



**Universidad Nacional del Litoral**  
***Facultad de Ciencias Veterinarias***

*Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA),  
Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet Litoral), UNL-CONICET  
Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL*

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

***Programación fetal durante la preñez en vacas  
lecheras: influencia de factores ambientales sobre la  
fertilidad de la progenie y su relación con la expresión y  
regulación de receptores de hormonas esteroideas en el  
ovario***

**Autor: Med. Vet. Ulises Sebastián Notaro**

**Directora: Dra. Natalia R. Salvetti**

**Codirectora: Dra. Fernanda Rodríguez**

**- 2020 -**

*“Una persona va al saber como a la guerra: bien despierta, con miedo, con respeto y con absoluta confianza”*

*Don Juan Mathus*

*Dedico este trabajo*

*A toda mi familia por su amor e incondicionalidad*

## **Agradecimientos**

A cada uno de los miembros de mi familia, por estar siempre a mi lado y por transmitirme los valores necesarios para desempeñarme en la vida

A Angie, por su amor, por ser mi gran compañera incondicional, por enseñarme a confiar en mí

A mis amigos Mati y Pablo, por guiarme desde el comienzo y durante el transcurso de este aprendizaje

A mis directoras Nati y Fer, por su completa predisposición, paciencia y tiempo para atender mis inquietudes

A Hugo, por su confianza y exigencia

A Seba, por su voluntad incansable

A Chelo Signorini, por escuchar pacientemente mis consultas

A mis compañeros y compañeras del Laboratorio de Histopatología, Centro de Medicina Comparada y Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, porque cada uno y cada una aportaron algo para mi formación

A mis amigos y amigas, por darme las palabras y energías diarias para continuar motivado

A la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja (UNL), INTA Rafaela y los establecimientos La Erminda, Tamberitos, La Cabañita, La Lilia y San Ramón, por permitirme incluir los animales en el modelo experimental de este trabajo

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, por brindarme la formación tanto de grado como de posgrado, ratificando la importancia de la educación pública

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por su contribución necesaria para el desarrollo de este trabajo

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por darme la beca para finalizar mis estudios.

# ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
Resumen.....	viii
Abstract .....	ix
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 PROGRAMACIÓN FETAL Y EPIGENÉTICA .....	2
1.1.1 Programación fetal.....	2
1.1.2 Epigenética .....	3
1.2 FISIOLÓGÍA DEL OVARIO .....	6
1.2.1 El ovario.....	6
1.2.2 Desarrollo embrionario y reserva folicular .....	8
1.2.3 Recuento de folículos antrales, AMH y fertilidad .....	9
1.2.4. Clasificación folicular.....	12
1.2.5 Ciclo estral bovino y su regulación endócrina.....	13
1.3 INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA REPRODUCCIÓN .....	15
1.3.1 Estrés .....	15
1.3.2 Estrés por calor.....	16
1.3.3 Efectos del estrés sobre la reproducción .....	18
1.3.4 Influencia del estrés por calor sobre la eficiencia reproductiva .....	18
1.3.5 Efectos del estrés prenatal en el feto .....	20
1.4 HORMONAS ESTEROIDES, SUS RECEPTORES Y PARTICIPACIÓN DE CORREGULADORES..	21
1.4.1 Hormonas esteroides y su mecanismo de acción .....	21
1.4.2 Correguladores.....	26
1.5 HIPÓTESIS .....	30
2. OBJETIVOS .....	31
2.1 Objetivo general.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3. MATERIALES Y METODOS.....	33
3.1 Aspectos éticos.....	34
3.2 Animales.....	34
3.3 Criterios de selección y grupos .....	34
3.4 PROCEDIMIENTOS CON ANIMALES.....	35
3.4.1 Sincronización del ciclo estral .....	35

3.4.2 Seguimiento de los animales y recuento de folículos antrales.....	36
3.5 Obtención de muestras.....	37
3.5.1 Muestras de sangre.....	38
3.5.2 Muestras de aspirado folicular.....	38
3.5.3 Muestras de ovarios completos.....	39
3.6 PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	40
3.6.1 Destino de cada muestra.....	42
3.6.2 Procesamiento de muestras para PCR en tiempo real.....	43
3.6.3 Procesamiento de muestra para evaluación de modificaciones epigenéticas.....	44
3.6.4 Procesamiento histológico para la técnica de inmunohistoquímica.....	45
3.7 CUANTIFICACIÓN HORMONAL.....	45
3.7.1 Determinación de 17 $\beta$ estradiol, progesterona, testosterona.....	45
3.7.2 Determinación de AMH (hormona anti-mülleriana).....	46
3.8 ANÁLISIS DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA.....	46
3.8.1 Evaluación de la expresión génica de los receptores de estrógenos $\alpha$ , $\beta$ y de progesterona.....	46
3.8.2 Evaluación de modificaciones epigenéticas.....	49
3.10 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DEL REA, REB Y RP Y LOS CORREGULADORES SRC-1, LCOR, RIP-140, REA-330 Y SMRT.....	53
3.10.1 Evaluación de la especificidad de los anticuerpos primarios.....	53
3.10.2. Técnica de inmunohistoquímica indirecta para la detección y cuantificación de la expresión proteica.....	56
3.10.3. Análisis digital de imágenes.....	58
3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	58
3.11.1 Variables independientes analizadas.....	59
3.11.2 Variables de respuesta analizadas.....	59
4. RESULTADOS.....	61
4.1 VALORES HORMONALES SISTÉMICOS Y RECuento DE FOLÍCULOS ANTRALES.....	62
4.2 CONCENTRACIONES DE HORMONAS INTRAFOLICULARES.....	63
4.3 EXPRESIÓN DE RE $\alpha$ , RE $\beta$ Y RP.....	65
4.3.1 Expresión génica del RE $\alpha$ , RE $\beta$ y RP y estado de metilación global del ADN.....	65
4.3.2. Estado de metilación de la región promotora de los RE $\alpha$ y RE $\beta$ .....	66
4.3.3. Expresión proteica del receptor de estrógenos ( $\alpha$ y $\beta$ ) y progesterona.....	71
4.4 EXPRESIÓN PROTEICA DE LAS PROTEÍNAS CORREGULADORAS.....	75
4.4.1 Coactivadores.....	75
4.4.2 Correpretores.....	77
5. DISCUSIÓN.....	83

5.1 INFLUENCIA DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE LA PROGRAMACIÓN FETAL DE PARÁMETROS DE FERTILIDAD.....	85
5.2 INFLUENCIA DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE LA PROGRAMACