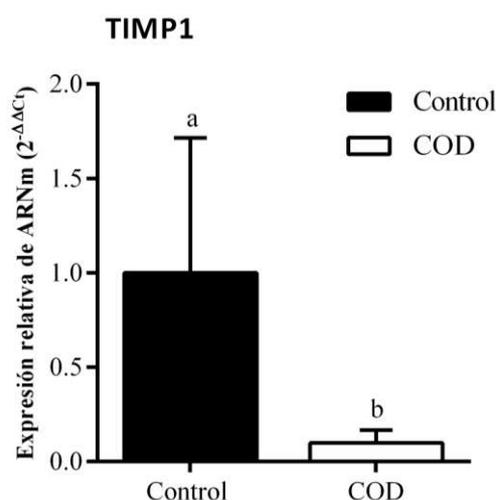


Figura 29. Niveles de expresión relativa de ARNm correspondiente a **TIMP1** en folículos preovulatorios de animales control y quistes foliculares de animales con COD espontánea. Los valores representan la media \pm DS. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

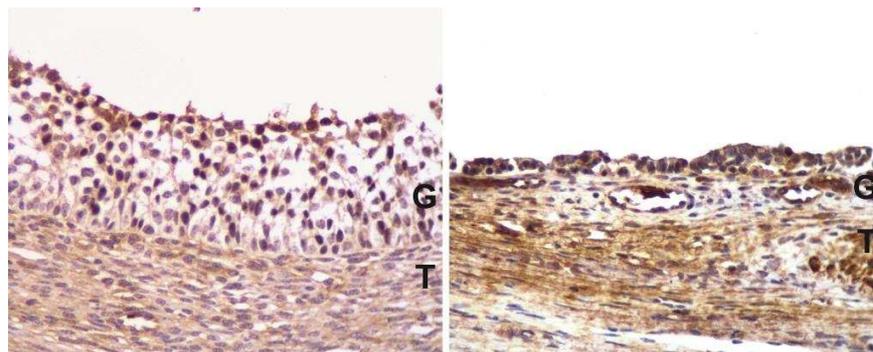


Figura 30. Imágenes representativas de la inmunomarcación de **TIMP1** en células de la granulosa (G) y de la teca interna (T) de folículos antrales de vacas controles (A) y quistes espontáneos de vacas con COD (B). Aumento: 40X.

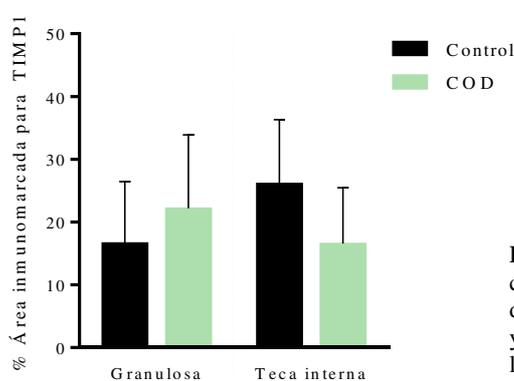


Figura 31. Niveles de expresión relativa de proteína (medida como porcentaje del área inmunopositiva) de **TIMP1** en células de la granulosa y de la teca de animales controles (barras negras) y con COD espontánea (barras verdes). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.2.4. TIMP2

4.2.4.1. Expresión génica de TIMP2

El resultado de la secuenciación correspondiente al amplificado obtenido por PCR tuvo un 100% de homología con la secuencia de *Bos Taurus* reportada en el banco de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) empleando los cebadores específicos diseñados para tal fin.

La expresión del ARNm correspondiente al inhibidor de metaloproteasa 2 (TIMP2) fue significativamente mayor en folículos preovulatorios provenientes de animales controles que en folículos quísticos de vacas con COD ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 32.

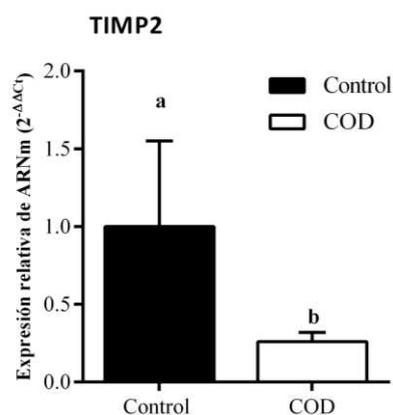


Figura 32. Niveles de expresión relativa de ARNm correspondiente a **TIMP2** en folículos preovulatorios de animales control y quistes foliculares de animales con COD espontánea. Los valores representan la media \pm DS. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2.4.2. Expresión proteica y localización de TIMP2

Se detectó inmunexpresión para TIMP2 en citoplasma de células de la granulosa y de la teca interna tanto de quistes como de folículos antrales. En la figura 33 se muestran imágenes representativas de la inmunomarcación obtenida en cada caso.

La inmunomarcación fue mayor en el citoplasma de folículos antrales del grupo control con respecto a los folículos quísticos ($p < 0,05$) (Figura 34), tanto en las células de la granulosa como de la teca interna.

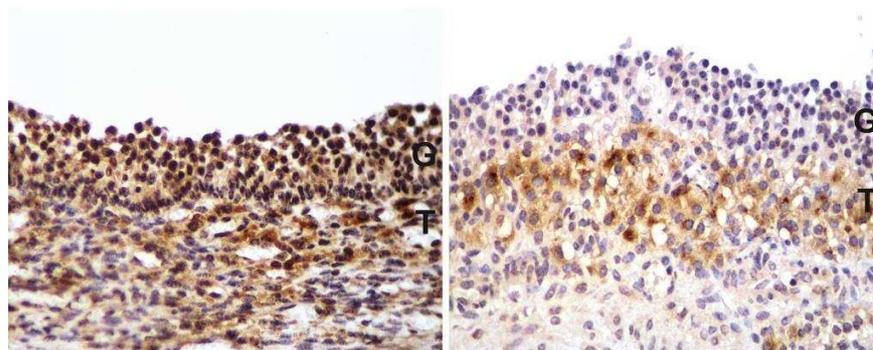


Figura 33. Imágenes representativas de la inmunomarcación de **TIMP2** en células de la granulosa (G) y de la teca interna (T) de folículos antrales de vacas control (A) y quistes espontáneos de vacas con COD (B). Aumento: 40X.

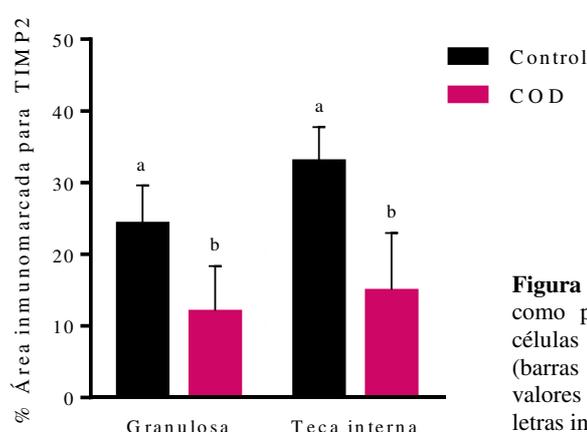


Figura 34. Niveles de expresión relativa de proteína (medida como porcentaje del área inmunopositiva) de **TIMP2** en células de la granulosa y de la teca de animales control (barras negras) y con COD espontánea (barras verdes). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.3. Localización, actividad y expresión de MMPs y TIMPs en el modelo de inducción de estrés mediante administración de ACTH.

La expresión de las proteínas MMP2, MMP9, MMP14, TIMP1 y TIMP2 fue detectada en las células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares estudiadas en los grupos de ACTH y controles. Los controles negativos no mostraron inmunomarcación en ninguna de las categorías foliculares. La actividad enzimática de las MMP2 y MMP9 fue detectada en LF de ambos grupos experimentales. A través de western blot se pudo corroborar que los anticuerpos empleados en IHQ fueron específicos para cada proteína en estudio. Las imágenes del inmunoblotting se muestran junto con los paneles de imágenes de IHQ para cada proteína evaluada (Figuras 40, 46, 51, 56 y 61).

4.3.1. MMP2

4.3.1.1. Actividad enzimática de MMP2 en el líquido folicular obtenidos de los grupos correspondientes al modelo de ACTH

La actividad gelatinolítica de MMP2 fue detectada mediante zimografía en todas las muestras de líquido folicular evaluadas, tanto de los folículos preovulatorios de los grupos control así como los del grupo tratado con ACTH. El análisis zimográfico reveló mayor actividad en el LF de los animales tratados con ACTH respecto de los controles ($p < 0,05$) (Figura 35).

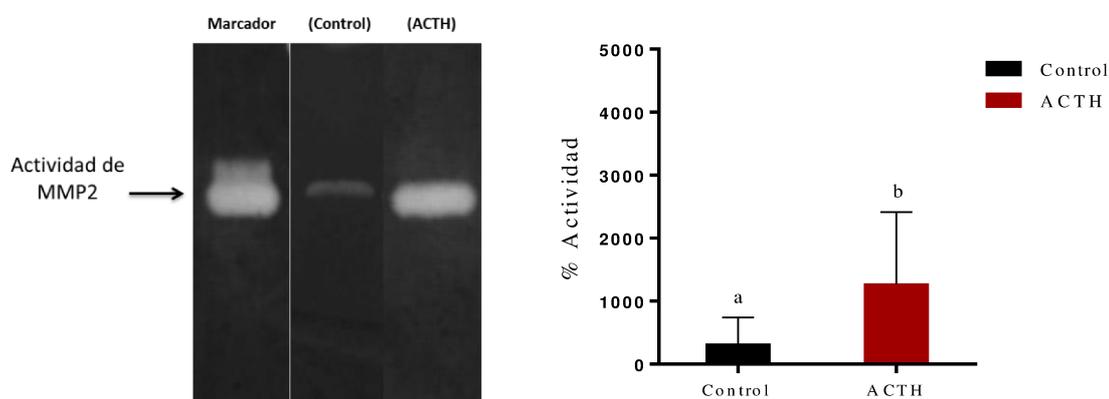


Figura 35. Análisis zimográfico para MMP2. *Izquierda:* Imagen representativa de zimografía en gel para la detección de la actividad enzimática de MMP2. *Derecha:* Actividad de MMP2 en líquido folicular de folículos preovulatorios de los grupos Control y ACTH, representados como un porcentaje del control utilizado en la zimografía en gelatina. Los valores representan la media \pm el DS. Las letras diferentes representan diferencia significativa ($p < 0,05$).

4.3.1.2. Expresión proteica y localización de MMP2 en el modelo de ACTH

La expresión de MMP2 fue detectada en el citoplasma tanto de las células de la granulosa, como así también en el de las células de la teca interna de los folículos ováricos. En cada grupo experimental se realizó el análisis de la expresión de esta proteína a lo largo de la foliculogénesis. En el grupo control, la expresión de esta proteína fue mayor de las células de la granulosa de los folículos preovulatorios que de los folículos antrales y atresicos ($p < 0,05$). En la teca interna, las células mostraron mayor expresión de MMP2 en los folículos preovulatorios en comparación con todas las otras categorías foliculares ($p < 0,05$) (Figura 36).

El grupo tratado con ACTH, presentó menor expresión en las células de la granulosa de los folículos atresicos, en relación a los folículos primarios y preantrales. Los folículos preovulatorios mostraron mayor inmunomarcación que los folículos atresicos ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias en las células de la teca interna (Figura 37).

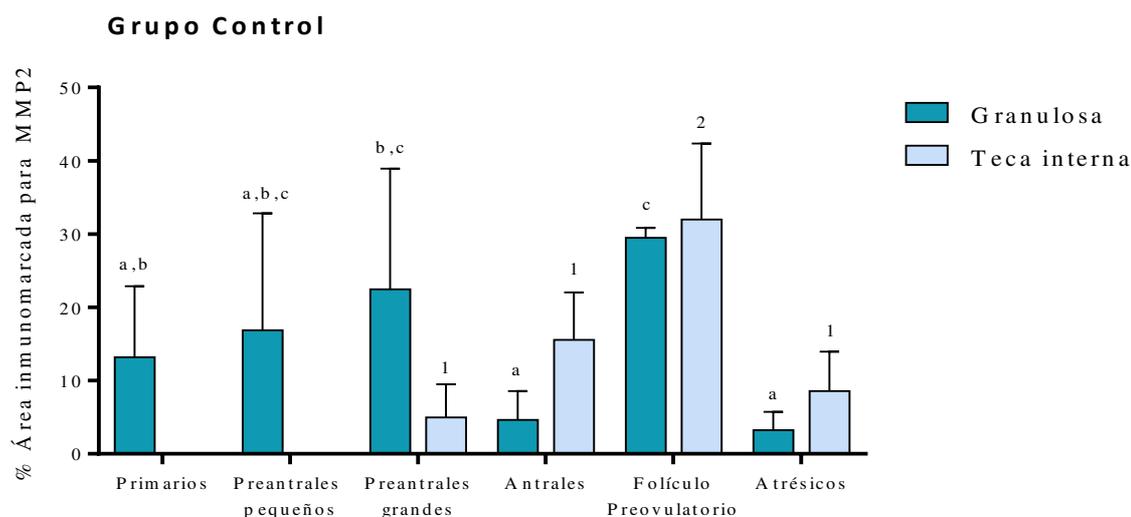


Figura 36. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP2** en el grupo control del modelo experimental. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

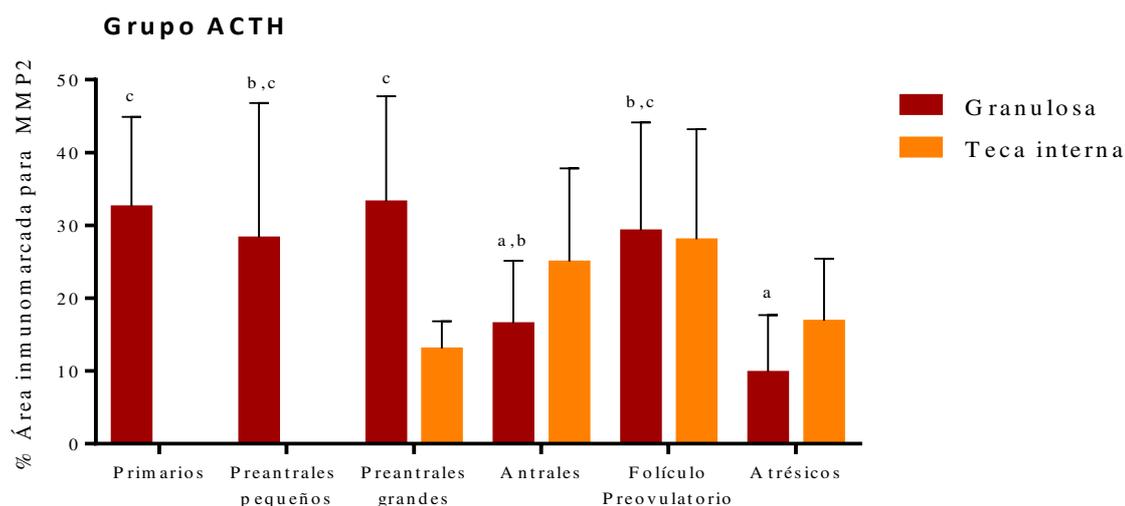


Figura 37. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP2** en el grupo tratado con ACTH del modelo experimental. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

De la comparación entre el grupo tratado con ACTH y el grupo control, se puede apreciar que las células de la granulosa de los folículos primarios y antrales del grupo tratado con ACTH mostraron mayor expresión que las del grupo control de las mismas categorías. Los folículos preovulatorios del grupo tratado con ACTH presentaron mayor inmunomarcación que los folículos antrales del grupo control ($p < 0,05$). En las células de la teca interna, los folículos antrales y folículos atrésicos del grupo tratado con ACTH mostraron una mayor expresión que los del grupo control. Asimismo, las células de la granulosa de los folículos preovulatorios del grupo tratado con ACTH mostraron mayor marcación que los folículos antrales del grupo control ($p = 0,05$) y que los antrales del grupo tratado con ACTH ($p < 0,05$) (Figuras 38, 39, 40 y 41).

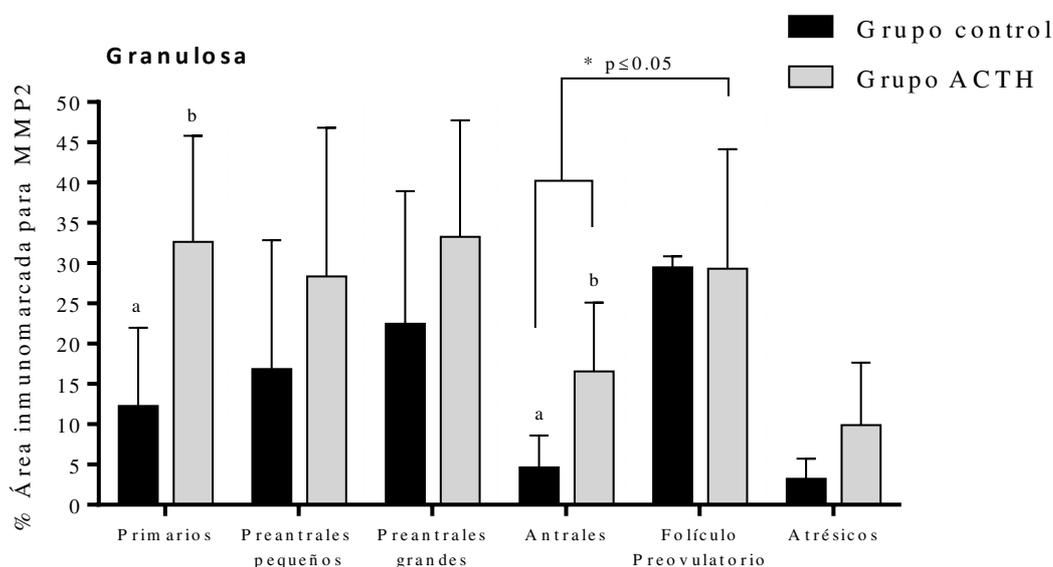


Figura 38. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de MMP 2 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría de ($p < 0,05$).

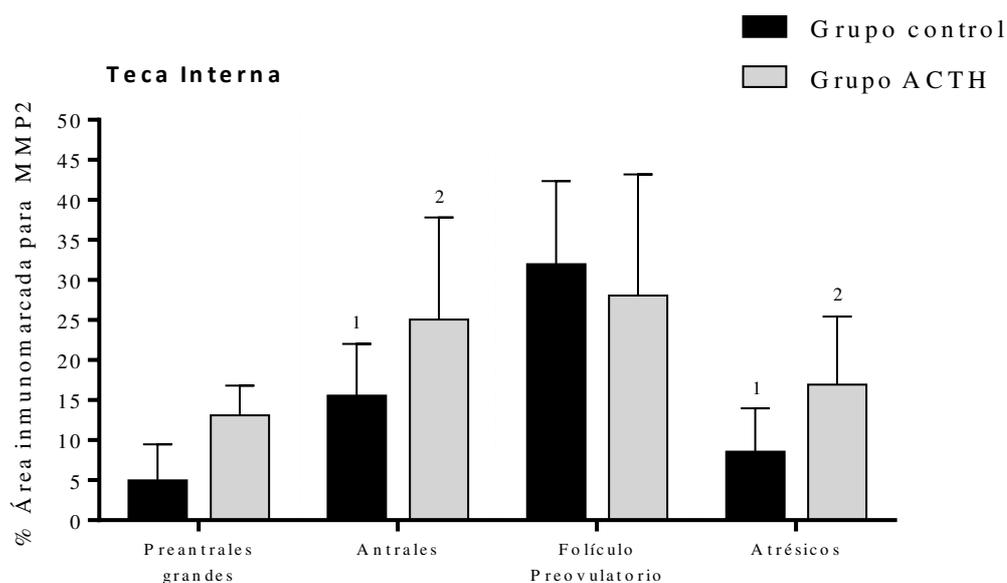


Figura 39. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP 2** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números indican diferencias significativas dentro de la misma categoría de ($p < 0,05$).

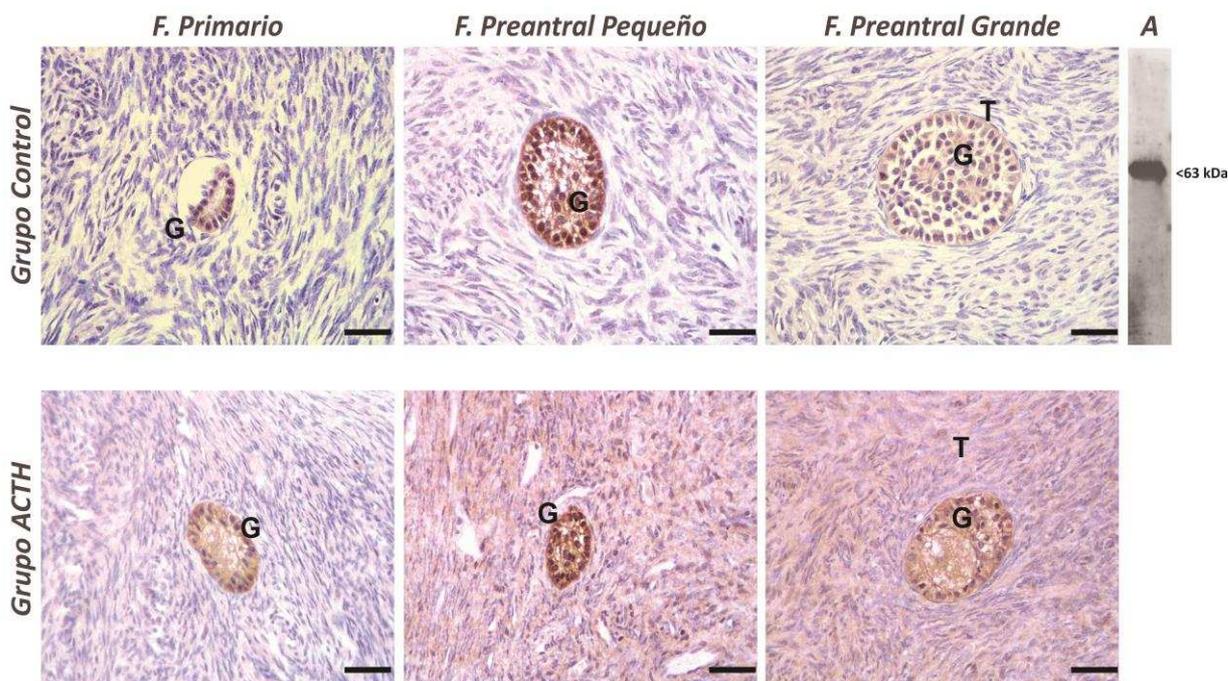


Figura 40. Diferentes estructuras foliculares pequeñas del ovario, inmunomarcadas para **MMP2** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna. A: En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de **MMP2** (63 kDa).

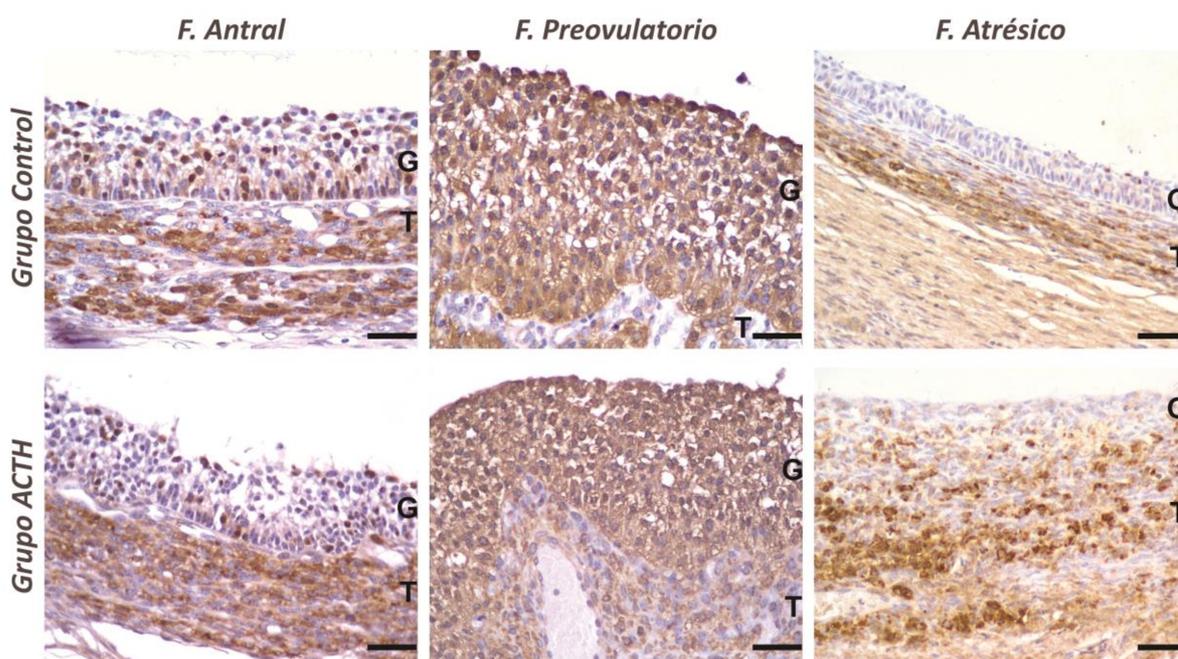


Figura 41. Diferentes estructuras foliculares grandes del ovario, inmunomarcadas para **MMP2** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μm . G: granulosa, T: Teca interna.

4.3.2. MMP9

4.3.2.1. Actividad enzimática de MMP9 en el líquido folicular.

La actividad gelatinolítica de MMP9 no fue detectada mediante zimografía en las muestras analizadas en ambos grupos (Figura 42).

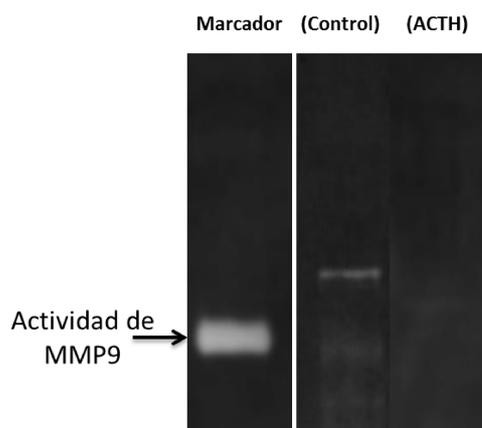


Figura 42. Análisis zimográfico para **MMP9**. Imagen representativa de zimografía en gel para la detección de la actividad enzimática de MMP9.

4.3.2.2. Expresión proteica y localización de MMP9.

La expresión de MMP9 fue observada en las células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares analizadas. En cada grupo experimental se realizó el análisis

de la expresión de esta proteína a lo largo de la foliculogénesis. En las células de la granulosa del grupo control se detectó una mayor expresión en los folículos antrales y preovulatorios en comparación con los preantrales grandes ($p < 0,05$), mientras que en las células de la teca interna, la expresión fue mayor en los folículos antrales y los preovulatorios que en los preantrales grandes y los folículos atrésicos ($p < 0,05$) (Figura 43)

En el grupo tratado con ACTH, la expresión de esta enzima fue mayor en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios que en los folículos preantrales pequeños y grandes ($p < 0,05$). En la teca interna, las células de los folículos preovulatorios tuvieron mayor expresión que los folículos preantrales grandes y atrésicos ($p < 0,05$) (Figura 44).

No se hallaron diferencias en las diferentes categorías foliculares cuando se realizó la comparación entre grupos ($p > 0,05$) (Figuras 45, 46, 47 y 48).

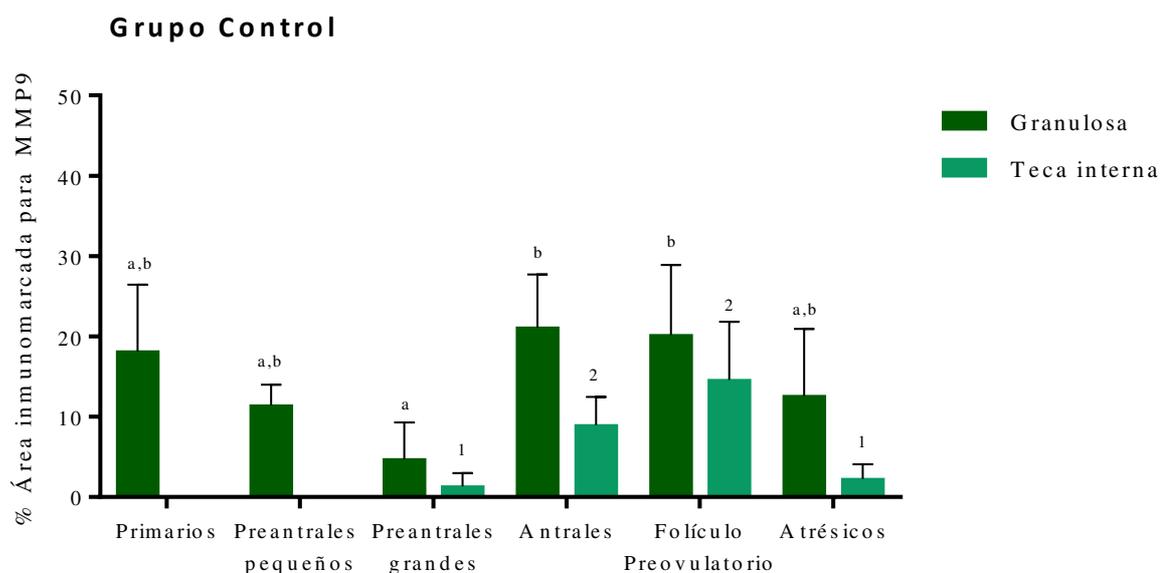


Figura 43. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP9** en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

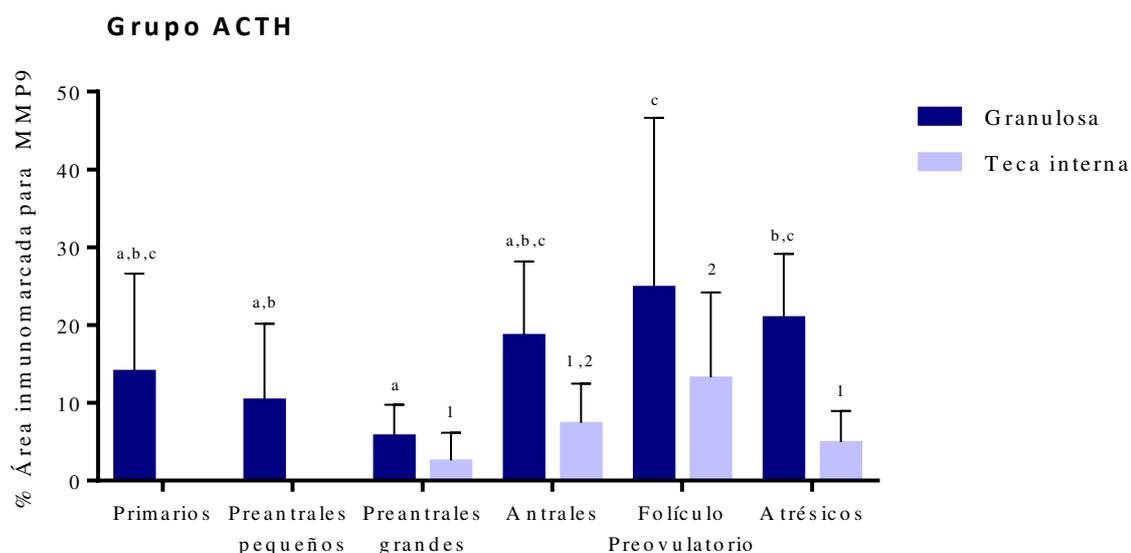


Figura 44. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP9** en el grupo tratado con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

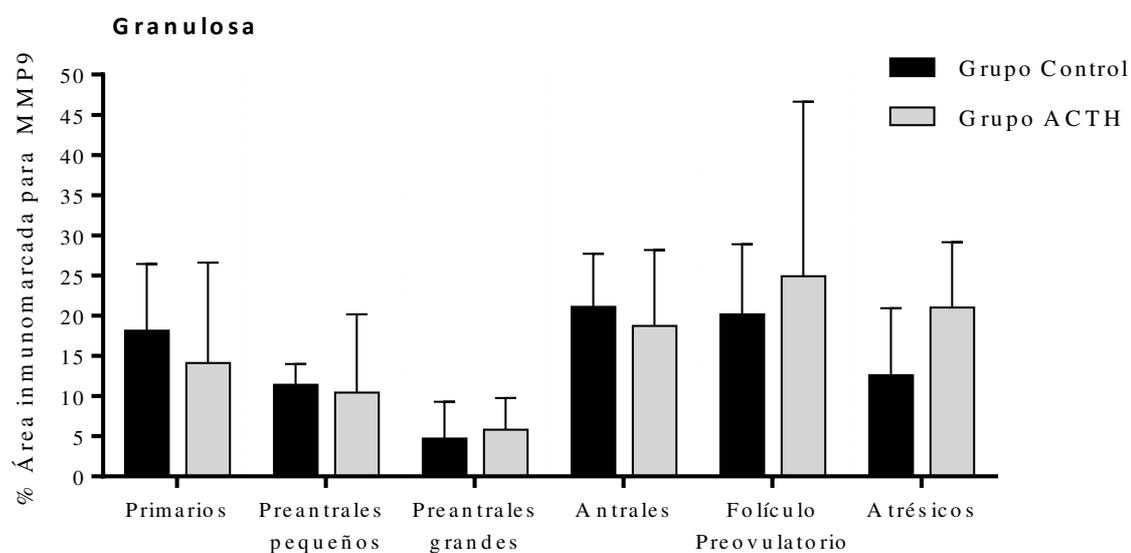


Figura 45. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP9** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

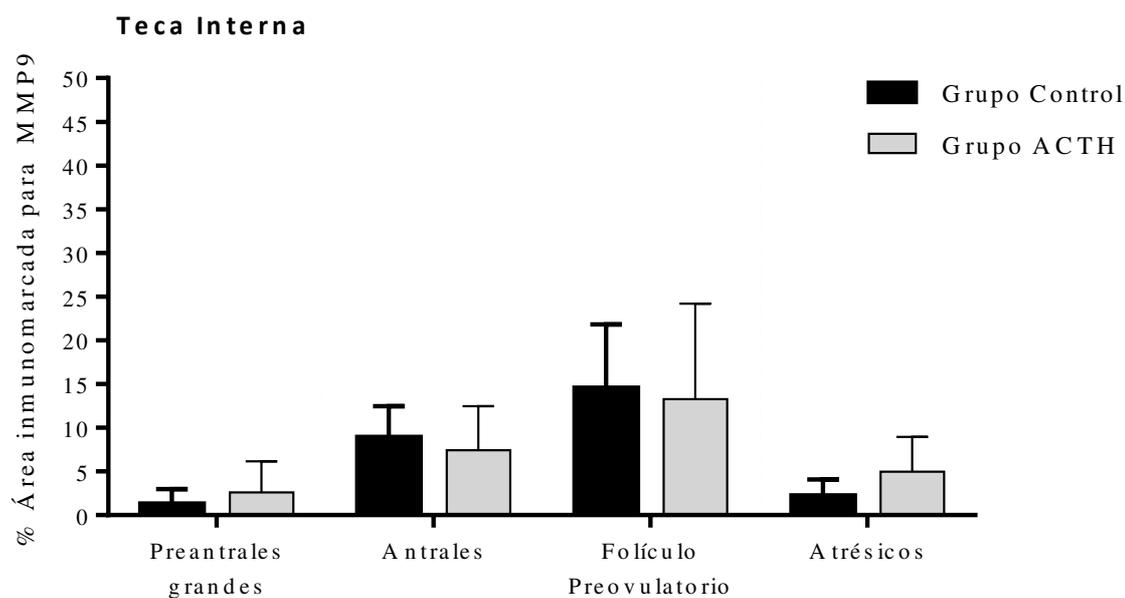


Figura 46. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP9** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

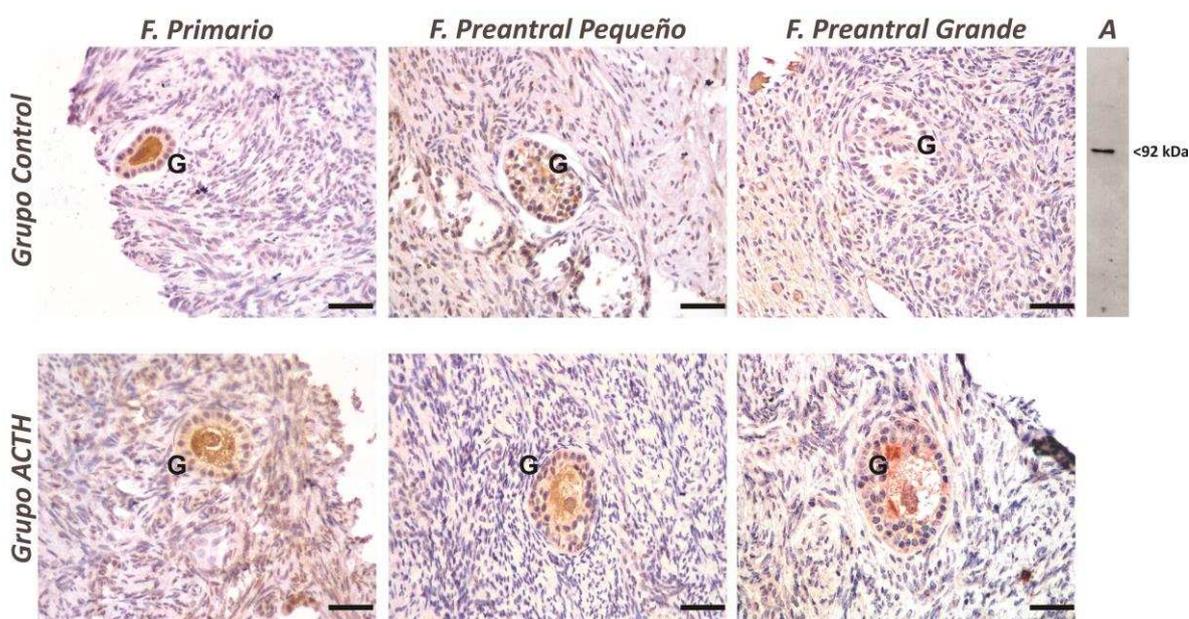


Figura 47. Diferentes estructuras foliculares pequeñas del ovario, inmunomarcadas para **MMP9** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna. A: En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de **MMP9** (92 kDa).

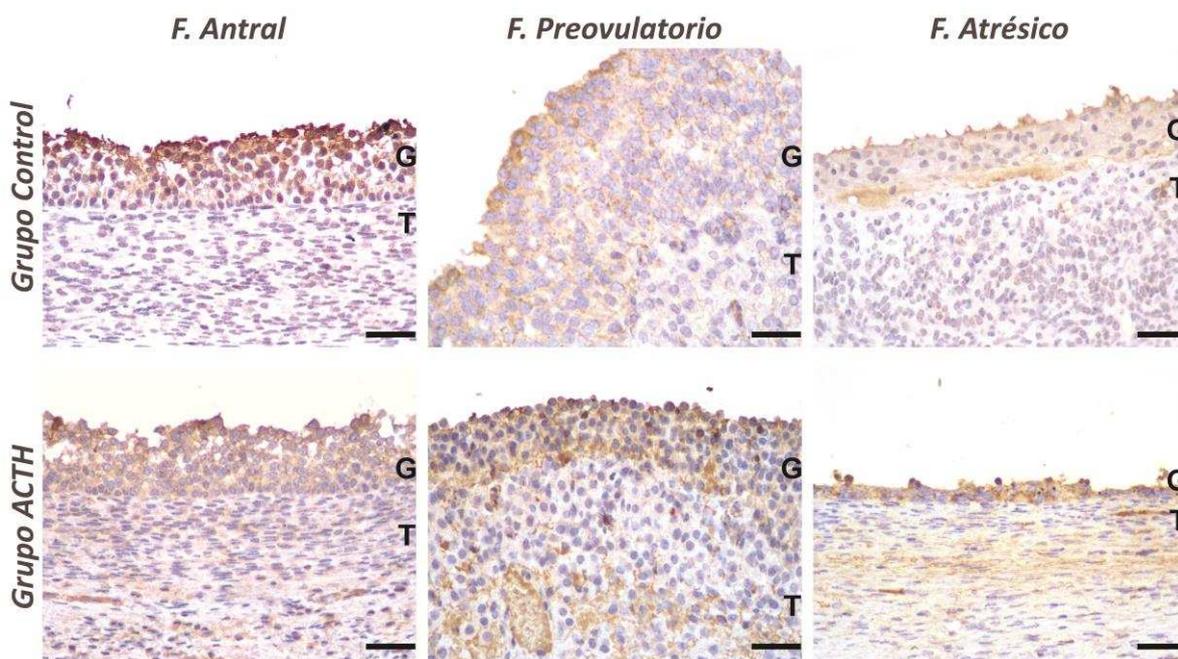


Figura 48. Diferentes estructuras foliculares grandes del ovario, inmunomarcadas para **MMP9** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μm . G: granulosa, T: Teca interna.

4.3.3. Expresión proteica y localización de MMP14

La expresión proteica de MMP14 se observó en el citoplasma de células de la granulosa y teca interna de todas las categorías analizadas de los animales controles y del

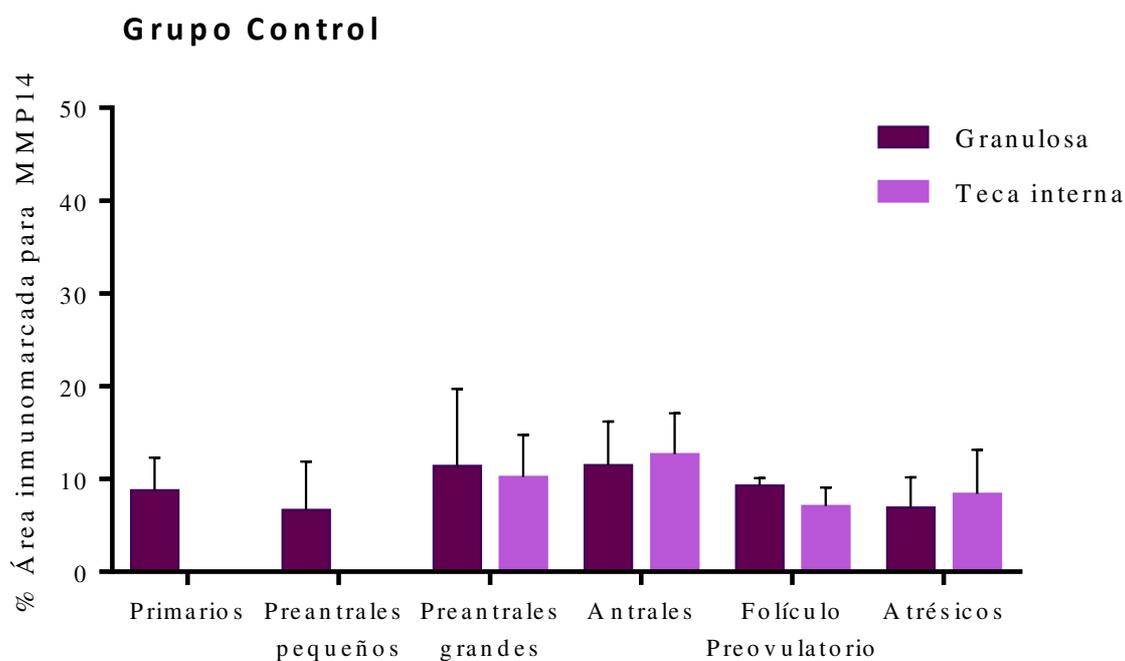


Figura 49. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP14** en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

modelo de ACTH.

No se encontraron diferencias significativas entre las categorías foliculares evaluadas (Figuras 49 y 50), ni entre los grupos estudiados ($p > 0,05$) (Figuras 51, 52, 53 y 54).

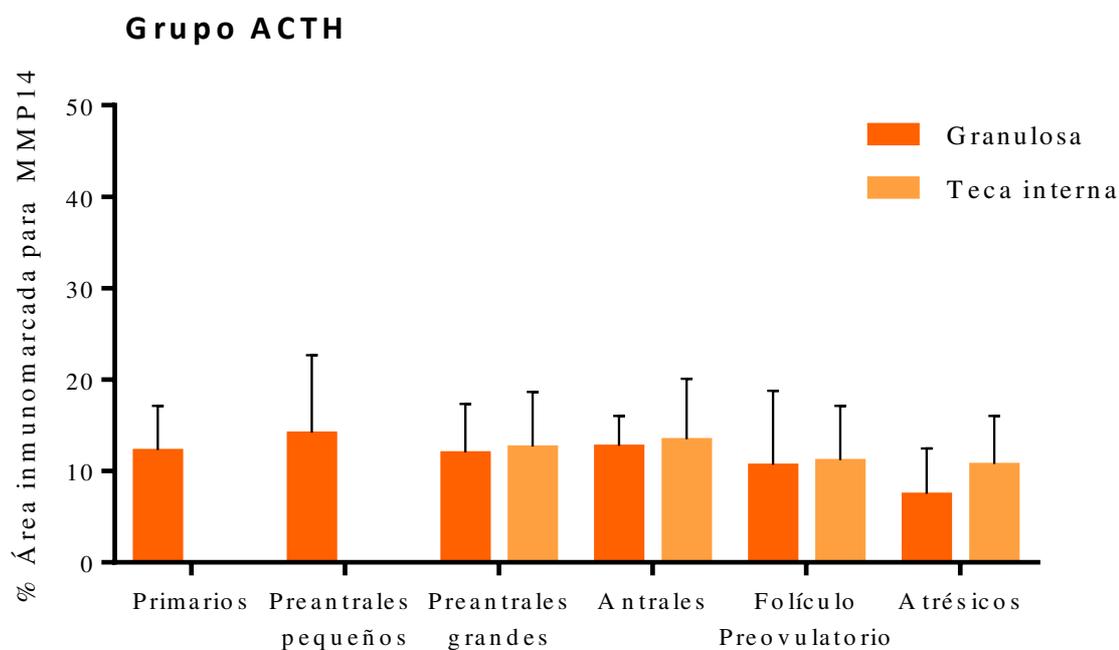


Figura 50. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP14** en el grupo tratado con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

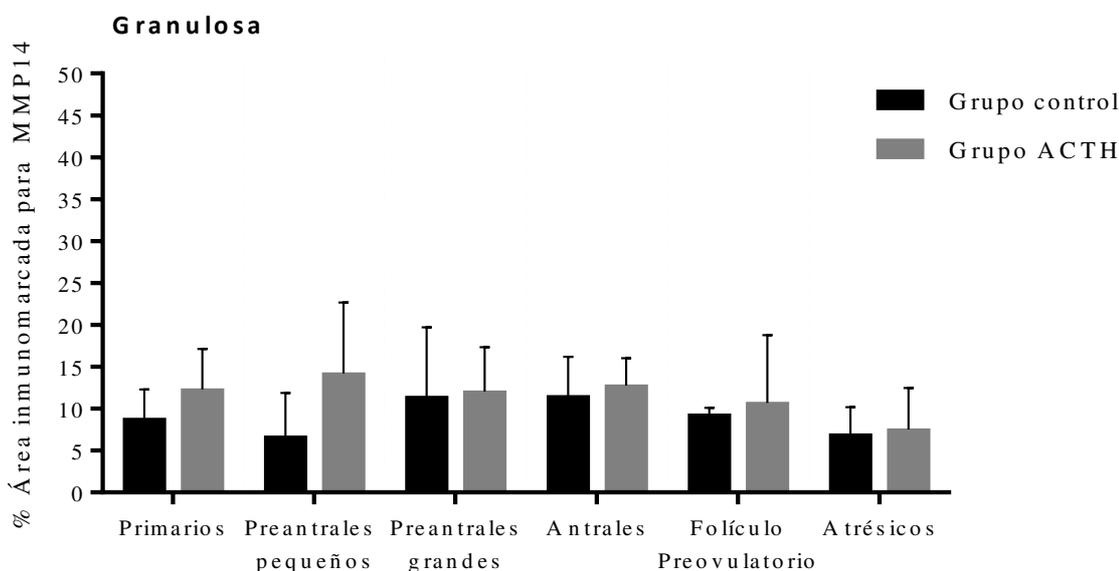


Figura 51. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP14** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

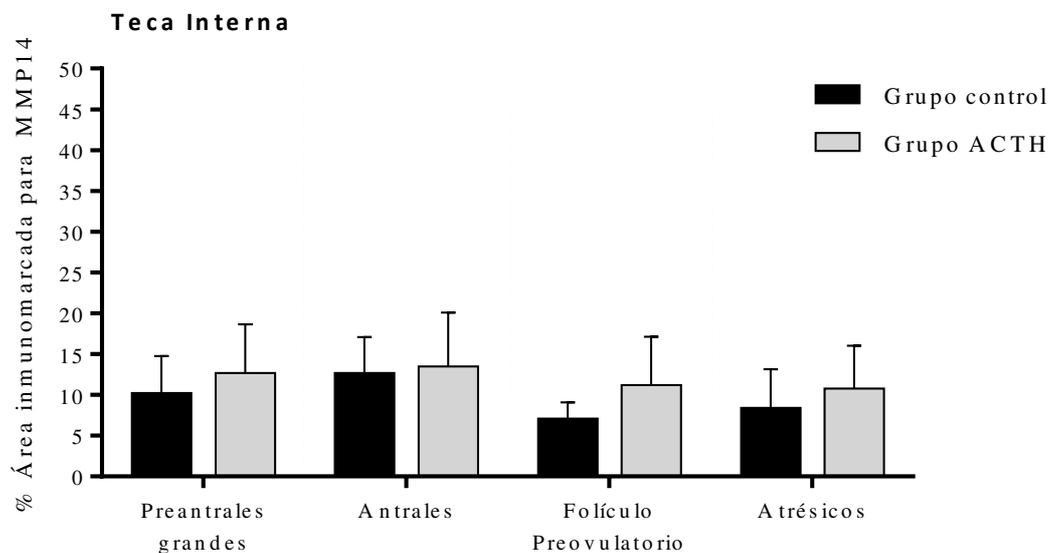


Figura 52. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **MMP14** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

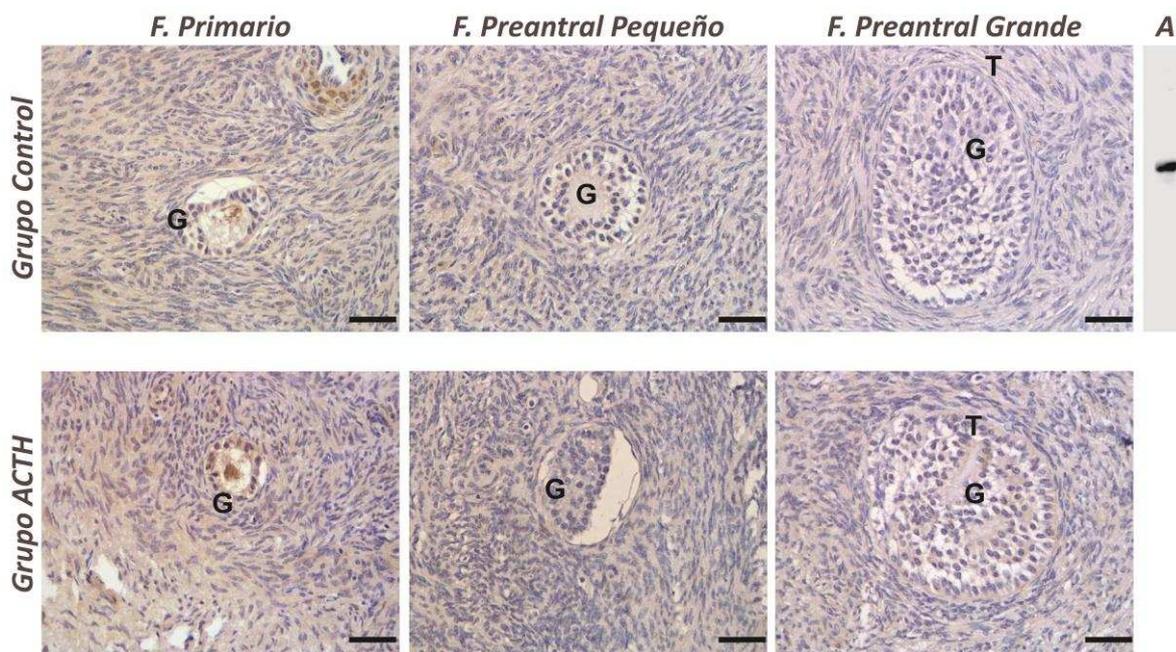


Figura 53. Diferentes estructuras foliculares pequeñas del ovario, inmunomarcadas para **MMP14** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna. A: En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de **MMP14** (63 kDa).

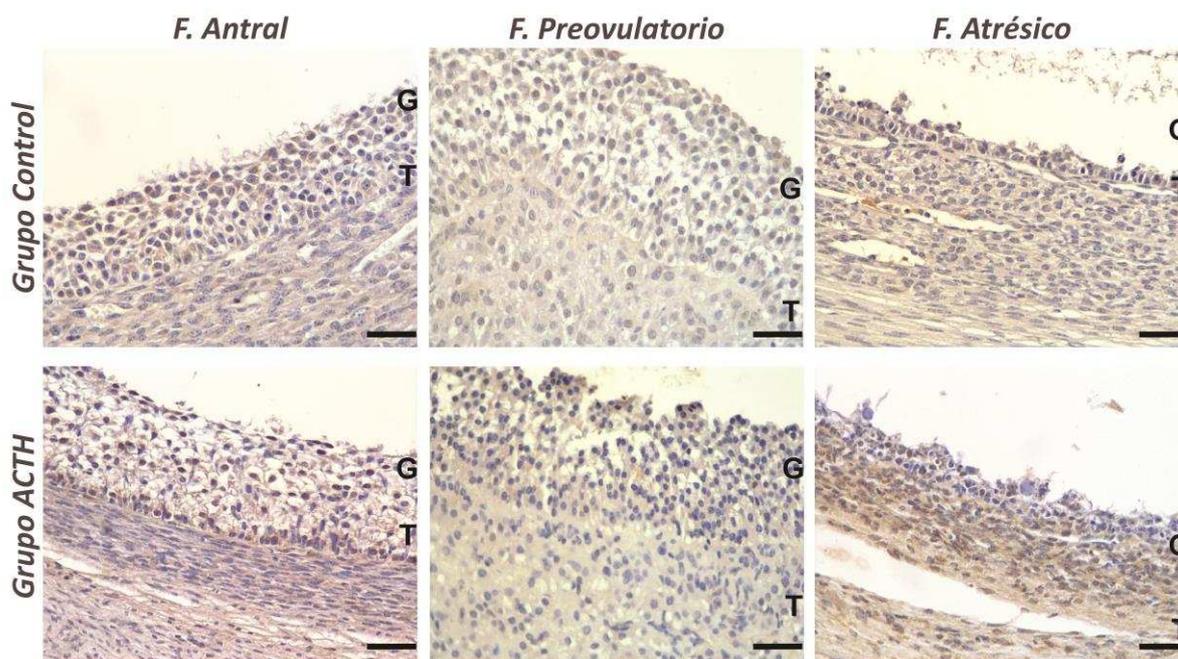


Figura 54. Diferentes estructuras foliculares grandes del ovario, inmunomarcadas para **MMP14** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna.

4.3.4. Expresión proteica y localización de TIMP1

La expresión de TIMP 1 se detectó en células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares evaluadas. En el grupo control (Figura 55), no se observaron

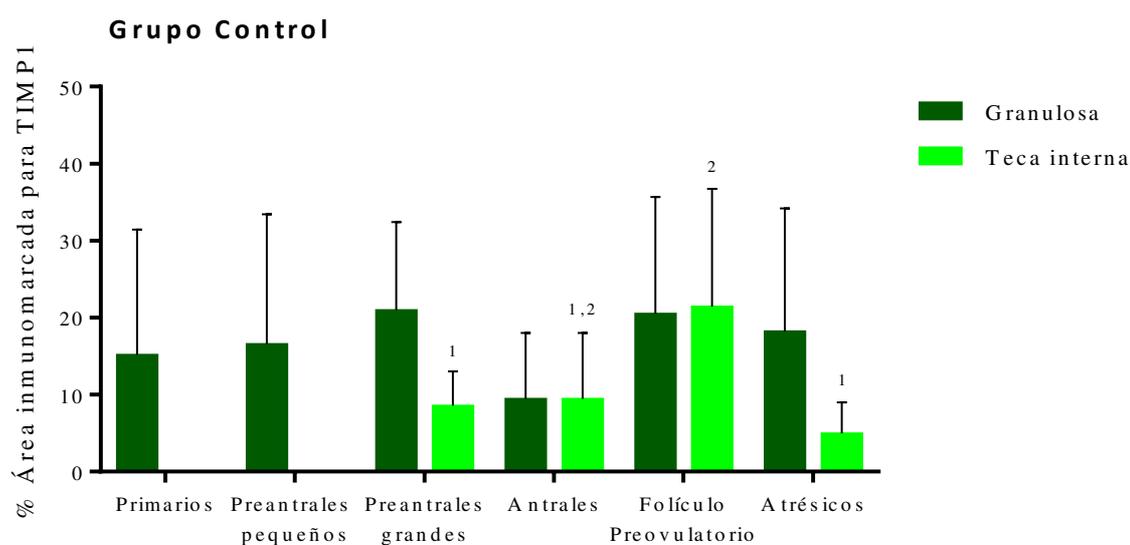


Figura 55. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TIMP1** en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

diferencias significativas en la expresión de esta proteína en las células de la granulosa de todas las categorías foliculares analizadas ($p > 0,05$). Las células de la teca interna mostraron mayor expresión en los folículos antrales preovulatorios que en los folículos preantrales grandes y atrésicos ($p < 0,05$).

En el grupo tratado con ACTH, se evidenció mayor expresión de TIMP1 en las células de la teca interna de los folículos preovulatorios que en los folículos atrésicos ($p < 0,05$). En contraste, las células de la granulosa de este grupo no mostraron diferencias significativas entre las diferentes categorías foliculares analizadas (Figura 56).

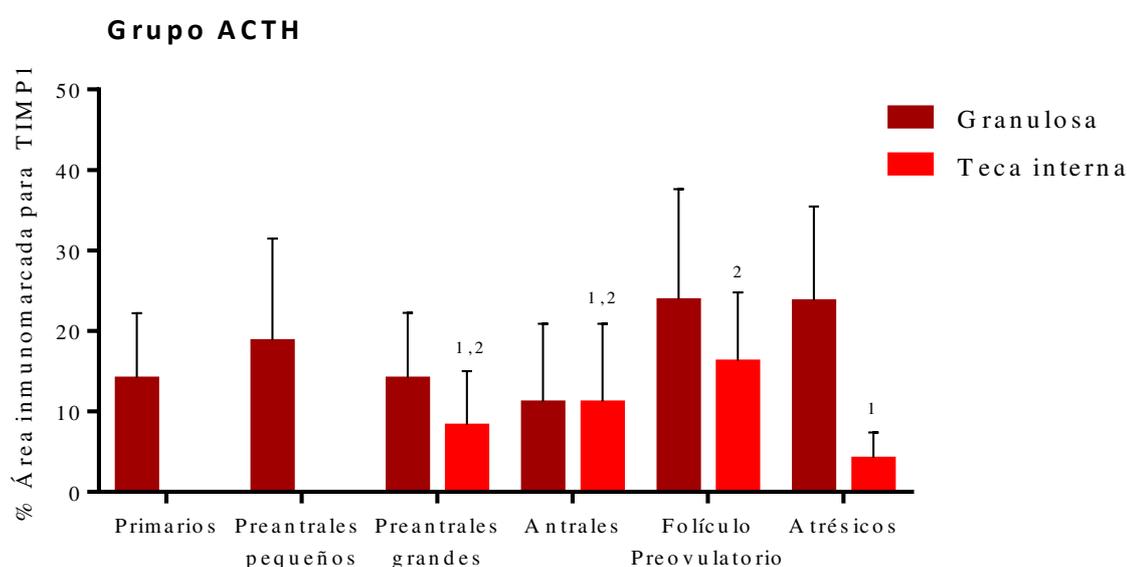


Figura 56. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TIMP1 en el grupo tratado con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

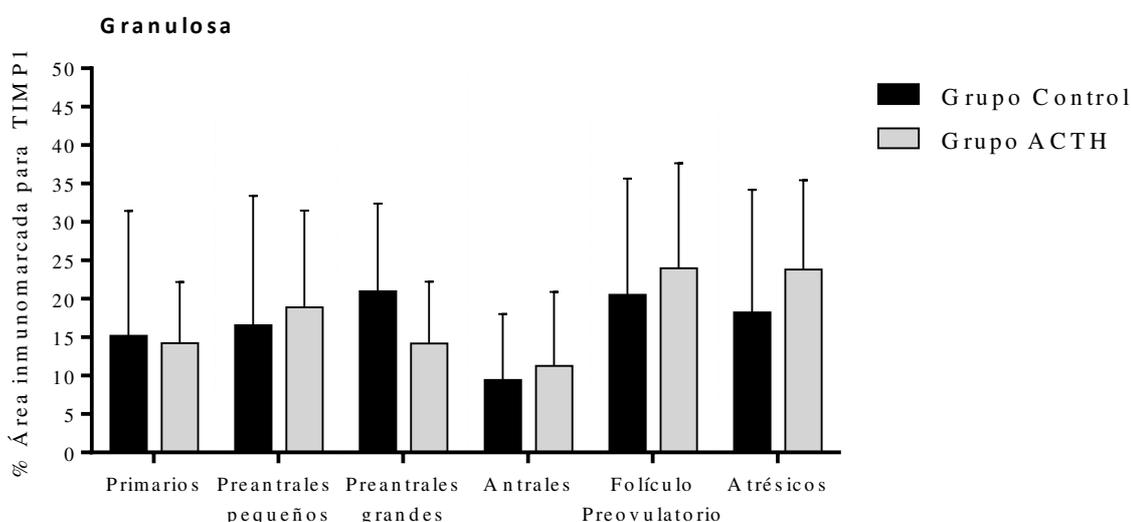


Figura 57. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TIMP1 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

No se apreciaron diferencias en el porcentaje de área inmunomarcada al comparar las diferentes categorías foliculares entre grupos ($p > 0,05$) (Figuras 57, 58, 59 y 60).

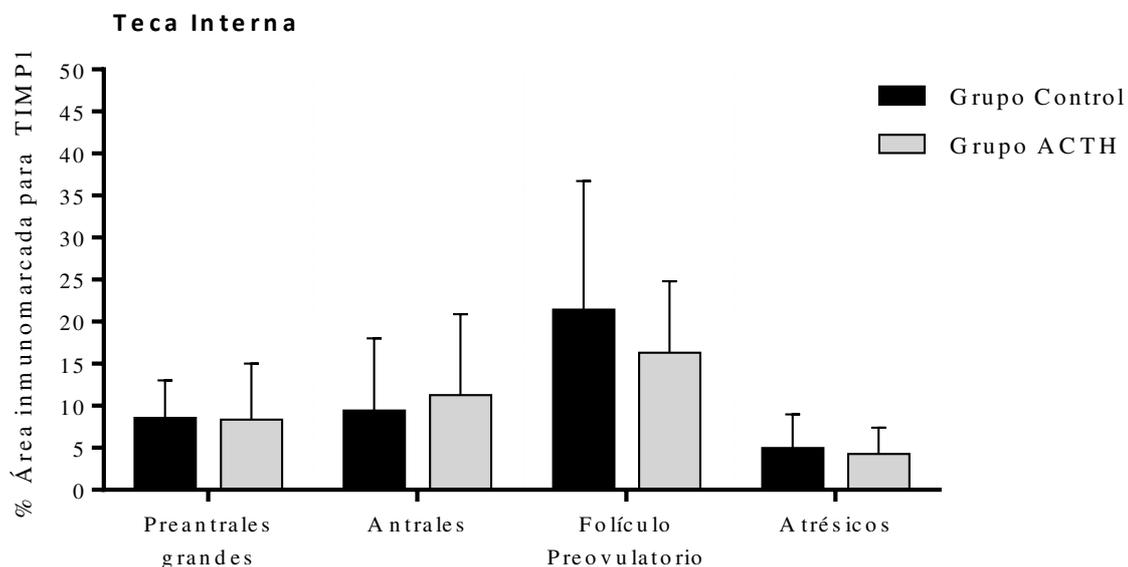


Figura 58. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TIMP1** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

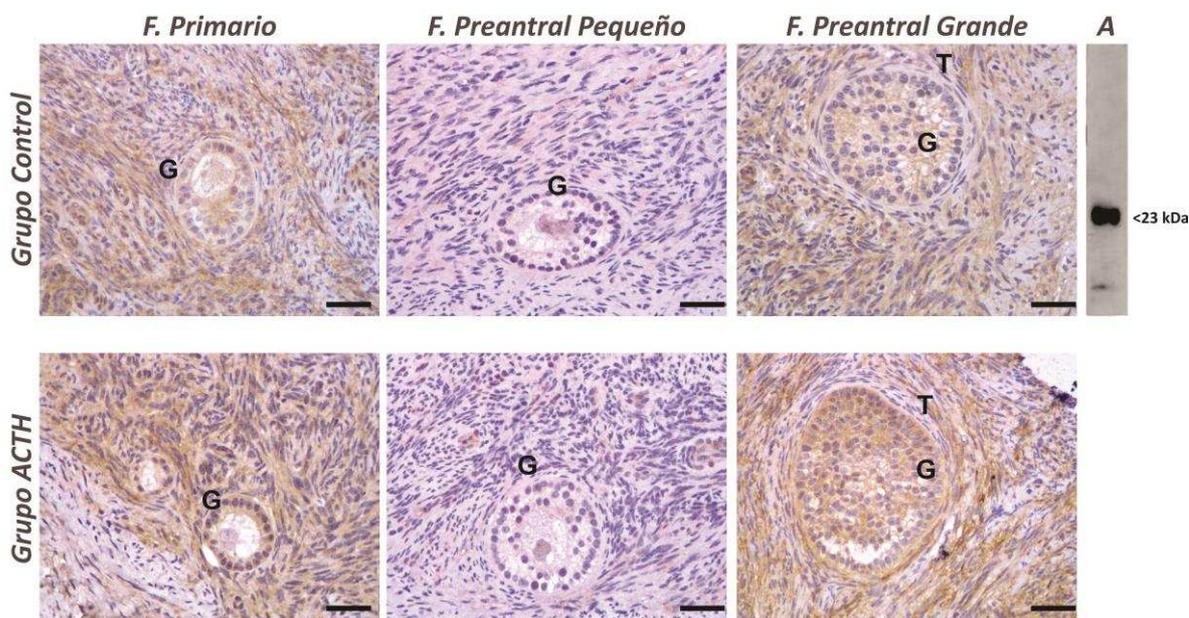


Figura 59. Diferentes estructuras foliculares pequeñas del ovario, inmunomarcadas para **TIMP1** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna. A: En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de **TIMP1** (23 kDa).

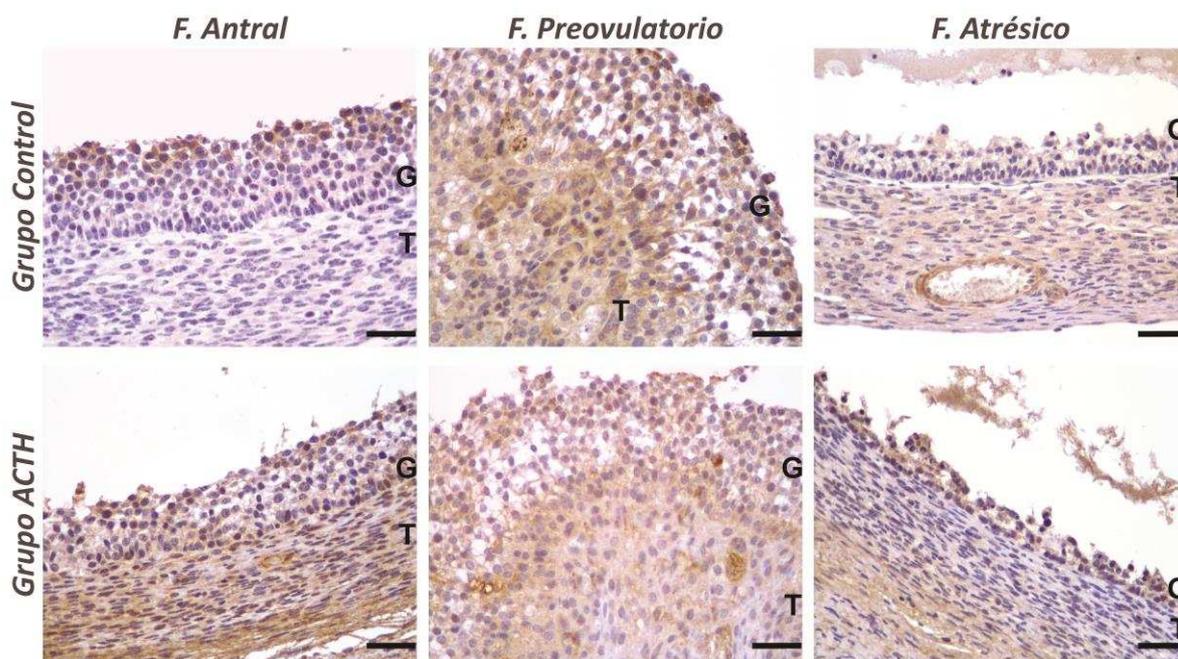


Figura 60. Diferentes estructuras foliculares grandes del ovario, inmunomarcadas para **TIMP1** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μm . G: granulosa, T: Teca interna.

4.3.5. Expresión proteica y localización de TIMP2.

La expresión de TIMP2 se evidenció en el citoplasma y núcleo de las células de la granulosa y teca interna de las diferentes categorías foliculares, no encontrándose diferencias significativas entre las células de la granulosa de las diferentes categorías foliculares del grupo control. En las células de la teca interna, en cambio, el porcentaje de área inmunomarcada fue mayor en los folículos antrales preovulatorios, en relación a las otras categorías foliculares ($p < 0,05$) (Figura 61). En el grupo tratado con ACTH, la expresión proteica de TIMP2 fue similar entre las células de la granulosa de todas las categorías foliculares analizadas. En la teca interna, se detectó una mayor expresión de este inhibidor en los folículos preovulatorios en comparación con las otras categorías foliculares evaluadas ($p < 0,05$) (figura 62). Esta proteína presentó niveles similares de expresión al ser comparada entre ambos grupos evaluados, tanto en las células de la granulosa, como en las células de la teca interna ($p < 0,05$) (Figuras 63, 64, 65 y 66).

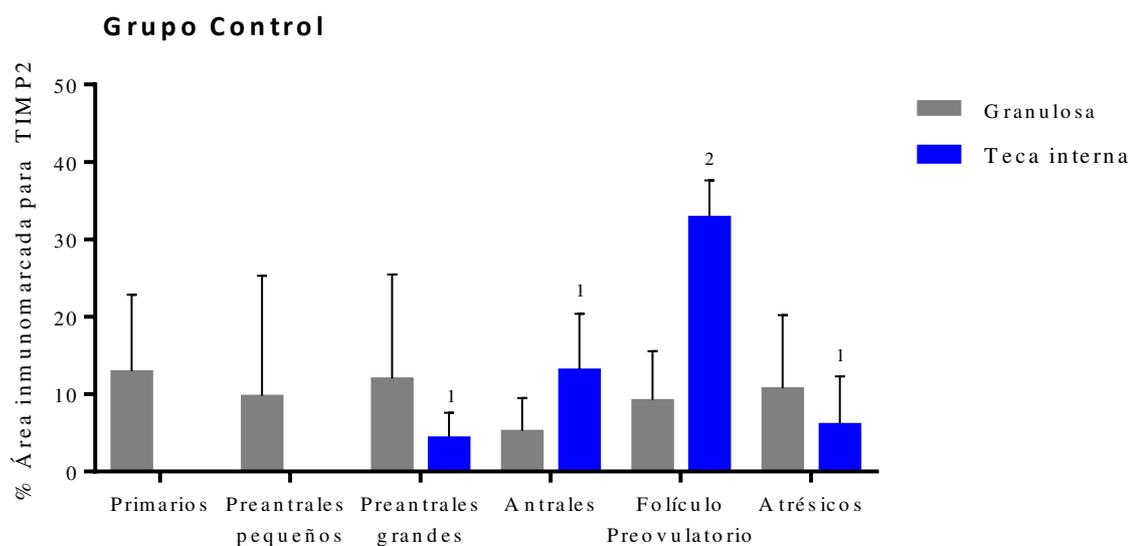


Figura 61. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TIMP2** en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

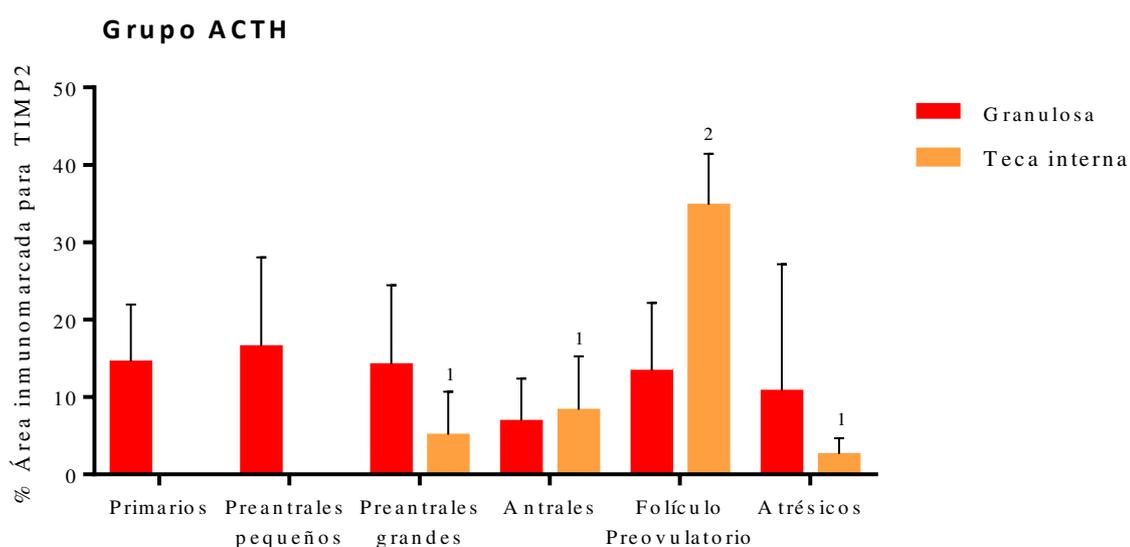


Figura 62. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TIMP2** en el grupo tratado con ACTH. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

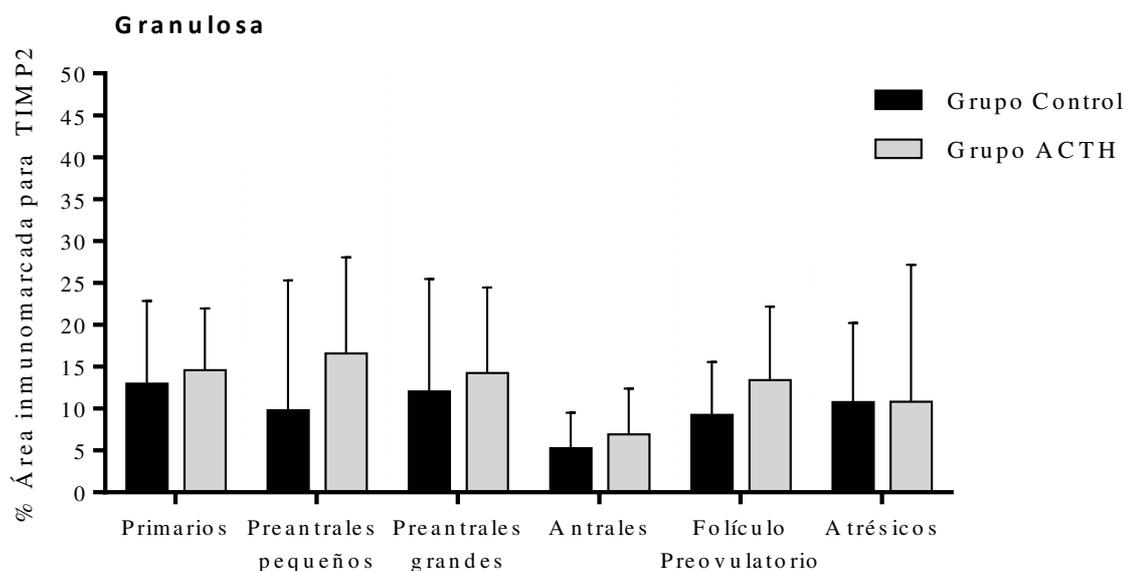


Figura 63. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TIMP2** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

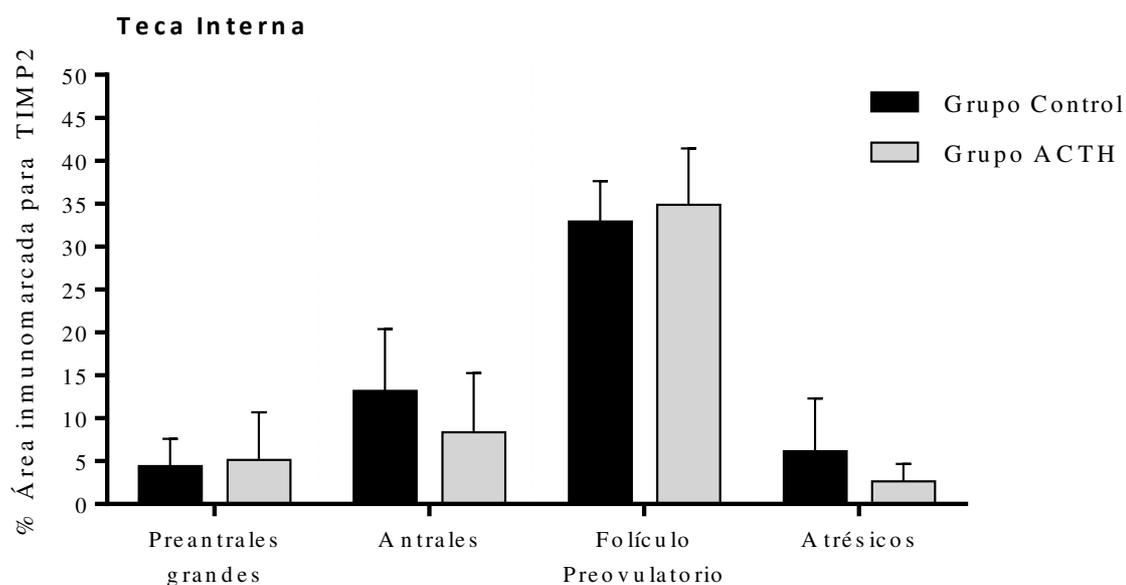


Figura 64. Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TIMP2** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: negro; ACTH: gris). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

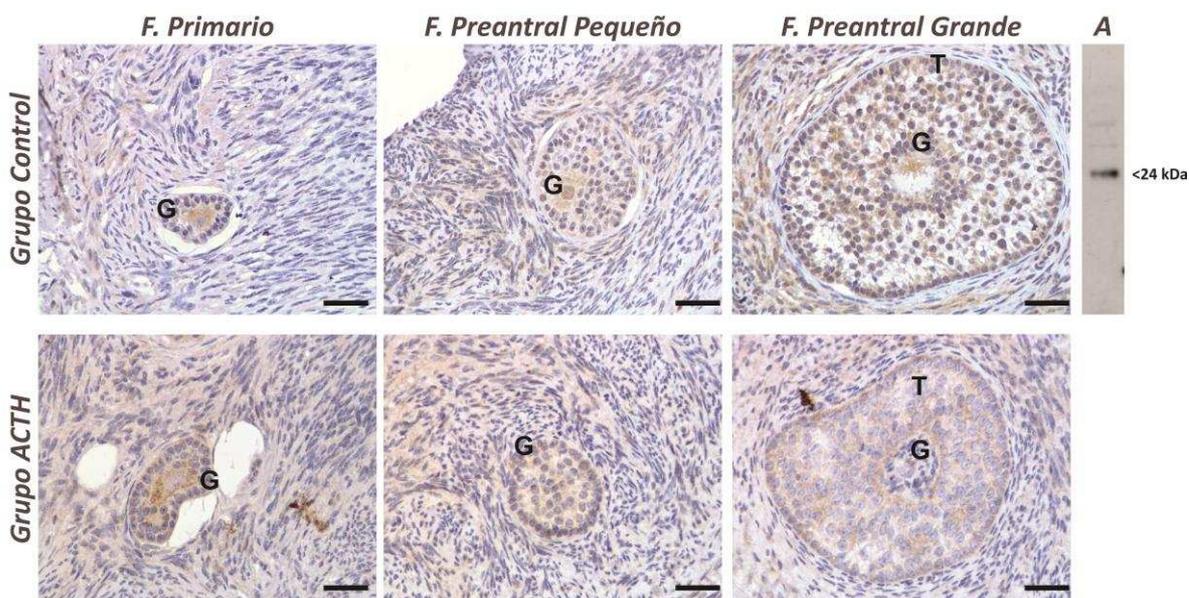


Figura 65. Diferentes estructuras foliculares pequeñas del ovario, inmunomarcadas para **TIMP2** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna. A: En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de **TIMP2** (24 kDa).

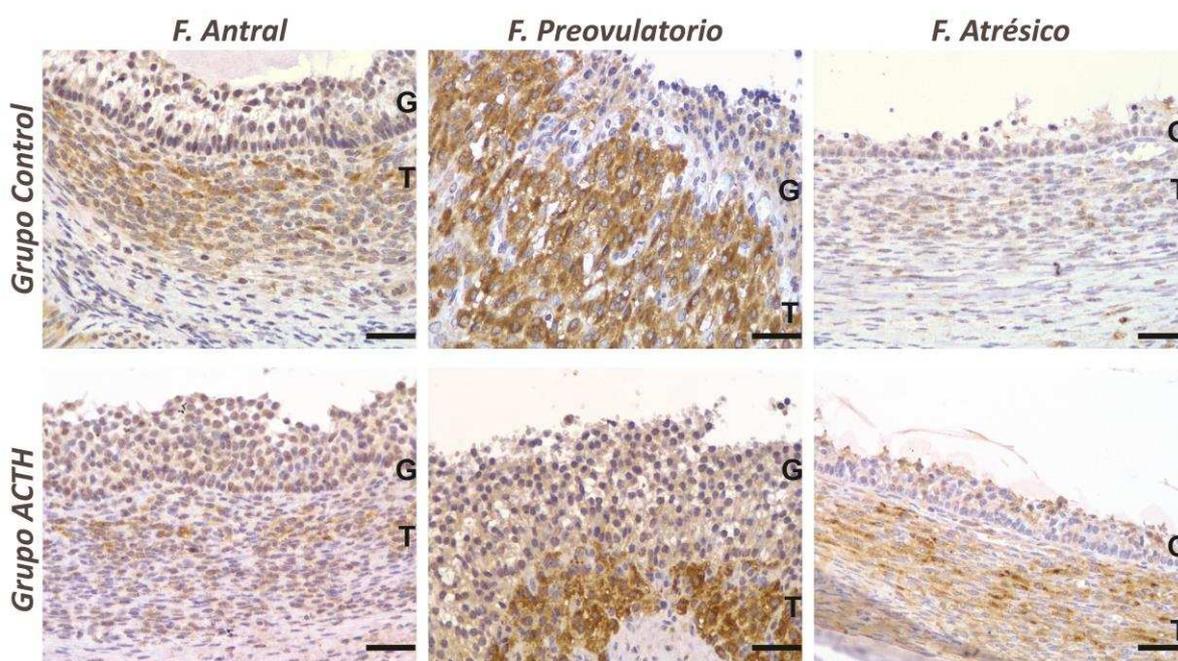
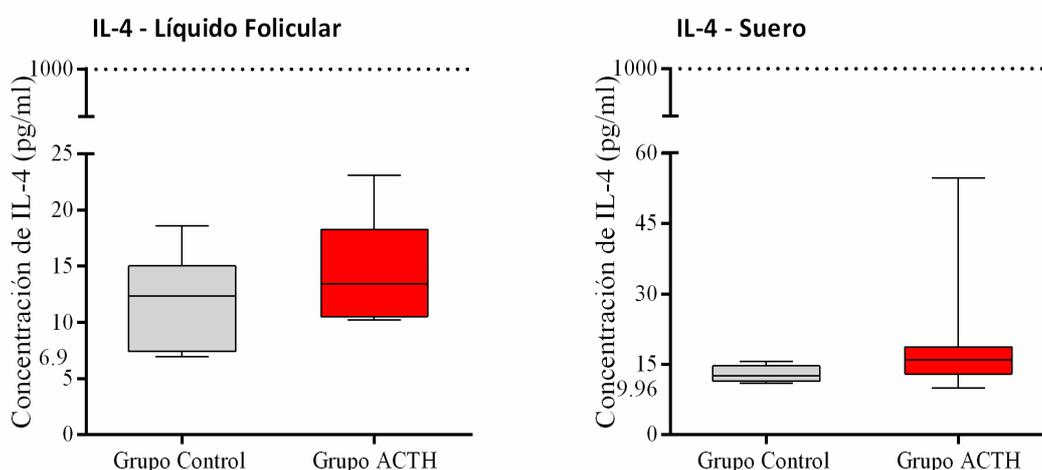


Figura 66. Diferentes estructuras foliculares grandes del ovario, inmunomarcadas para **TIMP2** en animales de los grupos control y tratados con ACTH. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: Teca interna

4.4. Evaluación de citoquinas en suero y LF proveniente de animales pertenecientes al modelo experimental de ACTH.

4.4.1. Concentración de IL-4 en líquido folicular y suero

Se evaluó la concentración de esta citoquina tanto en suero, como en el líquido folicular del folículo dominante de ambos grupos, en muestras provenientes de los animales de los grupos control y tratados con ACTH. Como se puede observar en la figura 67, no se hallaron diferencias en la concentración de IL-4 entre animales control y tratados con ACTH, tanto en suero como en líquido folicular ($p > 0,05$).



valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.4.2. Concentración de IL-1 β en líquido folicular y suero

Se evaluó la concentración folicular (en el folículo dominante de ambos grupos) y sérica de IL-1 β en muestras de los animales del grupo control y tratados con ACTH. Como se puede observar en la figura 68, no se hallaron diferencias en la concentración de IL-1 β entre los grupos evaluados, tanto en suero como en líquido folicular ($p > 0,05$).

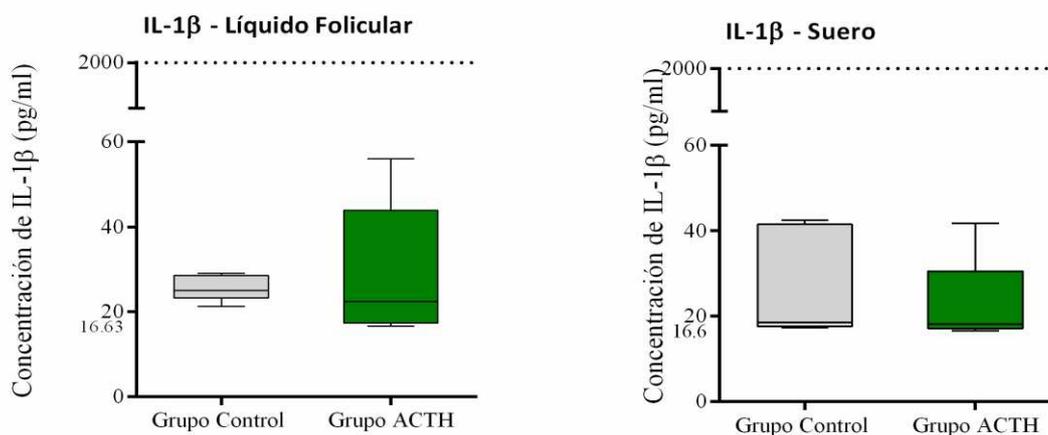


Figura 68. Concentración de **IL-1β** en líquido folicular y en suero de animales control y tratados con ACTH. Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.5. Evaluación de MMP2 y MMP9 en cultivos de pared folicular

Se realizaron cultivos de pared folicular completa de ovarios proveniente de frigorífico, obtenidos de folículos antrales, sometiendo a un grupo ($n=6$) a un estímulo con ACTH, y a otro grupo sin dicho estímulo ($n=6$), con la finalidad de evaluar la expresión génica de MMP2 y MMP9 *in vitro*.

4.5.1. Expresión génica de MMP2 en el modelo con ACTH *in vitro*

Para evaluar la expresión génica de MMP2, se determinó el rango lineal de trabajo mediante la construcción de una curva estándar con diluciones seriadas de tejido control (Pool de cultivos de pared folicular de ovarios obtenidos de frigorífico), con una eficiencia de 101% y un $R^2 = 0,993$. Todas las muestras evaluadas como así también las diluciones seriadas utilizadas en la construcción de la curva estándar fueron analizadas por duplicado.

Si bien se detectó expresión de ARNm que codifica para MMP2 en los cultivos de pared folicular *in vitro*, la expresión génica de esta proteína no presentó diferencias entre los cultivos de pared folicular basales y de los estimulados con ACTH ($p > 0,05$) (Figura 69).

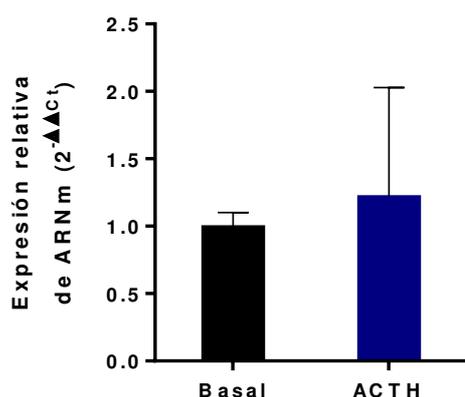


Figura 69. Expresión relativa de ARNm de **MMP2** determinado por PCR en tiempo real en células foliculares de cultivos celulares de pared completa de ovarios provenientes de frigorífico con estímulo de ACTH (Grupo ACTH: barra azul) y sin estímulo (Grupo Basal: barra negra). Los valores representan la media \pm DE. Sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.5.2. Expresión génica de MMP9 en el modelo con ACTH *in vitro*

Para evaluar la expresión génica de MMP9, se determinó el rango lineal de trabajo mediante la construcción de una curva estándar con diluciones seriadas de tejido control (Pool de cultivos de pared folicular de ovarios obtenidos de frigorífico), con una eficiencia de 97,6% y un $R^2 = 0,997$. Todas las muestras evaluadas como así también las diluciones seriadas utilizadas en la construcción de la curva estándar fueron analizadas por duplicado.

Para MMP9 no fue posible realizar la cuantificación de los niveles de expresión génica en cultivos de pared folicular estimulados con ACTH, ya que el 100% de las muestras expresaron dicho gen fuera del rango dinámico determinado por la curva estándar, con valores de Ct elevados.

5. *Discusión*

5.1. Modelo de inducción de estrés mediante administración de ACTH en el periodo preovulatorio y su relación con la enfermedad quística ovárica.

La patogenia de la COD es un proceso complejo, con un trastorno plurifuncional de la ovulación, que tiene como base la predisposición hereditaria sumada a causas ambientales y metabólicas. Debido a la gran cantidad de factores involucrados en la formación de quistes ováricos, la causa primaria de la enfermedad no ha sido claramente establecida aún. En el momento en que se realiza el diagnóstico (anatómica, histológica y/o clínicamente) se desconocen los procesos que condujeron a su formación y futura regresión-recambio de los quistes (Salveti y col., 2007). Los quistes foliculares han sido inducidos en bovinos por una variedad de tratamientos que han llevado al desarrollo de diversos modelos experimentales. Tales tratamientos incluyen la administración de estrógenos exógenos (Wiltbank, 1966; Nadaraja y Hansel, 1976; Carrie're y col., 1995), combinaciones de progesterona y estradiol (Erb y col., 1973; Winters y col., 1986; Cook y col., 1991; Hamilton y col., 1995), antisuero contra LH bovina (Nadaraja y Hansel, 1976), testosterona (Fathala y col., 1978) o ACTH exógena (Liptrap y Mc Nally, 1976; Refsal y col., 1987; Kawate y col., 1996, Amweg et al., 2013).

En base a estos conocimientos, ha sido claramente documentado que la mayor dificultad a la hora de estudiar la COD en bovinos es el desconocimiento de los estadios iniciales debido a que la formación de quistes sólo puede ser estudiada luego de que el folículo atravesó numerosos cambios morfológicos y fisiológicos desconocidos (Roth y col., 2012). Como se relató anteriormente, la ovulación semeja a un proceso inflamatorio focalizado (Espey, 1994; Bukovsky y Caudle, 2008), y los estresores pueden inhibir dicho proceso, llevando a una anovulación o retardo en los eventos fisiológicos normales. Es por ello que en esta tesis planteamos el desarrollo de un modelo experimental de inducción de estrés mediante la administración de ACTH previo al momento esperado para la ovulación, a modo de evaluar cambios incipientes que pueden estar implicados en la etiopatogenia de la enfermedad quística ovárica.

El modelo experimental utilizado, adaptado de uno desarrollado previamente por Biran y col. (2015), nos ha permitido realizar la evaluación hormonal completa así como también evaluar proteínas fundamentales en el proceso ovulatorio y determinar cambios en el ovario debidos al estrés. En el modelo utilizado encontramos un incremento en la

concentración sérica e intrafolicular del cortisol en los animales tratados con ACTH en relación a los controles, lo cual coincide con los hallazgos de Biran y col. (2015). Estudios previos realizados en bovinos han demostrado que el tratamiento con ACTH eleva los niveles séricos de P4 y cortisol durante el estro (Hein y Allrich, 1992). Esto coincide con trabajos realizados con vaquillonas (Ribadu y col., 2000) y cerdas (Brandt y col., 2009) en los cuales pudo determinarse que la administración de ACTH exógena durante el estro eleva la concentración del cortisol sérico. Por otro lado, la administración de ACTH durante la fase folicular del ciclo, en vacas no lactantes (Alam y col., 1986) o posparto (Gwazdauskas y col., 1972) reflejó un aumento de cortisol en respuesta al tratamiento. También se vieron aumentos de cortisol y P4 circulantes posteriores a la inyección de ACTH en vacas ovariectomizadas (Hein y Aldrich, 1992). En cabras tratadas con ACTH durante el proestro, se indujo persistencia de folículos más allá de los 10 días del momento esperado de ovulación con aumentos de P4 sérica y del cortisol luego de la inyección de ACTH, aunque reportan una rápida caída de los niveles de esta última hormona en el suero (Sato y col., 2011). Los glucocorticoides, como el cortisol, tienen una potente actividad antiinflamatoria e inmunosupresora. Su acción puede deberse a la modulación entre formas activas e inactivas de corticoesteroides, como ha sido descrito previamente (Thurston y col., 2007, Tetsuka y col., 2010), aunque hay evidencia de que esta hormona puede ser secretada en órganos extra-adrenales (Davies & MacKenzie 2003, Taves y col., 2011; Vukelic y col., 2011; Kostadinova y col., 2014). Clásicamente se ha descrito que los glucocorticoides son sintetizados exclusivamente en la glándula adrenal, en respuesta a la estimulación de la ACTH. Sin embargo, numerosos estudios han probado que estas hormonas pueden ser sintetizadas localmente en otros órganos y tejidos (Taves y col., 2011), incluyendo el ovario bovino (Amweg y col., 2017). En respuesta al estrés, la ACTH se une específicamente al receptor de melanocortinas 2 (MC2R). Los efectos de la ACTH son mediados a través de su unión al MC2R, lo que da lugar a la activación de la cascada de señalización interna que es esencial para la expresión de las enzimas esteroideogénicas y la producción de cortisol (Xing y col., 2010; Novoselova y col., 2013). El efecto intraovárico de la ACTH ha sido demostrado en peces, donde esta hormona suprime la producción de gonadotrofinas estimulada por estradiol en los folículos ováricos, y la expresión del MC2R demostrada en ovarios y testículos sugieren un rol para ACTH en la regulación de la función gonadal a través de los MCRs (Alsop y col., 2009). En concordancia con estos resultados, nuestro grupo de investigación ha demostrado en bovinos la expresión génica de los 5 tipos de receptores de melanocortinas

(MC1R al MC5R) en las células de la pared de folículos de diferentes tamaños. MC2R se encontró principalmente en las células de la teca de los folículos terciarios. Además, se observó expresión de este receptor en el CL bovino (Amweg y col., 2011). Los niveles elevados de cortisol en el grupo tratado con ACTH son coincidentes con los cambios hallados en otros modelos experimentales similares realizados en vaquillonas (Ribadu y col., 2000), en cerdas (Lang y col., 2004; Einarsson y col., 2007; Brandt y col., 2009), en vacas posparto (Gwazdauskas y col., 1972), en vacas no lactantes (Alam y col., 1986), en vacas ovariectomizadas (Hein y Aldrich, 1992) y en modelos de inducción de quistes con ACTH (Amweg y col., 2013) y de persistencia folicular (Díaz y col., 2015), así como también en los quistes foliculares de COD espontánea (Dobson y col., 2000; Sato y col., 2011). Diversos estudios demostraron que los tratamientos con cortisol por 7 días en ovinos, no bloquean la liberación de GnRH y por lo tanto no inhiben el pico de LH preovulatorio, pero si lo lograron cuando se realizaron infusiones de una combinación de cortisol y estrógenos (Daley y col., 1999). Por otra parte, estudios realizados en nuestro laboratorio han permitido demostrar que la administración de ACTH en cultivos de pared folicular estimuló la secreción de cortisol por parte de las células ováricas (Amweg y col., 2011). Estos resultados permiten reforzar la hipótesis que postula al ovario como una fuente extra-adrenal de glucocorticoides, mediante la estimulación de los receptores que son específicos para la ACTH (MC2R), presentes en la teca de los folículos antrales; y a la ACTH un metabolito necesario y fundamental en las alteraciones de las vías de síntesis de esteroides gonadales, implicadas en la patogenia de las enfermedades reproductivas.

En el modelo experimental que utilizamos, describimos que la concentración de P4 disminuyó en los folículos preovulatorios de animales tratados con ACTH en relación a los controles. Por otra parte se detectó un incremento en la concentración sérica de esta hormona, la cual alcanzó niveles subluteales al momento de la ovariectomía. Dobson y col. (2000) y Ribadu y col. (2000) describen valores similares de P4 sérica en vaquillonas tratadas con ACTH exógena durante el proestro. Estudios previos demostraron que, en respuesta a tratamientos con ACTH, en vacas ovariectomizadas, aumentan las concentraciones séricas de P4 circulante (Hein y Aldrich, 1992; Yoshida y Nakao 2005). Esto también fue observado en vacas secas al ser tratadas con ACTH durante la fase folicular del ciclo estral (Alam y col., 1986). Inyecciones de ACTH durante el estro en cabras, generaron valores subluteales de P4 sérica hacia el día 21 del ciclo estral (Sato y col., 2011). También ha sido documentado en modelos experimentales en cerdas tratadas con ACTH durante el proestro, patrones similares

con niveles subluteales de P4 circulante, (Lang y col., 2004; Einarsson y col., 2007; Brandt y col., 2009).

Existe una fuerte asociación entre las concentraciones séricas subluteales de P4 y la persistencia de folículos preovulatorios, lo que podría contribuir a una insensibilidad hipotalámica a los E2 y la consiguiente falla en la ovulación (Silvia y col., 2002; Hatler y col., 2003; Díaz y col., 2015). Como es sabido, la P4 actúa a nivel de los receptores de hormonas esteroideas existentes en las células ováricas (Curry y Smith, 2006). En vacas con ciclos estrales normales, las bajas concentraciones de P4 después de la luteólisis natural promueven el desarrollo de folículos dominantes, y las ondas foliculares adicionales son inhibidas (Sirois y Fortune, 1990). Hamilton y col. (1995) observaron que aquellas vacas que por alguna razón mantienen concentraciones de P4 con niveles cercanos a los de la fase lútea del ciclo estral, tienen ondas adicionales de crecimiento folicular, probablemente relacionado al hecho de que dichas concentraciones de P4 podrían inhibir la liberación de GnRH desde la hipófisis, modificando los niveles de FSH y aumentando la frecuencia de los pulsos de LH, pero no su amplitud (Sirois y Fortune, 1990, Kawate y col., 1996). En las células de la teca, los progestágenos, pregnenolona o progesterona, son los precursores para la síntesis de androstenediona. La unión de LH a sus receptores en las células de la teca estimula la actividad de la enzima CYP17A1, la cual convierte los progestágenos en andrógenos (Bao y col., 1997). La alta vascularización presente en la teca interna de los folículos antrales, permite una constante exposición a niveles elevados de colesterol-LDL sanguíneo por parte de las células de la teca interna que de este modo tienen disponible el sustrato para la síntesis de progestágenos y andrógenos en todas las etapas del desarrollo folicular. Posteriormente los andrógenos se metabolizan a estrógenos en las células de la granulosa por la CYP19A1 en folículos preovulatorios (Fortune y Quirk, 1988; Bao y Garverick, 1998). En la vía esteroideogénica de la corteza adrenal, la CYP17A1 es una enzima reguladora crucial. Su estimulación mediante ACTH en cultivos de células adrenocorticales bovinas provoca un aumento en la concentración de esta enzima. Las alteraciones en los niveles de CYP17A1 resultan en cambios pronunciados del patrón de producción de esteroides derivados de dicha enzima, como pueden ser el cortisol o la 17 α -hidroxi-progesterona (Zuber y col., 1986). Por ello es que se podría hipotetizar que el tratamiento con ACTH durante el proestro bovino, podría participar en el incremento de los niveles séricos de P4. Los niveles bajos en el líquido folicular refuerzan la teoría del origen extraovárico de la P4, probablemente debido a la producción aumentada en la corteza adrenal.

En otros estudios, la administración de manera continua de dosis bajas de P4 llevó a concentraciones subluteales de esta hormona en sangre, que fueron efectivas para suprimir la aparición del pico preovulatorio de LH y por ende la ovulación en vacas lecheras (Kindahl y col., 1979; Roche y Ireland, 1981; Kesner y col., 1982; Lee y col., 1988; Lucy y col., 1990; Sirois y Fortune, 1990; Adams y col., 1992; Savio y col., 1993; Stock y Fortune, 1993; Noble y col., 2000; Hatler y col., 2008; Díaz y col., 2015).

Los animales con COD usualmente presentan alteraciones en la expresión del receptor de P4, que sumado a los niveles subluteales de P4, puede inducir cambios en los mecanismos de proliferación/apoptosis en las células foliculares (Salveti y col., 2010). Recientemente hemos descrito similitudes en el desbalance entre la relación proliferación/apoptosis entre COD espontánea y folículos con más de 10 días de persistencia en el ovario, donde se observó un incremento en los mecanismos de supervivencia de las células foliculares y una disminución en la proliferación celular. Estos cambios podrían deberse a los cambios hormonales endocrinos y paracrinos que se describe para COD y para los folículos persistentes, en los estadios tardíos de los mismos (Belotti y col., 2017).

No se encontraron diferencias en la concentración de E2 entre los dos grupos experimentales, tanto en líquido folicular de los folículos preovulatorios como en suero. Hein y Allrich (1992) determinaron que en bovinos, la administración de ACTH en el comienzo del estro no modificó los valores de E2 sérico, sin embargo, detectaron un aumento en su concentración hacia el final del estro, tanto en animales controles, como en tratados. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo, donde se detectó una mayor concentración de E2 en el día 18 del ensayo (momento previo a la ovulación), en ambos grupos. Estos resultados son similares a los encontrados en cerdas inyectadas con ACTH durante el estro por Lang y col. (2004). La concentración de E2 en el proestro en los animales del ensayo fue consistente con los hallazgos de otros estudios de nuestro grupo en modelos de inducción de quistes mediante ACTH y de persistencia de folículos mediante P4, durante el proestro y estro (Amweg y col., 2013; Díaz y col., 2015).

La concentración de testosterona sérica mostró una disminución en el grupo de animales tratados con ACTH en relación al grupo control, sin diferencias en el líquido folicular entre grupos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Biran y col. (2015) quienes midieron los valores de androestendiona (precursor de la testosterona). Sin embargo, estos autores sólo realizaron mediciones en líquido folicular, sin reportar datos sobre las concentraciones séricas. Ha sido previamente descrito que la testosterona se encuentra

aumentada en los folículos persistentes en sus estadios más tardíos (más de 10 días de persistencia en el ovario) y quistes de animales con COD, probablemente debido a los cambios morfofuncionales que ocurren en las células de la teca y la granulosa de dichas estructuras foliculares, pero al analizar los datos de esos estudios al momento esperado de la ovulación (a excepción de COD, donde no se puede obtener este dato), tanto la testosterona como los estrógenos séricos no presentaban diferencias entre grupos (Dobson y Smith, 1995; Amweg y col., 2013; Díaz y col., 2015).

5.2. MMP2 y MMP9 en el Modelo Experimental de inducción de estrés mediante ACTH y COD.

El crecimiento dinámico y extenso del folículo dominante o preovulatorio, y la posterior liberación del ovocito, ocurren luego de una remodelación concomitante de la membrana basal de las células de la granulosa (Bjersing y col., 1974; Espey y col., 1994) y la fragmentación de la MEC que rodea el folículo (Morales y col., 1983; Curry y col., 2001). En el ovario, se ha postulado que MMPs y TIMPs desempeñan un papel crítico en los cambios que se producen en la MEC durante el desarrollo folicular (García y col., 1997; McCaffery y col., 2000) tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Vu y Werb, 2000; Coussens y col., 2002; Curry y Osteen, 2003; Stillely y Sharpe-Timms, 2012). Es por esto que una alteración de los mecanismos involucrados en la reparación/degradación de la MEC por parte del sistema MMP/TIMP podría derivar en la dificultad de los folículos para la liberación del ovocito y como consecuencia ser parte de la etiopatogenia de la COD en bovinos. En el presente trabajo se evaluó la expresión y localización de diferentes MMPs y TIMPs, como así también los niveles de expresión de ARNm y actividad gelatinolítica de MMP2 y MMP9, en el modelo experimental de inducción de estrés mediante administración de ACTH y en animales con COD espontánea, con el fin de comprender su participación en la enfermedad ovárica.

Hemos descripto variaciones en la expresión génica y proteica, así como en la actividad enzimática de las gelatinasas, entre los diferentes grupos estudiados, permitiendo relacionar estas alteraciones con los cambios que se producen en el ovario. Numerosos trabajos han enfocado sus estudios en la expresión y comportamiento de las MMPs y TIMPs en los folículos dominantes, cuerpos lúteos y/o en quistes, de diferentes especies (Curry y col., 2001; Curry and Osteen, 2001; Imai y col., 2002; Khandoker y col., 2002; Curry and

Osteen 2003; Li y col., 2004; Mutlag y col. 2014; Li y Shen 2015). Sin embargo, esta tesis es la primera ocasión en que se evalúan estas metaloproteinasas e inhibidores a lo largo de la folículoogénesis, en el ovario bovino.

MMP2 y MMP9 son las gelatinasas que están involucradas en la ruptura del colágeno tipo IV (el mayor constituyente de las membranas basales). Se cree que en el ovario de los mamíferos, los mayores productores de MMPs y TIMPs son las células de la granulosa y de la teca (Smith y col., 1994; Zhao y Luck, 1996). En el presente estudio pudimos localizar la MMP2 en el citosol de las células de la granulosa y teca interna de los folículos ováricos. Además pudo detectarse marcación en algunos núcleos de células de ambas poblaciones celulares. Estos hallazgos coinciden con reportes previos que han demostrado la presencia de estas proteasas en células de la granulosa y de la teca de folículos ováricos de ratas (Curry y col., 2001) y en los núcleos de células endoteliales y neuronales de humanos (Sinha y col., 2014). En este sentido, si bien no han sido completamente dilucidados cuáles son los sustratos, la función y los mecanismos de regulación de MMP2 en el núcleo, existe suficiente evidencia sobre la expresión de esta metaloproteasa en dicho compartimento y la posibilidad de que sea activa (Sinha y col., 2014). En este trabajo sólo hemos evaluado la expresión de MMP2 en el citosol y su actividad en líquido folicular, ya que son sus funciones en relación a la remodelación de la matriz extracelular las de interés a los objetivos de la presente tesis.

Es conocido que las células de la granulosa y teca interna de los bovinos producen MMPs con actividad gelatinolítica *in vitro* (Smith y col., 2005; Portela y col., 2009). La expresión génica de ARNm para MMP2 en cultivos de pared de folículos antrales grandes de ovarios bovinos, realizado durante esta tesis, no mostró diferencias entre los cultivos sin estimulación y los estimulados con ACTH. Como se ha demostrado previamente, las células de la pared folicular de los bovinos tienen capacidad de secretar hormonas esteroideas, como el cortisol (Amweg y col., 2011), y también P4, E2 y testosterona, al ser estimuladas mediante ACTH en ensayos *in vitro* (Amweg y col., 2013). Smith y col. (2005), comprobaron que en respuesta a LH, los cultivos de células de pared folicular de bovinos, presentan mayor expresión génica para MMP2 y actividad gelatinolítica aumentada. En el modelo experimental utilizado pudo determinarse una mayor expresión proteica de MMP2 en las células de la granulosa y teca interna de los folículos antrales del grupo tratado con ACTH, sin diferencias entre grupos para la categoría de folículos preovulatorios y sin diferencias para la MMP9. Adicionalmente, se encontró una mayor actividad de MMP2 en el LF de folículos preovulatorios en los animales expuestos a ACTH en relación al grupo control, no

detectándose en cambio actividad de MMP9 en ninguno de los grupos. La actividad gelatinasa de MMP2 ha sido detectada previamente en cultivos de células de la teca y de la granulosa de bovinos (Smith y col., 2005). Trabajos previos también han puesto de manifiesto que la actividad de MMP2 aumenta en el LF de folículos preovulatorios de vacas cuando estas estructuras alcanzan el máximo tamaño antes de la ovulación (Imai y col., 2003). Lo mismo fue reportado en ovejas, donde la actividad gelatinolítica de MMP2 se vio aumentada en LF de folículos preovulatorios en momentos previos a la ovulación (Gottsch y col., 2000; Driancourt y col., 1999; Curry y Osteen, 2003). Ha sido descrito que los niveles intrafoliculares de MMP2 y MMP9 aumentan durante la atresia en ovejas (Huet y col., 1998). Un alto grado de atresia folicular usualmente se acompaña de altos niveles de MMP2 y 9 en células ováricas de mujeres (Shalev y col., 2001; Ben-Shlomo y col., 2003). Khandoker y col. (2001) demostraron que los folículos atrésicos bovinos contienen una elevada actividad de MMP2 y MMP9 en el LF. Imai y col. (2003), ponen en hipótesis la participación de MMP2 y MMP9 en la génesis y progresión de la atresia y degeneración folicular.

Numerosos autores han demostrado la expresión génica y proteica de MMP9 en el ovario de diversas especies incluyendo humanos (Lind y col., 2006), ratones (Inderdeo y col., 1996), cobayos (Li y Shen., 2015), ratas (Cooke y col., 1999), cabras (García y col., 1997), ovejas (Murdoch y col., 1986) y vacas (Zaho y Luck, 1996; Smith y col., 2005; Portela y col., 2009). En la presente tesis, la expresión génica de los cultivos de pared folicular estimulada con ACTH no fue factible de ser evaluada, posiblemente debido a la categoría folicular utilizada, ya que otros autores describen expresión de ARNm para MMP9 en folículos antrales de 2 a 5 mm de diámetro (Portela y col., 2009) y en folículos atrésicos de 2 a 6 mm (Khandoker y col., 2001) en bovinos, y en el desarrollo de CL inmediatamente después de la ovulación (Kliem y col., 2007). Por otro lado, es importante destacar que es posible que el tiempo transcurrido luego del estímulo con ACTH fuera insuficiente, impidiendo cuantificar cambios en la expresión génica de las gelatinasas.

La síntesis de MMPs es regulada primariamente a nivel transcripcional, por numerosos factores estimulantes y supresores, a través de múltiples vías de señalización. Además del estrés celular, los cambios en la forma y en las proteasas propiamente dichas, existen múltiples factores reguladores de dicha síntesis, que incluyen: ésteres de forbol, señales derivadas de integrinas, citoquinas y factores de crecimiento como las interleuquinas, interferón, EGF, VEGF, TNF α , TGF β y un inductor extracelular de las MMPs (Goldman y Shalev 2004). La regulación postranscripcional también fue documentada (Sternlicht y Werb,

2001; Goldman y Shalev 2004). Las citoquinas, los factores de crecimiento y hormonas pueden modular la estabilidad de los transcritos de ARNm (Sternlicht y Werb, 2001; Goldman y Shalev 2004). En ratas, la expresión de ARNm de MMP2 es estimulada por LH, mientras que la expresión de MMP9 no se modifica a lo largo del periodo periovulatorio (Curry y col., 2000). Parecen existir ciertas diferencias entre roedores, ya que en el ovario de ratón, para la MMP9 el incremento de ARNm es estimulado por LH, mientras que MMP2 no se modifica (Huglund y col., 1999; Robker y col., 2000b).

La delección del gen para MMP9 en ratas y ratones demostró que esta enzima no tiene un rol esencial en la ovulación en estas especies, indicando que la ausencia de efecto se puede explicar por la redundancia en el sistema de las MMPs, pudiendo las otras enzimas involucradas compensar la falta de MMP9 (Brännström y col., 2010). Rispoli y col (2013) determinaron que la exposición de células del cúmulo ovígeno y de ovocitos bovinos a estrés calórico *in vitro*, provocó una disminución en la expresión y actividad de MMP9 (Rispoli y col., 2013).

En los animales evaluados en el modelo experimental de inducción de estrés mediante ACTH no se encontraron diferencias en la expresión proteica de MMP9 entre los folículos de diferentes categorías de ambos grupos (controles y tratados). Cabe destacar que la mayor información sobre actividad y expresión de MMP9 en otras especies está descripta en la formación del cuerpo lúteo temprano, post-ovulación, en peces (Thome y col, 2010), ratas (Curry y col., 2001; Nothnick y col., 1996), cerdos (Ribeiro y col., 2006), vacas (Goldberg y col., 1996; Imai y col., 2003), caballos (Riley y col., 2001), monos (Chaffin y Stouffer., 1991) y humanos (Duncan y col., 1998; Oksjoki y col., 2004). No se pudo determinar la actividad de MMP9 en el líquido folicular de los animales tratados con ACTH, lo que puede deberse a que la mayor actividad enzimática para esta gelatinasa en bovinos se ha detectado en LF de folículos antrales pequeños o de folículos quísticos (Imai col., 2003), así como también en LF de folículos atrésicos de bovinos (Khandoker y col., 2001; Portela y col., 2009), de ovinos (Huet y col., 1998), de cobayos (Li y Shen, 2015), de pollos (Zhu y col., 2014), de primates y de roedores (Curry y Osteen, 2003).

El cortisol suprime la expresión y actividad de gelatinasa de MMP9 secretada por un estímulo de IL-1 α , en células de la superficie del ovario de humanos, cultivadas *in vitro*, mediante su unión al receptor de glucocorticoides (Rae y col., 2009). La IL-1 aumenta el potencial de generación local de cortisol a través de la regulación de 11 β HSD1 en células de la superficie del ovario de mujeres (Yong y col., 2002) lo que sugiere un mecanismo para

localizar y limitar el daño proteolítico a la superficie ovárica durante la ovulación (Rae y col., 2009). Como hemos mencionado, en nuestro grupo de estudio, recientemente se determinó la presencia de receptores de glucocorticoides en las células de pared folicular de bovinos, así como la hipótesis de que el ovario podría producir cortisol *de novo* (Amweg y col, 2013; 2016 y 2017). Estos resultados nos permiten suponer que los elevados niveles de cortisol encontrados principalmente en el LF de los animales tratados con ACTH, podrían alterar el mecanismo de expresión y de activación de MMP9 en el período preovulatorio.

En cuanto a la expresión génica de MMP2, Mutlag y col. (2015) reportaron que los niveles de ARNm son menores en vacas infértiles con quistes en comparación con vacas fértiles, sugiriendo que la expresión génica anormal podría ser un importante marcador de quistes foliculares ováricos en vacas lecheras (Mutlag y col., 2015). Estos resultados coinciden con los hallazgos del presente estudio en donde se determinó que la expresión relativa de ARNm de MMP2 fue significativamente menor en los folículos quísticos que en los folículos antrales de animales controles.

En cuanto al análisis de estas gelatinasas en quistes ováricos, Mutlag y col. (2015) evaluaron la expresión proteica de MMP2 en muestras de ovarios de vacas obtenidas de frigorífico y encontraron una intensa inmunomarcación de MMP2 en células de la granulosa y teca interna de folículos antrales. Por otro lado, observaron una inmunomarcación débil de dicha proteína en folículos ováricos provenientes de vacas infértiles que presentaban quistes. En contraposición con sus hallazgos, en este trabajo encontramos que la inmunomarcación de MMP2 fue similar entre folículos antrales de vacas controles y quistes foliculares de vacas con COD espontánea, tanto en células de la granulosa como de la teca. Estas discrepancias pueden ser debidas a diferencias metodológicas en la cuantificación de la inmunomarcación.

Hemos detectado un aumento significativo de la actividad de MMP2 en LF de folículos quísticos en relación a la detectada en folículos preovulatorios de animales controles. Muchos autores han sugerido un papel importante de las MMPs en el crecimiento y desarrollo de los folículos de la especie bovina. En efecto, la actividad gelatinasa detectada en LF para la pro-MMP2 y MMP2 ha sido propuesta como posible marcador de folículos saludables, aún en procesos de atresia y regresión normal (Curry y Osteen, 2003; Imai y col., 2003).

Los niveles proteicos de MMP9 en animales con COD fueron evaluados en células de la granulosa y teca de folículos antrales controles y quísticos, y no se hallaron diferencias significativas en ninguna de las poblaciones celulares estudiadas. Como se mencionó anteriormente, respecto a la actividad de MMP9 en LF de bovinos, algunos autores han

reportado su actividad y expresión sólo en folículos en crecimiento. En LF de estructuras quísticas de diámetro mayor a 25 mm la actividad de MMP9 estuvo significativamente aumentada en relación a folículos de menor tamaño, sugiriendo un rol de esta metaloproteasa en la formación de los quistes (Imai y col., 2003). Recientemente, Ranjbaran y col., (2016) demostraron que la actividad de MMP9 en LF de mujeres con síndrome de ovario poliquístico (PCOS, de las siglas en inglés *Policystic ovary síndrome*) fue mayor en comparación a lo hallado en mujeres sanas, lo que refuerza la teoría anterior. Asimismo, encontramos una notable actividad gelatinolítica en LF de quistes, lo que sugiere un posible rol en el mantenimiento de la estructura anovulatoria. Dicho incremento de la actividad enzimática de MMP9 incluso podría deberse a la baja concentración de los inhibidores disponibles en LF para regularla. Otros estudios realizados en bovinos han demostrado que las actividades enzimáticas de MMP2 y MMP9 y los niveles de ARNm son significativamente superiores en folículos atrésicos en relación a aquellos encontrados en folículos en desarrollo (Khandoker y col., 2001). Células de la granulosa de bovinos cultivadas bajo la influencia de FSH o IGF1, como estimulantes del desarrollo folicular, mostraron menores niveles de expresión de MMP9, por lo que los autores postularon que su participación no sería relevante en el desarrollo folicular normal (Portela y col., 2009). Estos hallazgos, junto con nuestros resultados destacan una posible asociación entre las condiciones de desarrollo anormal de los folículos quísticos y el aumento de la actividad gelatinasa de las MMPs en vacas con COD. Sin embargo, varios factores intra y extraováricos, además de las MMPs y TIMPs, juegan un rol importante en la regulación de la foliculogénesis, por lo que el rol preciso de MMP2 y MMP9 en el desarrollo de quistes foliculares requiere mayores verificaciones.

5.3. MMP14 y TIMPs en el Modelo Experimental de inducción de estrés mediante ACTH y COD.

Las gelatinasas que resisten a la activación por proteínas séricas (MMP2, por ejemplo), son activadas por un mecanismo que envuelve a inhibidores tisulares (TIMP2) y una proteína de transmembrana (MT-MMP), la MMP14, quien hace las veces de reguladora (Stronging y col., 1995). La expresión de ARNm de MMP14 se describió en células de la teca y estroma adyacente de bovinos, y posteriormente a un estímulo con hCG en granulosa (Bakke y col., 2002). En tumores de humanos, se ha descrito que la unión de MMP2 y MMP14 desencadena mecanismos para la neovascularización (Nagase y Woessner., 1999).

En ratas y ratones su expresión también se localizó en ambas capas de la pared folicular, pero con una disminución en las células de la granulosa y un aumento en células de la teca, posteriormente a inyecciones de hCG (Liu y col., 1998; Hagglund y col., 1999). Esta proteína de membrana se expresó en todas las categorías de folículos estudiados, sin embargo no se observaron diferencias entre las células foliculares del grupo control y las del grupo tratado con ACTH. La expresión proteica de MMP14 fue descrita en folículos preovulatorios de bovinos (Liu y col., 1998; Bakke y col., 2002), y en otras especies, como ratas, ratones, humanos y monos (Puttabyatappa y col., 2014). TIMP2 tiene la capacidad de unirse a MMP2 para inhibir su actividad gelatinolítica (Goldber y col., 1989; Olson y col., 1997; Zhang y col., 2003). Paradójicamente, una de las maneras de activar a MMP2 es a través de la unión de un dominio C-terminal de TIMP2 que se une a la pro-MMP2, formando un complejo no-inhibitorio “pro-MMP2:TIMP2”. Este complejo es reconocido y ligado por el dominio extracelular de MMP14. Este triple complejo se ubica en la superficie celular, actuando de esta manera para regular o activar MMP2 (Strongin y col., 1995; Zhang y col., 2003). Se ha demostrado que la actividad de TIMP2 aumenta en respuesta a la oleada de gonadotrofinas, apoyando la hipótesis de que su expresión puede ayudar a regular la reestructuración de la MEC en el ovario, la ruptura del folículo y la transición a cuerpo lúteo y su función (Goldman y Shalev, 2004). En los animales tratados con ACTH, la expresión proteica de TIMP2 fue similar con la del grupo control, y para ambos grupos la mayor expresión de este inhibidor se observó en los folículos preovulatorios. TIMP2 es una proteína que regula la actividad de MMP2 a través de la formación de un complejo con la proMMP2 permitiendo su unión a MMP14, clivando el propéptido y activando la enzima. Es por esto que una disminución o exceso de TIMP2 implicaría un desbalance en dicho sistema, imposibilitando la activación de MMP2 (Curry y Osteen, 2003). Este proceso ocurre porque los niveles bajos de TIMP2 aumentan la formación del complejo trimolecular (es decir, MMP14 /TIMP2 / pro-MMP2) que resulta en la activación de MMP2, mientras que altas concentraciones de TIMP2 se unen a todos los MMP14, de modo que no haya MMP14 libre disponible para activar MMP2 (Strongin y col., 1995). Si bien en la presente tesis no encontramos variaciones en la expresión de MMP14 o TIMP2 entre grupos, sí pudo detectarse una mayor expresión de MMP2 en la granulosa de los folículos antrales y en la teca de los folículos antrales y atrésicos de los animales tratados con ACTH. Es probable que a niveles similares de TIMP2 y MMP14, una mayor expresión de pro-MMP2 explique en parte la mayor actividad observada en el LF de los animales del grupo ACTH.

En cuanto a la expresión proteica de TIMP1, los trabajos de Peng y col. (2015) en cabras revelaron una mayor inmunomarcación del inhibidor en células de la teca y de la granulosa de folículos antrales grandes y cuerpos lúteos. En nuestro modelo experimental no vimos diferencias entre los grupos estudiados ni entre las categorías foliculares evaluadas. Después del pico preovulatorio de gonadotrofinas en ovejas, la expresión del ARNm que codifica para TIMP1 (Smith y col., 1994) aumenta aproximadamente diez veces y la inmunomarcación de TIMP1 es localizada principalmente en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios (McIntush y col., 1996). Los niveles de TIMP1 aumentaron en mujeres sometidas a técnicas de reproducción asistida en comparación con mujeres sin estímulo hormonal, mientras que TIMP2 no se modificó y no hubo relación entre los niveles foliculares de E2 y la relación MMP / TIMP (Curry y Osteen, 2006). Se ha descrito que en células de la corteza adrenal tanto bovina como de rata, la ACTH induce la expresión de ARNm de TIMP1 en unas horas, con un curso de tiempo que es paralelo a la inducción de enzimas del sistema P450 esteroideogénicas y mitocondriales (Hanukoglu y col., 1990; Raikhinshstein y Hanukoglu, 1994).

Estudios recientes llevados a cabo en cabras han demostrado que la expresión de ARNm de TIMP1 en células de la teca y de la granulosa aumentan, coincidentemente con el aumento de tamaño folicular (Peng y col., 2015). En bovinos se ha observado un aumento de la expresión de ARNm de TIMP1 en folículos preovulatorios luego del estímulo con LH/hCG (Smith y col., 1996; Curry y Osteen, 2003), lo que concuerda con los resultados obtenidos en otras especies como ratas, ratones y ovejas (Bake y col., 2002). Nuestros resultados en la evaluación de COD espontánea mostraron que la expresión de ARNm de TIMP1 fue mayor en folículos preovulatorios controles que en los quistes foliculares provenientes de vacas con COD espontánea. Sin embargo, no se han encontrado diferencias en la expresión proteica para TIMP1 en los folículos analizados en ambos grupos. En torno al período periovulatorio, Zhang y col. (2003) han mostrado que la expresión de ARNm de TIMP1 aumenta durante la fase lútea temprana y disminuye a partir de la segunda mitad de la fase tardía, en cuerpo lúteo de vacas cíclicas. Recientemente, Schmidt y col. (2014) encontraron una menor expresión de ARNm de TIMP1 en el estroma ovárico de mujeres con síndrome de ovario poliquístico, lo cual concuerda con los niveles encontrados en vacas con COD en el presente trabajo.

La expresión proteica de TIMP1, indica funciones que están relacionadas con la actividad de las gelatinasas (Curry y Osteen 2003), destacándose la regulación de la esteroideogénesis, donde se ha visto que en ratas estimula la producción de P4 en las células

de la granulosa (Boujard y col., 1995). TIMP1 es considerado un factor clave en la proliferación, neovascularización o esteroideogénesis luego de la ruptura del folículo preovulatorio, para formar el CL, por lo que su aumento es posterior al pico preovulatorio de LH (Curry y Osteen 2003). En humanos, se comprobó que la estimulación de fibroblastos gingivales con hidrocortisona, elevó los niveles de expresión de ARNm para TIMP1.

El trabajo realizado aquí es la primera descripción del patrón de expresión y localización de TIMP2 en folículos ováricos de vacas con COD espontánea. Nuestros resultados muestran que la expresión de TIMP2 en vacas con COD se encuentra significativamente disminuida en comparación al grupo control, tanto en células de la granulosa como de la teca. TIMP2 ha sido caracterizado como un factor importante de remodelación durante el período periovulatorio y la fase lútea en vacas (Smith y col., 1996). En los animales con COD, los niveles de TIMP2 estuvieron estrechamente relacionados con los cambios en la expresión de MMP2, ya que en las estructuras quísticas, la escasez de este inhibidor podría estar relacionada con la marcada actividad gelatinolítica detectada en el LF de dichas estructuras, tal como ha sido reportado para humanos por otros autores (Lind y col., 2006, Baka y col., 2010).

Ha sido reportado por diversos autores que los miembros del sistema IL-1 se expresan en el ovario de muchas especies incluyendo humanos (Carlberg y col., 2000; Zolti y col., 1991; Barak y col., 1992; De Los Santos y col., 1998; Brännström y col., 1994; Hurwitz y col., 1992), ratones (Simón y col., 1994; Terranova y Rice, 1997), ratas (Hurwitz y col., 1991; Scherzer y col., 1996; Wang y col., 1997; Kol y col., 1999), equinos (Martoriati y col., 2002; Martoriati y Gérard, 2003) y bovinos (Passos y col., 2016). La IL-1 controla la transición de las células foliculares facilitando su proliferación y diferenciación (Brännström y col., 2004), mientras que es capaz de modular la esteroidogénesis y promover la proliferación de células de la granulosa en porcinos (Fukuoka y col., 1989), bovinos (Spizer y Alpizar, 1994), ratas (Wang y col., 1997) y humanos (Salamonsen y col., 2007; Trundley y Moffett, 2004; Best y Hill, 1995). Durante la foliculogénesis, la IL-1 promueve la proliferación y suprime la diferenciación, mientras que durante el proceso ovulatorio aumenta la producción local de eicosanoides, esteroides, metaloproteasas y sustancias vasoactivas para promover la ovulación (Brännström, 2004). IL-1 β modula la producción total de prostaglandina E por las células de la granulosa, proporcionando así un mecanismo para determinar el sitio de la ruptura del folículo (Hurwitz y col., 1995a, b, 1997, Duffy and Stouffer, 2002; Gaytan y col., 2002; Field

y col., 2014). El soporte para el concepto de que las interleucinas pueden regular el sistema de MMP ovárico se desprende de estudios que demuestran que IL-1 estimula la actividad de MMP9 en roedores (Brannstrom y col., 1995; Murdoch, 1999; Goldman y Shalev, 2004). Un factor clave en la regulación de las gelatinasas dentro del ovario de ratas puede ser la citoquina IL-1, ya que la secreción inducida de MMP9 depende de la dosis de IL-1 β en cultivos de disgregados de ovarios completos (Hurwitz y col., 1993; Brännström y col., 2010). La capacidad de IL-1 para aumentar significativamente la acumulación de una gelatinasa de 92 kDa en cultivos celulares de disgregados de ovarios completos de ratas, sugiere un papel de esta citoquina en potenciar la degradación de la matriz, especialmente la del colágeno tipo IV y colágeno V durante, o inmediatamente después de la ovulación, cuando IL-1 se expresa mayoritariamente (Hurwitz y col., 1993). En la presente tesis no se encontraron diferencias en la concentración de IL-1 β en LF y suero de los animales del modelo experimental, lo que podría indicar que su intervención en el complejo proceso ovulatorio podría estar regulada por otras proteínas del sistema IL-1.

Las citoquinas proinflamatorias IL-1 y TNF α , son los principales estímulos para la producción de quimioquinas, pero también interferón- γ (IFN γ) e IL-4 sinergizan con IL-1 y TNF α para estimular la secreción de quimiocinas (Luster, 1998). Niu y col. (2017), no encontraron diferencias significativas en las concentraciones de IL-1 β e IL-4 entre los grupos control y PCOS. Pero por otro lado, Rashid y col. (2017) demostraron que mujeres con PCOS tiene menor concentración sérica de IL-1 β . Gaafar y col. (2014) evaluaron citoquinas (Interferón γ , TNF, IL-4 e IL-2) en LF de mujeres con PCOS y determinaron que la IL-4 no presenta asociación con la enfermedad. Cabe destacar que los resultados observados en el modelo experimental son similares a los descritos en COD espontánea, donde se analizaron las concentraciones de diferentes interleucinas (IL-1 β , IL-4 e IL-16) en el LF y suero de animales con COD y en un modelo experimental de persistencia de folículos, donde no observaron diferencias en IL-1 β e IL-4 (Stassi y col., 2015), tanto en LF como en el suero.

Consideraciones parciales

El estrés ha sido postulado como uno de los factores predisponentes más importantes en la patogenia de COD (Vanholder y col., 2006, Amweg y col., 2016). Los glucocorticoides son hormonas esteroideas inducidas por el estrés y agentes antiinflamatorios que modulan la producción de citoquinas y prostaglandinas en diferentes procesos reproductivos: ovulación,

luteólisis, implantación de embriones, crecimiento fetal y desarrollo placentario (Andersen y col., 2002; Myers y col., 2007, Tetsuka y col., 2010; Majewska y col., 2012; Kuse y col. 2013; Amweg y col., 2016). Sin embargo, situaciones extremas podrían afectar el mecanismo ovulatorio normal, alterando el ciclo estral y bloqueando la ovulación (Amweg y col., 2017).

Cuando se habla de quistes ováricos o falla en la ovulación, ha sido propuesto que el defecto primario reside en el hipotálamo, el cual no libera adecuadamente el pico de GnRH en respuesta al estímulo de E2 y que esta insensibilidad hipotalámica puede estar dada por concentraciones intermedias de P4 circulantes (Silvia y col., 2002; Vanholder y col., 2006). En este sentido, las concentraciones periféricas de P4 en vacas con quistes foliculares aparecen frecuentemente en un rango intermedio (0,1–1,0 ng/ml) al momento de su detección (Carroll y col., 1990; Hamilton y col., 1995; Yoshioka y col., 1996; Calder y col., 1999; Hatler y col., 2003), cuya concentración es efectiva para suprimir la aparición del pico preovulatorio de LH y por ende la ovulación en vacas lecheras (Kindahl y col., 1979; Roche y Ireland, 1981; Kesner y col., 1982; Lee y col., 1988; Lucy y col., 1990; Sirois y Fortune, 1990; Adams y col., 1992; Savio y col., 1993; Stock y Fortune, 1993; Noble y col., 2000; Hatler y col., 2008; Díaz y col.; 2015). Los ovarios con quistes están expuestos a una alta concentración local de cortisol y tienen la capacidad de aumentar aún más estas concentraciones en respuesta a un estímulo específico. Estudios previos han demostrado que el ovario es capaz de producir GC *de novo* y ha sido sugerido que existe un mecanismo que regula la concentración intrafolicular del cortisol y una acción directa de la ACTH sobre los folículos ováricos (Amweg y col., 2013; Amweg y col., 2016; Amweg y col., 2017).

Los resultados de esta tesis muestran cambios hormonales en los animales tratados con ACTH durante el estímulo a nivel sistémico y en el líquido folicular de los folículos preovulatorios dominantes. El modelo utilizado permitió establecer una buena herramienta para evaluar cambios incipientes que puedan dar lugar, a la formación de quistes foliculares, o a fallas en la ovulación. Considerando los cambios descritos, se estudiaron y se encontraron alteraciones de un grupo de proteínas y enzimas relacionadas al proceso inflamatorio focalizado de la ovulación (Espey, 1980). Se sabe que las metaloproteasas ejercen sus funciones a través de mecanismos de activación asociados a las hormonas reproductivas al momento de la ovulación, sobre todo relacionadas a una cascada de eventos que se desencadenan con el pico de LH, entre ellos: secreción de prostaglandinas, citoquinas y enzimas proteolíticas. Al aumentar esta gonadotropina se inducen cambios morfológicos, bioquímicos y proteolíticos afectando a la MEC en el ápex folicular (Curry y Osteen 2006).

A partir de nuestros resultados podemos inferir que el sistema de MMP/TIMP se encuentra alterado en quistes foliculares de vacas con COD y también en un modelo experimental de inducción de estrés mediante ACTH. A su vez pudimos detectar cambios incipientes en las concentraciones hormonales, como así también en MMPs y TIMPs, en animales tratados con ACTH. El aumento de la actividad de gelatinasas detectada en los folículos preovulatorios, nos permite suponer que dichas estructuras anovulatorias estarían fallando en el proceso ovulatorio normal, a pesar del acúmulo de estas proteasas y la escasez de inhibidor o inhibidores, que juegan un rol fundamental en la activación de las MMPs. Por otro lado, el desarrollo de un modelo experimental durante el proestro, nos ha permitido simular las condiciones hormonales de desarrollo de folículos dominantes, respaldando los resultados obtenidos. En nuestro grupo de trabajo se han desarrollado diferentes modelos experimentales, en los cuales se indujeron quistes mediante aplicaciones periódicas de ACTH (Amweg y col., 2013), y de persistencia de folículos mediante P4 (Díaz y col., 2015). En dichos ensayos, los patrones de concentraciones hormonales, tanto en suero como en LF han respondido de manera similar para las hormonas esteroideas que se analizaron en el modelo experimental de esta tesis, afianzando la hipótesis de que los mecanismos regulatorios alterados para la producción de dichas hormonas, en respuesta al estrés, puedan llevar a la falla en la ovulación, y por lo tanto dando otro sustento a los resultados aquí obtenidos.

Por otro lado, hoy están en auge el estudio de nuevas propiedades de ciertas proteínas con características plurifuncionales, las llamadas “Proteínas *Moonlight*” (o pluripotenciales), y se ha estudiado la habilidad de las metaloproteasas para realizar tareas disímiles, en base a cómo se codifican sus genes. Es decir, realizan múltiples funciones autónomas y a menudo no relacionadas, sin dividir estas funciones en diferentes dominios de la proteína (Huberts y van der Klei, 2010). Es así que se ha demostrado, por ejemplo, la actividad intranuclear de MMP2 en neuronas de ratas, extractos nucleares de hígado de ratas y células endoteliales de arterias pulmonares de pulmones expuestos al cigarrillo, y que de todas maneras, se deben llevar a cabo numerosos estudios futuros para saber con certeza cuál es la función nuclear de MMP2 y de cómo se internaliza, así como también de su actividad (Gobin y col., 2017). Funciones de este tipo, desconocidas aún en los bovinos, se podrían indagar para las metaloproteasas y sus inhibidores, abriendo un abanico de posibilidades. De este mismo modo, los TIMPs pueden ser multifuncionales, actuando como factores autocrinos/paracrinos en la proliferación celular, diferenciación, neovascularización, y/o esteroidogénesis durante el crecimiento del folículo, ovulación y formación del cuerpo lúteo. Si bien MMPs y TIMPs son responsables, junto con

otras enzimas, de la degradación de la pared folicular para promover la ovulación, la complejidad del proceso y el gran número de alteraciones halladas en el plano hormonal y referido a los componentes inflamatorios, confirman la naturaleza multifactorial de la etiopatogenia de COD.

6. Conclusiones

La ovulación es un proceso inflamatorio localizado en el ovario, donde intervienen una gran variedad de componentes, entre ellos, citoquinas, hormonas, metaloproteasas y sus inhibidores, entre otros; articulados entre sí para generar la ruptura de la pared folicular y liberar al ovocito para su posterior fecundación. Estos mecanismos y sus componentes se encuentran en un equilibrio u homeostasis susceptible de ser afectado fácilmente frente al cambio en alguno de sus elementos. Es así que la base de la patogenia de COD es una falla en la ovulación. En esta tesis hemos generado un modelo experimental que simula las condiciones que se presentan en los momentos previos a dicha falla en la ovulación, es decir, en el proestro y estro de la vaca, mediante un modelo experimental basado en administraciones repetidas de ACTH exógena, durante los estadios finales de desarrollo folicular.

Las estructuras ováricas no presentaron alteraciones en su morfología macroscópica en ambos grupos estudiados (animales controles y tratados con ACTH). Las concentraciones hormonales de cortisol, tanto en el LF, como en el suero, fueron elevadas. El aumento del cortisol fue progresivo durante los estadios finales del protocolo, siendo mayores que al comienzo del tratamiento. Es conocido el efecto inhibitor del cortisol para bloquear el pico preovulatorio de LH. Por otro lado, los niveles séricos de P4 se encontraron en concentraciones subluteales en los animales tratados con ACTH, lo que podría contribuir en la inhibición del pico preovulatorio de LH. En COD se describen aumentos de E2 en LF y suero. Las concentraciones de cortisol y P4 podrían estar interfiriendo en el mecanismo de acción normal de E2 en momentos posteriores a la ovulación, ya que en el presente trabajo de tesis no se observaron modificaciones en sus niveles, durante el estro. Las concentraciones de testosterona fueron menores en el suero de los animales tratados con ACTH, por lo que podría haber algún mecanismo relacionado a la alteración de la síntesis de las hormonas esteroideas, tanto en las células foliculares del ovario, como así también en la glándula adrenal, en respuesta al estímulo con ACTH. Las vías de síntesis de hormonas esteroideas comparten el mismo origen metabólico, siendo el colesterol el precursor de las mismas. Considerando esto, podríamos suponer que las modificaciones previamente detalladas, pueden impactar directamente sobre cualquiera de los pasos u enzimas que participan en este intrincado proceso.

Las metaloproteasas y sus inhibidores son componentes fundamentales en la remodelación y transformación de la matriz extracelular de todo el organismo, condición necesaria para diferentes funciones celulares, y de las cuales no escapan las células de la

pared folicular. Es la primera vez que se evalúan estas metaloproteinasas e inhibidores a lo largo de la folículogénesis, en el ovario del bovino. En el presente estudio pudimos observar aumento en la actividad de MMP2 en el LF de los animales del grupo experimental, y de COD, lo que indicaría condiciones intraováricas similares en momentos diferentes, es decir, uno previo a la ovulación y el otro con el quiste ya formado. La expresión de esta proteína fue similar en todos los grupos estudiados, podría deberse a que esta enzima puede detectarse mediante la técnica de inmunohistoquímica como pro-MMP2 y MMP2 propiamente dicha, sin posibilidad de diferenciarlas. Considerando las expresiones génicas diferentes en COD y la actividad de gelatinasa aumentada en el LF del modelo experimental y de COD, nos permite plantear la hipótesis de una regulación de MMP2 por parte de la ACTH. En cuanto a MMP9, no detectamos diferencias entre grupos en el modelo de ACTH, aunque si hubo diferencias en la actividad gelatinolítica en los quistes del grupo COD, donde presentó mayor actividad que los controles. Se conoce que MMP2 ejerce su acción a través de una activación mediada por un complejo triple con MMP14 y TIMP2. En los folículos preovulatorios, durante el estro no se presentaron modificaciones de estas proteínas, aunque si pudimos observar una menor expresión génica y proteica de TIMP2 en COD, promoviendo la falla en la regulación de la actividad de MMP2 en el LF de los quistes, donde esta se vio aumentada. Por otro lado, podemos suponer que los mecanismos regulatorios de MMP2 no se limitan solo a su inhibidor tisular, ya que en el LF de los animales tratados con ACTH también encontramos aumento en la actividad de esta gelatinasa, indicando que probablemente las vías hormonales regulen también la acción de MMP2. Los hallazgos observados para TIMP1 concuerdan con las publicaciones anteriores, donde se lo relaciona con actividades de remodelación ovárica para la luteinización del tejido ovárico post-ovulación, ya que se vio menor expresión génica en los quistes foliculares de COD, que podría vincularse a la falla en la ovulación y por ende, que no se desencadenan completamente los mecanismos para luteinizar las células del folículo. En el caso de las citoquinas aquí evaluadas, IL-1 β e IL-4, no presentaron diferencias entre los grupos del modelo experimental, ni entre los compartimientos evaluados. Como se mencionó anteriormente, forman parte de un conjunto de proteínas que trabajan interconectadas, a diferentes niveles, y en respuesta a diferentes mecanismos de activación, que probablemente se vean alterados en etapas posteriores al estro, en el transcurso de la patogenia de la enfermedad, ya que recientemente, nuestro grupo de trabajo ha publicado alteraciones en estas proteínas en COD.

No se obtuvieron diferencias en la expresión génica de MMP2, entre los grupos basales y los estimulados con ACTH en los cultivos de pared folicular completa, lo que concuerda con los hallazgos de la expresión proteica. Es importante mencionar que el tiempo desde el estímulo con ACTH hasta el momento de la evaluación de la expresión de MMPs pudo haber sido escaso, por lo que sería importante realizar más estudios en este sentido.

Con los resultados presentados en este trabajo, podemos concluir que hay un desbalance hormonal observado en el modelo experimental, así como también un desequilibrio en el sistema MMP/TIMP. Hemos recreado las condiciones observadas en modelos experimentales que estudian los momentos previos a la formación de los quistes foliculares ováricos, permitiendo considerar este modelo como una base sustentable de conocimiento, repetible, para la posterior evaluación de otros factores implicados en el proceso ovulatorio frente a situaciones de estrés o mediadas por ACTH.

El trabajo aquí desarrollado contribuye a acrecentar la información sobre la etiopatogenia de la enfermedad quística ovárica en las vacas, así como también brinda conocimientos sobre los efectos del estrés en las etapas finales del desarrollo de folículos preovulatorios. Es imperioso mencionar la importancia del trabajo interdisciplinario y en equipo que conllevan este tipo de estudios, no solo para generar recursos teóricos, sino también trasladarlos al medio, con el fin de disminuir la prevalencia de COD.

7. Bibliografía

Acosta TJ, Tetsuka M, Matsui M, Shimizu T, Berisha B, Schams D, Miyamoto A. 2005. In vivo evidence that local cortisol production increases in the preovulatory follicle of the cow. *J Reprod Dev.* 51: 483-489.

Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil.* 94: 177-188.

Aerts JMJ, Bols PEJ. 2010a. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reprod Dom Anim.* 45: 171-179.

Aerts JMJ, Bols PEJ. 2010b. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Development. Reprod Dom Anim.* 45: 180-187.

Alam MGS, Dobson H y Fitzpatrick RJ. 1986. Endocrine response to different doses of ACTH in cows. *British Veterinary Journal,* 142:3; 239-245.

Alexander CM, Werb Z. 1989. Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr Opin Cell Biol.* 1: 974-982.

Alfaro NS, Salvetti NR, Velazquez MM, Stangaferro ML, Rey F, Ortega HH. 2012. Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Res Vet Sci.* 92: 478-85.

Alila HW y Hansel W. 1984. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biol Reprod.* 31: 1015-1025.

Alsop D, Ings JS, Vijayan MM. 2009. Adrenocorticotropic hormone suppresses gonadotropin-stimulated estradiol release from zebrafish ovarian follicles. *PLoS One* 4:e6463.

Amweg AN, Rodríguez FM, Huber E, Marelli BE, Gareis NC, Belotti EM, Rey F, Salvetti NR, Ortega HH. 2017. Detection and activity of 11 beta hydroxylase (CYP11B1) in the bovine ovary. *Reproduction.* 153: 433-441.

Amweg AN, Rodriguez FM, Huber E, Marelli BE, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. 2016. Role of glucocorticoids in the bovine cystic disease: Expression of glucocorticoid receptor in the bovine ovary. *Cells Tissues Organs.* 201:138-47.

Amweg AN, Salvetti NR, Stangaferro ML, Paredes AH, Lara HH, Rodríguez FM, Ortega HH. 2013. Ovarian localization of 11 β Hydroxysteroid Dehydrogenase (11 β HSD):

Effects of ACTH stimulation and its relationship with bovine cystic ovarian disease. *Domest Anim Endocrinol.* 45: 126-140.

Amweg AN, Paredes A, Salvetti NR, Lara HE, Ortega HH. 2011. Expression of melanocortin receptors mRNA, and direct effects of ACTH on steroid secretion in the bovine ovary. *Theriogenology.* 75:628-637.

Andersen CY. 2002. Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis. *J Endocrinol.* 173: 211-217.

Ando M, Kol S, Kokia E, Ruutiainen-Altman K, Sirois J, Rohan RM, Payne DW, Adashi EY. 1998. Rat ovarian prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2: periovulatory expression of granulosa cell-based interleukin-1-dependent enzymes. *Endocrinology.* 139: 2501-2508.

Arend WP. 1991. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest.* 88: 1445-1451.

Arsenescu R, Arsenescu V, de Villiers WJ. 2011. TNF-alpha and the development of the neonatal immune system: Implications for inhibitor use in pregnancy. *Am J Gastroenterol.* 106: 559-562.

Avalos BR, Kaufman SE, Tomonaga MT, Williams RE, Golde DW, Gasson JC. 1988. K562 cells produce and respond to human erythroid-potentiating activity. *Blood* 71: 1720-1725.

Baird DT, Land RB, Scaramuzzi RJ, Wheeler AG. 1976. Endocrine changes associated with luteal regression in the ewe; the secretion of ovarian oestradiol, progesterone and androstenedione and uterine prostaglandin F2a throughout the oestrous cycle. *Journal of Endocrinology* 69: 275-86.

Bakke LJ, Li Q, Cassar CA, Dow MP, Pursley JR, Smith GW. 2004. Gonadotropin surge-induced differential upregulation of collagenase-1 (MMP-1) and collagenase-3 (MMP-13) mRNA and protein in bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod.* 71: 605-12.

Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS. 1997. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol Reprod.* 56: 1158-1168.

Baratta M, Basini G, Bussolati S, Tamanini C. 1996. Effects of interleukin-1 b fragment (163-171) on progesterone and estradiol-17 β release by bovine granulosa cells from different size follicles. *Regul Pept.* 67: 187-194.

Baravalle C, Salvetti NR, Mira GA, Lorente JA, Ortega HH. 2007. Role of ACTH in the pathogenesis of Polycystic Ovarian Syndrome in the rat: hormonal profiles and ovarian morphology. *Physiol Res.* 56: 67-78.

Baravalle ME, Stassi AF, Velázquez MM, Belotti EM, Rodríguez FM; Ortega HH, Salvetti NR. 2015. Altered Expression of Pro-inflammatory Cytokines in Ovarian Follicles of Cows with Cystic Ovarian Disease. *J Comp Pathol.* Aug-Oct; 153: 116-30.

Bartlett PC, Ngategize PK, Kaneene JB, Kirk JH, Anderson SM, Mather EC. 1986. Cystic follicular disease in Michigan Holstein-Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology and economic impact. *Prev Vet Med.* 4: 15-33.

Bartolomé JA, Sozzi A, McHale J, Melendez P, Arteché AC, Silvestre FT, Kelbert D, Swift K, Archbald LF, Thatcher WW. 2005. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows, II: assigning protocols according to stages of the estrous cycle, or presence of ovarian cysts or anestrus. *Theriogenology.* 63: 1628-42.

Bautista AP. 2001. Free radicals, chemokines, and cell injury in HIV-1 and SIV infections and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med.* 31: 1527-1532.

Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 89: 3413-3424.

Belotti EM, Stassi AF, Velázquez MML, Díaz PU, Marelli BE, Rey F, Notaro US, Ortega HH, Salvetti NR. 2017. Changes in the Proliferation/Apoptosis Balance in the Bovine Ovary: A Key Early Event in Follicular Persistence. *Cells Tissues Organs.* doi: 10.1159/000481167.

Ben-Shlomo I, Goldman S y Shalev E. 2003. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of MMP, and progesterone secretion in luteinized granulosa cells from normally ovulating women with polycystic ovary disease. *Fertil. Steril.* 79: 694-701.

Bierschwal CJ. 1966. A clinical study of cystic conditions of the bovine ovary. *J Am Vet Med Assoc.* 149: 1591-1595.

Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM. 1997. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH- terminal

hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP 2. *Journal of Biological Chemistry*. 272 : 15496-15500.

Biran D, Braw-Tal R, Gendelman M, Lavon Y, Roth Z. 2015. ACTH administration during formation of preovulatory follicles impairs steroidogenesis and angiogenesis in association with ovulation failure in lactating cows. *Domest Anim Endocrinol*. Oct;53:52-9.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 197-250

Bjersing L, Cajander S. 1974. Ovulation and the mechanism of follicle rupture. VI. Ultrastructure of theca interna and the inner vascular network surrounding rabbit graafian follicles prior to induced ovulation. *Cell Tissue Res*. 153:31-44.

Bó GA, Caccia M. 2002. Dinámica folicular en el ganado bovino. En: UNGERFELD R. Reproducción en los animales domésticos. Ed. Melibea.

Bonder CS, Dickensheets HL, Finlay-Jones JJ, Donnelly RP, Hart PH. 1998. Involvement of the IL-2 receptor gamma-chain (gammac) in the control by IL-4 of human monocyte and macrophage proinflammatory mediator production. *J Immunol*. 160: 4048-4056.

Bonnans C, Chou J, Werb Z. 2014. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Dec; 15(12): 786-801.

Bosu WT, Peter AT. 1987. Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 28: 725.

Boujrad N, Ogwuegbu SO, Garnier M, Lee CH, Martin BM, Papadopoulos V. 1995. Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis. *Science* 268: 1609-1612

Bouma-ter Steege JC, Mayo KH, Griffioen AW. 2001. Angiostatic proteins and peptides. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 11: 319-334.

Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254.

Brannstrom M, Bonello N, Wang LJ y Norman RJ. 1995. Effects of tumour necrosis factor (TNF) on ovulation in the rat ovary. *Reprod Fertil Dev* 7, 67-73.

Brännström M, Lind AK, Dahm-Kähler P. 2010. Chapter 9: Ovulation A Molecular View. In: Reproductive Endocrinology and Infertility. Editors: Douglas T. Carrell, C. Matthew Peterson. Pp 119-132. ISBN: 978-1-4419-1435-4.

Brännström M. 2004. Potential role of cytokines in ovarian physiology: the case for interleukin-1. In: The Ovary, 2nd Edit., PCK Leung, EY Adashi, Eds., Elsevier Academic Press, Vancouver. 261-271.

Braw-Tal R, Roth Z. 2005. Gene expression for LH receptor, 17 alphahydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction*. 129: 453-461.

Braw-Tal R, Yossefi S. 1997. Studies in-vivo and in-vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*. 109: 165-171.

Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 1477:267–283.

Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. 1996. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin α versus β 3. *Cell* 85 : 683-693.

Buckham Sporer KR1, Burton JL, Earley B, Crowe MA. 2007. Transportation stress in young bulls alters expression of neutrophil genes important for the regulation of apoptosis, tissue remodeling, margination, and anti-bacterial function. *Vet Immunol Immunopathol. J Periodontol*. Jul;78: 1309-15.

Bukovsky A, Caudle MR. 2008. Immune physiology of the mammalian ovary – a review. *Am J Reprod Immunol*. 59: 12-26.

Butler GS, Apte SS, Willenbrock F, Murphy G. 1999. Human tissue inhibitor of metalloproteinases 3 interacts with both the N and C-terminal domains of gelatinases A and B. Regulation by polyanions. *Journal of Biological Chemistry* 274: 10846-10851.

Calder MD, Manikkam M, Salfen BE, Youngquist RS, Lubahn DB, Lamberson WR, Garverick HA. 2001. Dominant bovine ovarian follicular cysts express increased levels of messenger RNAs for luteinizing hormone receptor and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta(4),delta(5) isomerase compared to normal dominant follicles. *Biol Reprod*. 65: 471-476.

Camp TA, Rahal JO, Mayo, KE. 1991. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol.* 5: 1405-1417.

Canty MJ, Boland MP, Evans AC, Crowe MA. 2006. Alterations in follicular IGFBP mRNA expression and follicular fluid IGFBP concentrations during the first follicle wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci.* 93: 199-217.

Cao J, Rehemtulla A, Bahou W, Zucker S. 1996. Membrane type matrix metalloproteinase 1 activates pro-gelatinase A without furin cleavage of the N-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry.* 271: 30174-30180.

Carrie're PD, Amaya D, Lee B. 1995. Ultrasonography and endocrinology of ovarian dysfunction in heifers with estradiol valerate. *Theriogenology.* 43: 1061-1076.

Carroll, J.A. y Forsberg N.E.. Influence of Stress and Nutrition on Cattle Immunity. 2007. *Food Animal Practice.* Vol 23-1:105–149.

Cattaneo L, Signorini M, Bertoli J, Bartolomé J, Gareis N, Díaz P, Bó G, Ortega H. 2014. Epidemiological description of cystic ovarian disease in argentine dairy herds: risk factors and effects on the reproductive performance of lactating cows. *Reprod Domest Anim.* 49: 1028-1033.

Chaffin CL, Stouffer RL. 1999. Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor messenger ribonucleic acids in macaque periovulatory granulosa cells: time course and steroid regulation. *Biol Reprod.* 61: 14–21.

Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol.* 67: 259-284.

Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. 1998. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med.* 129: 229-240.

Chun SY, Popliker M, Reich R, Tsafiriri A. 1992. Localization of preovulatory expression of plasminogen activator inhibitor type-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase type-1 mRNAs in the rat ovary. *Biol Reprod* 47: 245–253.

Conley AJ y Bird IM. 1997. The role of cytochrome p450 17 α -hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the Δ^5 and Δ^4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biology of Reproduction* 56, 789-799.

Cook DL, Parfet JR, Smith CA, Moss GE, Youngquist RS, Garverick HA. 1991. Secretory patterns of LH and FSH during development and hypothalamic and hypophyseal characteristics following development of steroid-induced ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J Reprod Fertil.* 91: 19-28.

Cook DL, Smith CA, Parfet JR, Youngquist RS, Brown EM, Garverick HA. 1990. Fate and turnover rate of ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J Reprod Fertil.* 90: 37-46.

Cooke RG, Nothnick WB, Komar C, Burns P, Curry TE. 1999. Collagenase and gelatinase messenger ribonucleic acid expression and activity during follicular development in the rat ovary. *Biol Reprod.* 61: 1309–1316.

Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. 2002. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science.* 295:2387–2392.

Crowe MA, Enright WJ, Boland MP, Roche JF. 2001a. Follicular growth and serum folliclestimulating hormone (FSH) responses to recombinant bovine FSH in GnRH-immunized anoestrous heifers. *Anim Sci.* 73: 115-122.

Crowe MA, Kelly P, Driancourt MA, Boland MP, Roche JF. 2001b. Effects of folliclestimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin releasing hormone-immunized heifers. *Biol Reprod.* 64: 368-374.

Cunningham JG. 2003. *Fisiología Veterinaria*. 3ra. Edición. Capítulo 33: Las glándulas endocrinas y su función. Madrid. España. Ed. Elsevier. p. 348-354.

Curry TE Jr, Smith MF. 2006. Impact of extracellular matrix remodeling on ovulation and the folliculo-luteal transition. *Semin Reprod Med.* 24: 228-241.

Curry TE Jr y Osteen KG. 2003. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev.* 24 428–465.

Curry TE Jr., Song L, Wheeler SE. 2001. Cellular Localization of Gelatinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases During Follicular Growth, Ovulation, and Early Luteal Formation in the Rat. *Biol Reprod.* 65: 855–865.

Curry TE y Nothnick WB. 2000. Changes in ovarian TIMP expression during follicular growth, ovulation, and the luteal period in the rat. In: Hawkes S, Edwards D, Khoka R (eds.), *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Metalloproteinases in Development and Disease*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. p. 119–126.

Curry TE Jr, Komar C, Burns PD, Nothnick WB. 2000. Periovarian changes in ovarian metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) following indomethacin treatment. In: Adashi EY (ed.), *Ovulation: Evolving Scientific and Clinical Concepts*. New York: Springer Verlag: 265–276.

Cury PR, Araújo VC, Canavez F, Furuse C, Araújo NS. 2007. Hydrocortisone affects the expression of matrix metalloproteinases (MMP-1, -2, -3, -7, and -11) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP-1) in human gingival fibroblasts. *Jul 15;118*: 19-29.

Danisová A, Seböková E, Kolena J. 1987. Effect of corticosteroids on estradiol and testosterone secretion by granulosa cells in culture. *Exp Clin Endocrinol*. 89: 165-173.

Davies E y MacKenzie SM. 2003. Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Jul;30: 437-45.

De Silva M, Reeves JJ. 1988. Hypothalamic-Pituitary function in chronically cystic and regularly cycling dairy cows. *Biol Reprod*. 38: 264-269.

De Simone EA, Perrone G, Caggiano N, Lastra Y, Rubatino F, Díaz J, Ferreto A, Montes de Oca C, Roldán E, Chiappe Barbará MA. 2015. Levels of Cytokines and Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in the Synovial Fluid of Osteoarthritic Horses Treated with Pamidronate *Journal of Equine Veterinary Science*. 35:577–583.

Dellmann HD, Eurell JA. 1998. *Textbook of veterinary histology*. 5th ed, London: Williams y Wilkins.

Dellmann HD, Priedkalns J. 1994. *Histología Veterinaria*. 2da. Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

Dhilló WS, Murphy KG, Bloom S. 2006. Endocrinology: the next 60 years. *J Endocrinol*. 190: 7-10.

Díaz PU, Stangaferro ML, Gareis NC, Silvia W, Matiller V, Salvetti NR, Rey F, Barberis F, Cattaneo L, Ortega HH. 2015. Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: an experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology*. 84: 1149-1160.

Dinarello CA. 1994. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J*. 8: 1314-1325.

Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM. 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci*. 78: 345-370.

Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. 2002. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol.* 21: 33-49.

Dobson H, Smith RF. 1995. Stress and reproduction in farm animals. *J Reprod Fertil Suppl.* 49: 451-461.

Dobson H, Tebble JE, Ozturk M, Smith RF. 1999. Effect of transport on pulsatile LH release in ovariectomized ewes with or without prior steroid exposure at different times of year. *J Reprod Fertil.* 117: 213-222.

Dobson H, Smith RF. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim Reprod Sci.* 60-61: 743-752.

Dobson H, Tebble JE, Smith RF, Ward WR. 2001. Is stress really all that important? *Theriogenology.* 55: 65-73.

Dorrington JH, Moon YS, Armstrong DT. 1975. Estradiol-17beta biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by folliclestimulating hormone. *Endocrinology* 97: 1328-1331.

Duncan WC, McNeilly AS, Illingworth PJ. 1998. The effect of luteal "rescue" on the expression and localization of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab;* 83:2470–2478.

Duong HT, Piotrowska-Tomala KK, Acosta TJ, Bah MM, Sinderewicz E, Majewska M, Jankowska K, Okuda K, Skarzynski DJ. 2012. Effects of cortisol on pregnancy rate and corpus luteum function in heifers: an in vivo study. *J Reprod Dev.* 58: 223-230.

Dyce K.M., y col. 1999. *Anatomía veterinaria. 3ª Edición. El manual Moderno.* DF, México.

Edwards DR, Beaudry PP, Laing TD, Kowal V, Leco KJ, Leco PA, Lim MS. 1996. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders* 20 (Suppl. 3), S9 /S15.

Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT. 2004. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol.* 25: 132-149.

Erb RE, Monk EL, Callahan CJ, Mollet TA. 1973. Endocrinology of induced ovarian follicular cysts. *J Anim Sci.* 37:310.

Espey LL. 1980. Ovulation as an inflammatory reaction- A hypothesis. *Biol Reprod.* 22: 73-106.

Espey LL, Coons PJ, Marsh JM, LeMaire WJ. 1981. Effects of indomethacin on preovulatory changes in the ultrastructure of rabbit graafian follicles. *Endocrinology* 108: 1040-1048.

Espey LL. 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod.* 50: 233-238.

Espey LL. 1999. Ovulation. En: *Encyclopedia of Reproduction*, Vol. 3, eds. E. Knobil and J. D. Neill. San Diego: Academic Press, 605-614.

Espey LL, Belilinger AS, Healy JA. 2004. Ovulation: an inflammatory cascade of gene expression. In: *The Ovary*, 2nd Edit., PCK Leung, EY Adashi, Eds., Elsevier Academic Press, Vancouver. 145-165.

Evans AC, Adams GP, Rawlings NC. 1994. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J Reprod Fertil.* 100: 187-194.

Evans ACO, Fortune JE. 1997. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology.* 138: 2963-2971.

Farnworth PG. 1995. Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotroph?. *J Endocrinol.* 145: 387-395.

Fata JE, Ho AT, Leco KJ, Moorehead RA, Khokha R. 2000. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci.* 57: 77-95.

Fathala MA, Geissenger HD, Liptrap RM. 1978. Effects of endometrial damage and prostaglandin F2a in experimental cystic ovarian follicles in the cow. *Res Vet Sci.* 25: 269-279.

Field SL, Dasgupta T, Cummings M, Orsi NM. 2014. Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. *Mol Reprod Dev.* 81: 284-314.

Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. 2002. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor beta superfamily. *Mol Cell Endocrinol.* 191: 35-43.

Forbes K, Westwood M. 2010. Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth. *J Endocrinol* 207: 1-16.

Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JM, Crowe MA. 2011. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci.* 124: 163-169.

Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans ACO, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O'Gaora P, Lonergan P, Roche JF. 2009. Progesterone regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol Reprod.* 81: 784-794.

Fortune JE. 1986. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol Reprod. Sep;* 35: 292-299.

Fortune JE, Quirk SM. 1988. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J Anim Sci.* 66: 1-8.

Fortune JE. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 50: 225-232.

Frandsen R, Wilke WL, Fails AD. 2003. The Ovary and Estrous Cycles. En: Frandsen R, Anatomy and physiology of farm animals. p 481. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore.

Frankenstein Z, Alon U, Cohen IR. 2006. The immune-body cytokine network defines a social architecture of cell interactions. *Biol Direct.* 1: 32.

Gaafar TM, Hanna MO, Hammady MR, Amr HM, Osman OM, Nasef A, Osman AM. 2014. Evaluation of cytokines in follicular fluid and their effect on fertilization and pregnancy outcome. *Immunol Invest.;*43: 572-84.

García R, Ballesteros LM, Hernández-Pérez O, Rosales AM, Espinosa R, Soto H, Díaz de León L, Rosado A. 1997. Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles of the goat. *Anim Reprod Sci.* 47: 211-280.

Garnero O, Perusia O. 2002. Círuqía de cabeza, cuello y torax. Aparato reproductor de la hembra. En: Garnero O, Perusia O, Manual de anestias y cirugías del bovino. 3ra edición. Ed. Imprenta San Cayetano, Santa Fe. 31: 59-76

Garverick HA. 1997. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci.* 80: 995-1004.

Gasque Gómez, R. 2008. Capítulo 10: Reproducción Bovina. En: Enciclopedia Bovina. (Ed. Comité Editorial de la Universidad Nacional Autónoma de México) 1ra Edición, México, p. 393.

Getting SJ. 2006. Targeting melanocortin receptors as potential novel therapeutics. *Pharmacol Therapeut.* 111: 1-15.

Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci.* 78: 239-257.

Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. 2000a. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol Reprod.* 63: 383-389.

Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. 2000b. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biol Reprod.* 62: 920-927.

Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP, 1989: Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol Reprod.* 41: 247-254.

Goldman S y Shalev E. 2004. MMPs and TIMPs in ovarian physiology and pathophysiology. *Frontiers in Bioscience* 9, 2474-2483.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* 74: 111-122.

Gottsch ML, Van Kirk EA, Murdoch WJ. 2000. Tumour necrosis factor alpha up-regulates matrix metalloproteinase-2 activity in periovulatory ovine follicles: metamorphic and endocrine implications. *Reprod Fertil Dev*; 12:75-80.

Gougeon A, Lefevre B. 1983. Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. *J Reprod Fertil.* 69: 497:502.

Gümen A, Sartori R, Costa FM, Wiltbank MC. 2002. A GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure can induce development of follicular cysts. *J Dairy Sci.* 85: 43-50.

Gümen A, Wiltbank MC. 2002. An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. *Biol Reprod.* 66: 1689-1695.

Gwazdauskas FC, Thatcher W y Wilcox J. 1972. Adrenocorticotropin alteration of bovine peripheral plasma concentrations of cortisol, corticosterone, and progesterone. *Journal of dairy science.* Vol. 55, 1. 8

Hafez ESE, Hafez B. 2000. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales.* 7ª Edición. McGraw-Hill. Interamericana. Barcelona, España.

Hagglund AC, Ny A, Leonardsson G, Ny T. 1999. Regulation and localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse ovary during gonadotropin-induced ovulation. *Endocrinology.* 140: 4351-4358.

Hamilton SA, Garverick HA, Keisler DH, Xu ZZ, Loos K, Youngquist RS, Salfen BE. 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol Reprod.* 53: 890-898.

Hansel W, Convey EM. 1983. Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci.* 57: 404-424.

Hansel W. 1966. Luteotrophic and luteolytic mechanisms in bovine corpora lutea. *J Reprod Fertil.* 1: 33-48.

Hatler TB, Hayes SH, Laranja Da Fonseca LF, Silvia WJ. 2003. Relationship between endogenous progesterone and follicular dynamics in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts. *Biol Reprod.* 69: 218-223.

Hatler TB, Hayes SH, Ray DL, Reames PS, Silvia WJ. 2008. Effect of subluteal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows. *Vet J.* 177: 360-368.

Hein KG y Allrich RD. 1992. Influence of exogenous adrenocorticotrophic hormone on estrous behavior in cattle. *J. Anim. Sci.* 70: 243-247.

Hillier SG, Tetsuka M. 1998. An anti-inflammatory role for glucocorticoids in the ovaries?. *J Reprod Immunol.* 39: 21-27.

Hillier SG. 1994. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod.* 9: 188-191.

Hirshfield AN. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 124: 43-101.

Hooijer GA, Lubbers RB, Ducro BJ, van Arendonk JA, Kaal-Lansbergen LM, van der Lende T. 2001. Genetic parameters for cystic ovarian disease in dutch black and white dairy cattle. *J Dairy Sci.* 84: 286-291.

Hsueh AJ, Erickson GF. 1978. Glucocorticoid inhibition of FSH-induced estrogen production in cultured rat granulosa cells. *Steroids* 32: 639-648.

Hurwitz A, Dushnik M, Solomon H, Ben-Chetrit A, Finci-Yeheskel Z, Milwidsky A, Mayer M, Adashi E y Yagel S. 1993. Cytokine-mediated regulation of rat ovarian function: interleukin-1 stimulates the accumulation of a 92-kilodalton gelatinase. *Endocrinology* 132: 2709-2714.

Hurwitz A, Finci-Yeheskel Z, Dushnik M, Milwidsky A, Shimonovitz S, Yagel S, Adashi EY, Mayer M. 1995. Interleukin-1-mediated regulation of plasminogen activation in

pregnant mare serum gonadotropin-primed rat granulosa cells is independent of prostaglandin production. *J Soc Gynecol Investig* 2: 691–699

Hynes RO. 1999. Extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. Nov 27; 326: 1216–1219.

Imai K, Khandoker MA, Yonai M, Takahashi T, Sato T, Ito A, Hasegawa Y, Hashizume K 2003. Matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in bovine follicular fluid of different-sized follicles: relationship to intra-follicular inhibin and steroid concentrations. *Domest Anim Endocrinol*. 24: 171-83.

Inderdeo DS, Edwards DR, Han VK, Khokha R. 1996. Temporal and spatial expression of tissue inhibitors of metalloproteinases during the natural ovulatory cycle of the mouse. *Biol Reprod*. 553: 498-508.

Inza DR y Van Thillo G. 2011. Citoquinas y ovulación. *Rev SAEGRE*. 18: 44-59.

Ireland JJ, Roche JF. 1983. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology*. 112: 150- 156.

Ireland JJ. 1987. Control of follicular growth and development. *J Reprod Fertil*. 34: 39-54.

Ireland, JJ, Roche JF. 1982. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology*. 111: 2077-2086.

Jordan ER. 2003. Effects of Heat Stress on Reproduction. *J Dairy Sci*. 86: 104-114.

Kakar SS, Rahe CH, Neill JD. 1993. Molecular cloning, sequencing, and characterizing the bovine receptor for gonadotropin releasing hormone (GnRH). *Domest Anim Endocrinol*. 10: 335-342.

Kawate N, Inaba T, Mori J. 1990. A quantitative comparison in the bovine of steroids and gonadotropin receptors in normally developing follicles and in follicular and luteinized cysts. *Anim Reprod Sci*. 23: 273-281.

Kawate N, Inaba T, Mori J. 1993. Effects of cortisol on the amounts of 17 β -estradiol and progesterone secreted and the number of luteinizing hormone receptors in cultured bovine granulosa cells. *Anim Reprod Sci*. 32: 15-25.

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

Kesler DJ, Garverick HA, Caudle AB, Elmore RG, Youngquist RS, Bierschwal CJ. 1980. Reproductive hormone and ovarian changes in cows with ovarian cysts. *J Dairy Sci.* 63: 166-170.

Kesler DJ, Garverick H.A. 1982. Ovarian Cysts in Dairy Cattle : a Review. *J Anim Sci.* 55: 1147-1159.

Kesner JS, Padmanabhan V, Convey EM. 1982. Estradiol induces and progesterone inhibits the preovulatory surges of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in heifers. *Biol Reprod.* 26: 571-578.

Kimmins S, MacLaren LA. 2001. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta* 22: 742-748.

Kindahl H, Edqvist LE, Granstrom E, Bane A. 1976. The release of prostaglandin F₂alpha as reflected by 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin F₂alpha in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers. *Prostaglandins.* 11: 871-878.

Kindahl H, Lindell JO, Edqvist LE. 1979. On the control of prostaglandin release during the bovine estrous cycle. Effects of progesterone implants. *Prostaglandins.* 18: 813-820.

Kittok RJ, Britt JH, Edgerton LA. 1974. Serum steroids after gonadotropin treatment in cows with ovarian follicular cysts. *Am J Vet Res.* 35:1575-1576.

Knauper V, Will H, Lopez Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G. (1996. Cellular mechanisms for human procollagenase- 3 (MMP-13) activation: evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase A (MMP-2) are able to generate active enzyme." *Journal of Biological Chemistry.* 271: 17124–17131.

Knight PG, Glister C. 2003. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci.* 78. 165-183.

Knight PG, Glister C. 2006. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 132: 191-206.

Kol S, Ben-Shlomo I, Payne DW, Ando M, Rohan RM, Adashi EY. 1998. Glucocorticoids suppress basal (but not interleukin-1-supported) ovarian phospholipase A2

activity: evidence for glucocorticoid receptor-mediated regulation. *Mol Cell Endocrinol.* 137:117- 125.

König H.E. y Liebich H.G. *Anatomía de los animales domésticos.* 2ª Edición. Panamericana. Barcelona, España.

Kostadinova F, Schwaderer J, Sebeo V, Brunner T. 2014. Why does the gut synthesize glucocorticoids? *Ann Med. Nov*;46. 7: 490-7.

Kulick LJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology.* 52: 913-921.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.

Lagaly DV, Aad PY, Grado-Ahuir JA, Hulseley LB, Spicer LJ. 2008. Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Mol Cell Endocrinol.* 284: 38-45.

Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. 2004. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol.* 49; 3: 187–198

Lamothe P, Bousquet D, Guay P. 1977. Cyclic variation of F prostaglandins in the uterine fluids of the cow. *J Reprod Fertil.* 50: 381-382.

Laporte HM, Hogeveen H, Schukken YH, Noordhuizen JPTM. 1994. Cystic ovarian disease in Dutch dairy cattle I. Incidence, risk factors and consequences. *Livest Prod. Sci.* 38: 191-197.

Laroux FS, Pavlick KP, Hines IN, Kawachi S, Harada H, Bharwani S, Hoffman JM, Grisham MB. 2001. Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiol Scand.* 173: 113-118.

Lee CN, Cook DL, Parfet JR, Smith CA, Youngquist RS, Garverick HA. 1988. Induction of persistent ovarian follicular structures following administration of progesterone near the onset of estrus in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 71: 3505-3508.

Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. 2001. Effect of bonemorphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod.* 65: 994-999.

Li C, Jackson RM. 2002. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282: C227-C241.

Liakos P, Chambaz EM, Feige JJ, Defaye G. 1998. Expresión of ACTH receptors (MC2-R and MC5-R) in the glomerulosa and the fasciculata-reticulares zones of bovine adrenal cortex. *Endocr Res.* 24: 427-432.

Liakos P, Chambaz EM, Feige JJ, Defaye G. 2000. Expression and regulation of melanocortin receptor-5 (MC5-R) in the bovine adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 159: 99-107.

Liptrap RM, McNally PJ. 1976. Steroid concentrations in cows with corticotropin-induced cystic ovarian follicles and the effect of prostaglandin F₂alpha and indomethacin given by intrauterine injection. *Am J Vet Res.* 37: 369-375.

Lopez-Díaz MC, Bosu WT. 1992. A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. *Theriogenology.* 37: 1163-1183.

López-gatius F, Santolaria P, Yániz J, Fenech M, López-Béjar M. 2002. Risk factors for postpartum ovarian cysts and their spontaneous recovery or persistence in lactating dairy cows. *Theriogenology.* 58: 1623-1632.

Luck MR, Jungclas B. 1988. The time-course of oxytocin secretion from cultured bovine granulosa cells, stimulated by ascorbate and catecholamines. *J Endocrinol.* 116: 247-258.

Lucy MC, Thatcher WW, Macmillan KL. 1990. Ultrasonic identification of follicular populations and return to estrus in early postpartum dairy cattle given intravaginal progesterone for 15 days. *Theriogenology.* 34: 325-340.

Lucy MC. 2007. The bovine dominant ovarian follicle. *J Anim Sci.* 85: 89-99.

Luster AD. 1998. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338; 7:436–445Suplemento N° II: 131.

luteal regression in the ewe; the secretion of ovarian oestradiol, progesterone and androstenedione and uterine prostaglandin F₂alpha throughout the oestrous cycle. *J Endocrinol.* 69: 275-286.

Magomedova L y Cummins CL. 2016. Glucocorticoids and metabolic control. *Handbook of Experimental Pharmacology* 233: 73–93.

Marchenko G, Strongin A. 2001. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene.* 265: 87–93.

Marelli BE, Díaz PU, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. 2014. mRNA expression pattern of gonadotropin receptors in bovine follicular cysts. *Biol Reprod.* 4: 276-281.

Matiller V, Stangaferro ML, Díaz PU, Ortega HH, Rey F, Huber E, Salvetti NR. 2014. Altered expression of transforming growth factor-beta isoforms in bovine cystic ovarian disease. *Reprod Domest Anim.* 49: 813-823.

Mc Donald, L. 1975. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 2nd Ed. Lea & Febiger.

McCaffery FH., Leask R, Riley SC, Telfer EE. 2000. Culture of Bovine Preantral Follicles in a Serum-Free System: Markers for Assessment of Growth and Development. *Biology of Reproduction*, Volume 63, Issue 1: 267–273.

McIntush EW, Smith MF. 1998. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ovarian function. 3: 23–30. Review.

McNeilly AS, Crow W, Campbell BK. 1991. Effect of follicular fluid and inhibin immunoneutralization on FSH-induced preovulatory follicle growth in the ewe. *J Endocrinol*. 131: 401-409.

Melov S. 2002. Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. *Int J Biochem Cell Biol*. 34: 1395-1400.

Michael A, Thurston LM, Rae MT. 2003. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction*. 126: 425-441.

Mihm M, Austin EJ, Good TE, Ireland JL, Knight PG, Roche JF, Ireland JJ. 2000. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod*. 63: 811-819.

Mills PC, Higgins AJ. 1997. Oxidant injury, nitric oxide, and pulmonary vascular function: Implications for the exercising horse. *Vet J*. 153: 125-148.

Moberg GP. 1991. How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *J Dairy Sci*. 74: 304-311.

Moenter SM, Brand RC, Karsch FJ. 1992. Dynamics of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology*. 130: 2978-2984.

Molter-Gérard C, Caraty A, Guérin S, Fontaine J, Taragnat C. 2000. Dynamic changes in the gonadotrope cell subpopulations during an estradiol-induced surge in the ewe. *Biol Reprod*. 63:1084-1091.

Morales TI, Woessner Jr JF, Marsh JM, LeMaire WJ. 1983. Collagen, collagenase and collagenolytic activity in rat graafian follicles during follicular growth and ovulation. *Biochim Biophys Acta*. 756:119–122.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. 1996. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*. 392:49-53.

Möstl E, Palme R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol.* 23: 67-74.

Mu Y, Liu J, Wang B, Wen Q, Wang J, Yan J, Zhou S, Ma X, Cao Y. 2010. Interleukin 1 beta (IL-1 β) promoter C [-511] T polymorphism but not C [+3953] T polymorphism is associated with polycystic ovary syndrome. *Endocrine.* 37: 71-75.

Murdoch WJ, McCormick RJ. 1992. Enhanced degradation of collagen within apical versus basal wall of ovulatory ovine follicle. *American Journal of Physiology* 263: E221-225.

Murdoch WJ. 1998. Regulation of collagenolysis and cell death by plasmin within the formative stigma of preovulatory ovine follicles. *J Reprod Fertil*; 113:331–336

Murdoch WJ. 1999. Plasmin-tumour necrosis factor interaction in the ovulatory process. *J Reprod Fertil Suppl* 54, 353–358.

Murdoch WJ, Gottsch ML. 2003. Proteolytic mechanisms in the ovulatory folliculo-luteal transformation. *Connect Tissue Res*; 44:50–57.

Mutlag AM, Wang X, Yang Z, Meng J, Wang X, Zhang J, Qin Z, Wang G, Li J. 2015. Study on matrix metalloproteinase 1 and 2 gene expression and NO in dairy cows with ovarian cysts. *Anim Reprod Sci.* 152:1-7.

Nadaraja R, Hansel W. 1976. Hormonal changes associated with experimentally produced cystic ovaries in the cow. *J Reprod Fertil.* 47: 203-208.

Nagase H, Okada Y. 1997. Proteinases and matrix degradation. In *Textbook of Rheumatology*, pp 323–341. Ed. W Kelley. Philadelphia: WB Saunders.

Nagase H, Woessner JF Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry.* 274. 31- 21491:21494.

Nakao T, Grünert E. 1990. Effects of dystocia on postpartum adrenocortical function in dairy cows. *J Dairy Sci.* 73: 2801-2806.

Nelson ST, Martin AD, Osteras O. 2010. Risk factors associated with cystic ovarian disease in Norwegian dairy cattle. *Acta Vet Scand.* 52: 60.

Nemeth M, Millesi E, Wagner KH, Wallner B. Effects of Diets High in Unsaturated Fatty Acids on Socially Induced Stress Responses in Guinea Pigs 2014. *PLoS ONE* 9. 12: e116292.

Nett TM, Staigmiller RB, Akbar AM, Diekman MA, Ellinwood WE, Niswender GD. 1976. Secretion of prostaglandin F₂alpha in cycling and pregnant ewes. *J Anim Sci.* 42: 876- 880.

Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. 1998. Active and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-free gelatinase B accumulates within human microvascular endothelial vesicles. *Journal of Biological Chemistry.* 273. 9: 5400-5404.

Nilsson EE, Skinner MK. 2003. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod.* 69: 1265- 1272.

Niswender GD. 1981. Mechanisms controlling luteolysis. En: Schwartz NB, Hunzicker-Dunn M, Dynamics of ovarian function. p 153. Ed. Raven Press, New York.

Noble KM, Tebble JE, Harvey D, Dobson H. 2000. Ultrasonography and hormone profiles of persistent ovarian follicles (cysts) induced with low doses of progesterone in cattle. *J Reprod Fertil.* 120: 361–366.

Nothnick WB, Keeble SC, Curry TE Jr. 1996. Collagenase, gelatinase, and proteoglycanase messenger ribonucleic acid expression and activity during luteal development, maintenance, and regression in the pseudopregnant rat ovary. *Biol Reprod;* 54:616–624.

Nothnick WB, Soloway P, Curry TE Jr. 1997. Assessment of the role of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) during the periovulatory period in female mice lacking a functional TIMP-1 gene. *Biol Reprod* 56. 5: 1181–1188.

Nothnick WB. 2003. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) deficient mice display reduced serum progesterone levels during corpus luteum development. *Endocrinology.* 1: 5-8.

Novoselova TV, Jackson D, Campbell DC, Clark AJ, Chan LF. 2013. Melanocortin receptor accessory proteins in adrenal gland physiology and beyond. *J Endocrinol.* 217: 1-11.

Ny T, Wahlberg P, Brändström IJ. 2002. Matrix remodeling in the ovary: regulation and functional role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems. *Mol Cell Endocrinol.* 187: 29-38. Review.

Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. 1997. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 2446–2451.

Oksjoki S, Rahkonen O, Haarala M, Vuorio E, Anttila L. 2004. Differences in connective tissue gene expression between normally functioning, polycystic and post-menopausal ovaries. *Mol Hum Reprod*; 10:7–14.

Orsi NM, Tribe RM. 2008. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J Neuroendocrinol*. 20: 462-469.

Orsi NM. 2008. Cytokine networks in the establishment and maintenance of pregnancy. *Hum Fertil*. 11: 222-230.

Ortega HH, Marelli BE, Rey F, Amweg AN, Diaz PU, Stangaferro ML, Salvetti NR. 2015. Molecular aspects of bovine cystic ovarian disease pathogenesis. *Reproduction*. 149: 251-264.

Ortega HH, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2008. Insulin-like growth factor I in ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous and induced cystic ovarian disease. *Res Vet Sci*. 84: 419-427.

Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Müller LA, Taboada AF, Manzini RA, Ortega HH. 2007. Valoración de la exposición a luz permanente como modelo de enfermedad quística ovárica (COD) en bovinos. *Rev Med Vet*. 87: 223-226.

Parrott JA, Skinner MK. 1998. Developmental and Hormonal Regulation of Keratinocyte Growth Factor Expression and Action in the Ovarian Follicle. *Endocrinology*. 139: 228- 235.

Passos JRS, Costa JJN, da Cunha EV, Silva AWB, Ribeiro RP, de Souza GB, Barroso PA, Dau AM, Saraiva MV, Gonçalves PB, van den Hurk R, Silva JR. 2016. Protein and messenger RNA expression of interleukin 1 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin 1 β on primordial follicle activation and survival in vitro. *Domest Anim Endocrinol*. 54: 48-59.

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

Peter AT. 2004. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod Domest Anim*. 39: 1-7.

Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. 1997. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol.* 11: 1486-1496.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 29-45.

Phillips DJ, de Kretser DM. 1998. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol.* 19: 287:322.

Phogat JB, Smith RF and Dobson H. 1999. Effect of adrenocorticotrophic hormone ACTH on ovine pituitary gland responsiveness to exogenous pulsatile GnRH and oestradiol-induced LH release in vivo. *Animal Reproduction Science.* 55: 193–203.

Probo M, Comin A, Mollo A, Cairoli F, Stradaioli G, Veronesi MC. 2011. Reproductive performance of dairy cows with luteal or follicular ovarian cysts after treatment with busserelin. *Anim Reprod Sci.* 127: 135-139.

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology.* 44: 915-923.

Puttabyatappa M, Jacot TA, Al-Alem FL, Rosewell KL, Duffy DM, Brännström M, Curry TE, Jr. 2014. Ovarian Membrane-Type Matrix Metalloproteinases: Induction of MMP14 and MMP16 During the Perioovulatory Period in the Rat, Macaque, and Human. *Biol Reprod.* Aug; 91. 2: 34.

Rae MT, Price D, Harlow CR, Critchley HOD, Hillier SG. 2009. Glucocorticoid receptor-mediated regulation of MMP9 gene expression in human ovarian surface epithelial cells. *Fertility and sterility.* August; Volume 92, Issue 2: 703–708.

Rahe CH, Owens RE, Fleeger JL, Newton HJ, Harms PG. 1980. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology.* 107: 498-503.

Rajakoski E. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinol.* 34: 1-68.

Rajala PJ, Gröhn YT. 1998. Disease occurrence and risk factor analysis in Finnish Ayrshire cows. *Acta Vet Scand.* 39: 1-13.

Refsal KR, Jarvin-Maldano JH, Nachreiner RF. 1987. Endocrine profiles in cows with ovarian cysts experimentally induced by treatment with exogenous estradiol or adrenocorticotrophic hormone. *Theriogenology.* 28: 871-889.

Refsal KR, Jarrin-Maldonado JH, Nachreiner RF. 1988. Basal and estradiol-induced release of gonadotrofins in dairy cows with naturally occurring ovarian cysts. *Theriogenology*. 30: 679-693.

Reich R, Daphna Iken D, Chun SY, Popliker M, Slager R, Adelman Grill BC, Tsafiriri A. 1991. Preovulatory changes in ovarian expression of collagenases and tissue metalloproteinase inhibitor messenger ribonucleic acid: role of eicosanoids. *Endocrinology*. 129: 1869–1875.

Reich R, Tsafiriri A, Mechanic GL. 1985. The involvement of collagenolysis in ovulation in the rat. *Endocrinology* 116: 522–52.

Rey F, Rodríguez FM, Salvetti NR, Palomar MM, Barbeito CG, Alfaro NS, Ortega HH. 2010. Insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor binding proteins in bovine cystic ovarian disease. *J Comp Pathol*. 142: 193-204.

Ribadu AY, Nakada K, Moriyoshi M, Zhang WC, Tanaka Y, Nakao T. 2000. The role of LH pulse frequency in ACTH induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim Reprod Sci*. 64: 21-31.

Ribeiro LA, Turba ME, Zannoni A, Bacci ML, Forni M. 2006. Gelatinases, endonuclease and vascular endothelial growth factor during development and regression of swine luteal tissue. *BMC Dev Biol*; 6:58.

Richards JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M, Alliston TN. 1998. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol Cell Endocrinol*. 145. 47-54.

Richards JS. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev*. 5: 725- 751.

Ries C. 2013. Cytokine functions of TIMP-1. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Feb, Vol 71, Issue 4: 659–672.

Riley SC, Gibson AH, Leask R, Mauchline DJ, Pedersen HG, Watson ED. 2001. Secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases into follicular fluid during follicle development in equine ovaries. *Reproduction*; 121:553–560.

Rippe CA. 2009. El ciclo estral. Dairy Cattle Reproduction Council. Dairy Cattle Reproduction Conference. Minneapolis, Minnesota y Boise, Idaho. 111-115

Rispoli LA, Payton RR, Gondro C, Saxton AM, Nagle KA, Jenkins BW, Schrick FN y Edwards JL. 2013. Heat stress effects on the cumulus cells surrounding the bovine oocyte

during maturation: altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. *Reproduction* August 1, 146: 193-207.

Rivera GM, Fortune JE. 2003. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology* 144: 2977-2987.

Robinson T, Sutherland A, Sutherland J. 2007. Validation of candidate bovine reference genes for use with realtime PCR. *Vet Immunol Immunopathol.* 115: 160-165.

Robker RL, Russell DL, Yoshioka S, Sharma SC, Lydon JP, O'Malley BW, Espey LL, Richards JS. 2000a. Ovulation: a multi-gene, multi-step process. *Steroids.* 65: 559-70.

Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, O'Malley BW, Richards JS. 2000b. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl AcadSci USA* 97:4689-4694.

Roche JF, Ireland JJ. 1981. Effect of exogenous progesterone on time of occurrence of the LH surge in heifers. *J Anim Sci.* 52: 580-586.

Roche JF. 1996. Control and regulation of folliculogenesis - a symposium in perspective. *Rev Reprod.* 1: 19-27.

Rodríguez FM, Salvetti NR, Panzani CG, Barbeito CG, Ortega HH, Rey F. 2011. Influence of insulin-like growth factor-binding proteins-2 and -3 in the pathogenesis of cystic ovarian disease in cattle. *Anim Reprod Sci.* 128: 1-10.

Rodríguez FM, Salvetti NR, Colombero M, Stangaferro ML, Barbeito CG, Ortega HH, Rey F. 2013. Interaction between IGF1 and IGFBPs in bovine cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci.* 140: 14-25.

Rodríguez FM, Colombero M, Amweg AN, Huber E, Gareis NC, Salvetti NR, Ortega HH, Rey F. 2015. Involvement of PAPP-A and IGFR1 in Cystic Ovarian Disease in Cattle. *Reprod Domest Anim.* 50: 659-668.

Romaniuk J. 1972. The incidence and treatment of ovarian cysts in cows. *Bull Vet Inst Pulway.* 16: 98-108.

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

Roth Z, Biran D, Lavon Y, Dafni I, Yakobi S, Braw-Tal R. 2012. Endocrine milieu and developmental dynamics of ovarian cysts and persistent follicles in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci.* 95: 1729-1737.

Salvetti NR, Gimeno EJ, Lorente JA, Ortega HH. 2004. Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. *Cell Tissues Organs.* 178: 117-125.

Salvetti NR, Rey F, Ortega H H. 2007a. Enfermedad quística ovárica bovina. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias.* 6: 72-87.

Salvetti NR, Acosta JC, Gimeno EJ, Müller LA, Mazzini RA, Taboada AF, Ortega HH. 2007b. Estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptors in normal bovine ovarian follicles and cystic ovarian disease. *Vet Pathol.* 44: 373-378.

Salvetti NR, Stangaferro ML, Palomar MM, Alfaro NS, Rey F, Gimeno, EJ, Ortega HH. 2010. Cell proliferation and survival mechanisms underlying the abnormal persistence of follicular cysts in bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Anim Reprod Sci.* 122: 98-110.

Salvetti NS, Alfaro NA, Velazquez MML, Amweg A, Matiller V, Díaz PU, Ortega HH. 2012. Alteration in localization of steroid hormone receptors and coregulatory proteins in follicles from cows with induced ovarian follicular cysts. *Reproduction.* 144: 723-735.

Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. 1994. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370: 61-65.

Sato T, Kondo T, Seiki M, Ito A. 1999. Cell type-specific involvement of furin in membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated progelatinase A activation. *Ann N Y Acad Sci.* 878: 713-5.

Sato M, Sugino T, Yoshimura Y, Isobe N. 2011. Follicular persistence induced by adrenocorticotrophic hormone administration in goats. *J Reprod Dev.* 2011 Apr; 57: 212-6.

Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil.* 83: 663-671.

Savio JD, Boland MP, Hynes N, Roche JF. 1990. Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. *J Reprod Fertil.* 88: 569-579.

Savio JD, Thatcher WW, Morris GR, Entwistle K, Drost M, Mattiacci MR. 1993. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing device on follicular turnover and fertility in cattle. *J Reprod Fertil.* 98: 77-84.

Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RM, Debeljuk L, White WF. 1971. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*. 173: 1036-1038.

Schams D, Berisha B. 2002. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*. 23: 53-65.

Schams D, Kohlenberg S, Amselgruber W, Berisha B, Pfaffl MW, Sinowatz F. 2003. Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J Endocrinol*. 177: 305-317.

Schoonmaker JN, Erickson GF. 1983. Glucocorticoid modulation of folliclestimulating hormone-mediated granulosa cell differentiation. *Endocrinology*. 113: 1356-1363.

Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Andrade ER, Binelli M, Oliveira JA, Nascimento AB. 2003. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasoundguided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*. 59: 1435-1440.

Shalev E, Goldman S y Ben-Shlomo I. 2001. The balance between MMP-9 and MMP-2 and their tissue inhibitor (TIMP)-1 in luteinized granulosa cells: comparison between women with PCOS and normal ovulatory women. *Mol. Hum. Reprod*. 7: 325-331.

Silvia WJ, Alter TB, Nugent AM, Laranja da Fonseca LF. 2002. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest Anim Endocrinol*. 23: 167-177.

Sirois J, Fortune JE. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifersmonitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod*. 39: 308-317.

Sirois J, Fortune JE. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*. 127: 916-925.

Sisson S, Grossman JD. 1982. *Anatomía de los animales domésticos*. 5ta Edición. Salvat Editores S.A. Barcelona, España.

Smith DE, Hanna, R, Della Friend, Moore H, Chen H, Farese AM, MacVittie TJ, Virca GD, Sims JE. 2003. The soluble form of IL-1 receptor accessory protein enhances the ability of soluble type II IL-1 receptor to inhibit IL-1 action. *Immunity*. 18: 87-96.

Smith DF, Toft DO. 1994. Steroid receptors and their associated proteins. *MolEndocrinol*. 7: 4-11.

Smith GW, Goetz TL, Anthony RV, Smith MF. 1994. Molecular cloning of an ovine ovarian tissue inhibitor of metalloproteinases: ontogeny of mRNA expression and in situ localization within preovulatory follicles and luteal tissue. *Endocrinology*; 134:344–352.

Smith GW, McCrone S, Petersen SL, Smith MF. 1995. Expression of messenger ribonucleic acid encoding tissue inhibitor of metalloproteinases-2 within ovine follicles and corpora lutea. *Endocrinology*. 136: 570–576.

Smith MF, Ricke WA, Bakke LJ, Dow MP, Smith GW. 2002. Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Mol Cell Endocrinol*. 191: 45-56.

Smith MF, Gutierrez CG, Ricke WA, Armstrong DG y Webb R. 2005. Production of matrix metalloproteinases by cultured bovine theca and granulosa cells. *Reproduction*. January 1, 129 75-87

Spicer LJ, Chamberlain CS. 1998. Influence of cortisol on insulin- and insulin-like growth factor 1 (IGF-1)-induced steroid production and on IGF-1 receptors in cultured bovine granulosa cells and thecal cells. *Endocrine*. 9: 153-161.

Stangaferro ML, Matiller V, Díaz PU, Ortega HH, Rey F, Rodríguez FM, Silva MA, Salvetti NR. 2014. Role of activin, inhibin, and follistatin in the pathogenesis of bovine cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci*. 148: 97-108.

Stassi AF; Belotti EM; Baravalle ME; Salvetti NR; Rey F; Ortega HH. 2015. Evaluación de IL-1 β , il-4 e il-6 en suero y liquido folicular en la enfermedad quística ovarica bovina y durante la persistencia folicular inducida”. *Medicina*. ISSN 0325-6391. Vol. 75.

Sternlicht MD y Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516.

Stilley JAW, Sharpe-Timms KL. 2012. TIMP1 Contributes to Ovarian Anomalies in Both an MMP-Dependent and -Independent Manner in a Rat Model. *Biol Reprod*. 86: 47, 1–10.

Stock AE, Fortune JE. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*. 132: 1108-1114.

Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. 1995. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase: isolation of the

activated form of the membrane metalloprotease. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 5331–5338.

Sunak N, Green DF, Abeydeera LR, Thurston LM, Michael AE. 2007. Implication of cortisol and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the development of porcine (*Sus scrofa domestica*) ovarian follicles and cysts. *Reproduction*. 133: 1149-1158.

Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*. 101: 547–555.

Suzuki K, Lees M, Newlands GF, Nagase H, Woolley DE. 1995. Activation of precursors for matrix metalloproteinases 1 (interstitial collagenase) and 3 (stromelysin) by rat mast-cell proteinases I and II. *Biochem J*. 305: 301-306

Szymanowski A, Nijm J, Kristenson M, Jonasson L. 2011. Elevated levels of circulating matrix metalloproteinase-9 are associated with a dysregulated cortisol rhythm--A case-control study of coronary artery disease. *Psychoneuroendocrinology*. Jan;36:139-143.

Taves MD, Gomez-Sanchez CE, Soma KK. 2011. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Jul;301: 11-24.

Tetsuka M, Nishimoto H, Miyamoto A, Okuda K, Hamano S. 2010. Gene expression of 11 β -HSD and glucocorticoid receptor in the bovine (*Bos taurus*) follicle during follicular maturation and atresia: the role of follicular stimulating hormone. *J Reprod Dev*. 56: 616-622.

Thome R, dos Santos HB, Sato Y, Rizzo E, Bazzoli N. 2010. Distribution of laminin beta2, collagen type IV, fibronectin and MMP-9 in ovaries of the teleost fish. *J Mol Histol*; 41:215–224.

Thurston LM, Jonas KC, Abayasekara DR, Michael AE. 2003a. Ovarian modulators of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) activity in follicular fluid from bovine and porcine large antral follicles and spontaneous ovarian cysts. *Biol of Reprod*. 68: 2157- 2163.

Thurston LM, Chin E, Jonas KC, Bujalska IJ, Stewart PM, Abayasekara DR, Michael AE. 2003b. Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) proteins in luteinizing human granulosa-lutein cells. *J Endocrinol*. 178: 127-135.

Thurston LM, Chin E, Jonas KC, Abayasekara DRE, Michael AE. 2003c. Expression of 11-hydroxysteroid dehydrogenase (11HSD) proteins in luteinizing human granulosa–lutein cells. *J Endocrinol.* 178: 127-135.

Thurston LM, Abayasekara DRE, Michael AE. 2007. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase expression and activities in bovine granulosa cells and corpora lutea implicate corticosteroids in bovine ovarian physiology. *J Endocrinol.* 193: 299-310.

Vanholder T, Leroy JL, Dewulf J, Duchateau L, Coryn M, de Kruif A, Opsomer G. 2005. Hormonal and metabolic profiles of high-yielding dairy cows prior to ovarian cyst formation or first ovulation post partum. *Reprod Domest Anim.* 40: 460-467.

Vanholder T, Opsomer G, De Kruif A. 2006. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nutr Dev.* 46: 105-119.

Velázquez MM, Alfaro NS, Salvetti NR, Stangaferro ML, Rey F, Panzani CG, Ortega HH. 2011. Levels of heat shock protein transcripts in normal follicles and ovarian follicular cysts. *Reprod Biol.* 11: 276-283.

Velázquez MM, Salvetti NR, Amweg AN, Díaz PU, Matiller V, Ortega HH. 2013. Changes in the expression of Heat Shock Proteins in ovaries from bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Res Vet Sci.* 95: 1059-1067.

Visse R, Nagase H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 92. 8: 827–839

Vu TH, Werb Z. 2000. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes and Development.* 14:2123–2133.

Vukelic S, Stojadinovic O, Pastar I, Rabach M, Krzyzanowska A, Lebrun E, Davis SC, Resnik S, Brem H, Tomic-Canic M. 2011. Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury. *J Biol Chem.* Mar 25;286. 12:10265-75.

Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci.* 82:63-74.

Weck J, Fallest PC, Pitt LK, Shupnik MA. 1998. Differential gonadotropin-releasing hormone stimulation of rat luteinizing hormone subunit gene transcription by calcium influx and mitogenactivated protein kinase-signaling pathways. *Mol Endocrinol.* 12: 451-457.

Wiltbank JN. 1966. Modification of ovarian activity in the bovine following injection of oestrogen and gonadotrophin. *Reprod Fert.* 1: 1-10.

Wiltbank M, Gümen A, Sartori R. 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*. 57: 21-52.

Winters TA, Cook DL, Callahan CJ, Allrich RD. 1986. Induction of ovarian cysts in cattle by injection of progesterone and oestradiol-17 β . *J Anim Sci*. 63:361 (abstract).

Witkin SS, Linhares IM, Bongiovanni AM, Herway C, Skupski D. 2011. Unique alterations in infection-induced immune activation during pregnancy. *BJOG*. 118: 145-153.

Woessner JF, Nagase H. 2000. *Matrix metalloproteinases and TIMPs*. Oxford University Press, New York. P 223.

Woods AM, Judd AM. 2008. Interleukin-4 increases cortisol release and decreases adrenal androgen release from bovine adrenal cells. *Domest Anim Endocrinol*. 34: 372-382.

Xing Y, Parker CR, Edwards M, Rainey WE. 2010. ACTH is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells. *J Mol Endoc*. 45: 59-68.

Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod*. 53: 951-957.

Yang EV, Bane CM, MacCallum RC, Kiecolt-Glaser JK, Malarkey WB, Glaser R.J. 2002 Stress-related modulation of matrix metalloproteinase expression. *Neuroimmunol. Dec*;133: 144-50.

Yong PY, Harlow C, Thong KJ, Hillier SG. 2002. Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression in human ovarian surface epithelial cells by interleukin-1. *Hum Reprod*; 17: 2300–2306.

Yoshida CH y Nakao T. 2005. Response of plasma cortisol and progesterone after acth challenge in ovariectomized lactating dairy cows. *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 51, No. 1.

Yoshioka K, Iwamura S, Kamomae H. 1996. Ultrasonic observations on the turnover of ovarian follicular cysts and associated changes of plasma LH, FSH, progesterone and oestradiol-17 β in cows. *Res Vet Sci*. 61: 240-244.

Youngquist RS. 1986. Cystic follicular degeneration in the cow. In: Morrow D (Ed), *Current therapy in Theriogenology*, 2nd ed, WB Saunders Co, Philadelphia. 243-246.

Zaied AA, Garverick HA, Kesler DJ, Bierschwal CJ, Elmore RJ, Younquist RS. 1981. Luteinizing hormone response to estradiol benzoate in cows with ovarian cyst. *Theriogenology*. 16: 349-358.

Zhang B, Moses MA y Tsang Paul CW. 2003. Temporal and spatial expression of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1 and -2) in the bovine corpus luteum. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1:85.

Zhao Y, Luck MR. 1996. Bovine granulosa cells express ECM proteins and their regulators during luteinization in culture. *Reprod Fertil Dev*; 8:259–226.

Zhu G, Kang L, Wei Q, Cui X, Wang S, Chen Y y Jiang Y. 2014. Expression and regulation of MMP1, MMP3, and MMP9 in the chicken ovary in response to gonadotropins, sex hormones, and TGFB1. *Biology of Reproduction*, Volume 90, Issue 3, 1; 57, 1-11.

Zolti M, Meiom R, Shemesh M. 1990. Granulosa cells as a source and target organ for tumor necrosis factor-alpha. *FEBS Lett*; 261:253–255

Zuber MX, John ME, Okamura T, Simpson ER, Waterman MR. 1986. Bovine adrenocortical cytochrome P-450(17 alpha). Regulation of gene expression by ACTH and elucidation of primary sequence. *J Biol Chem*. Feb 15;261. 5:2475-82.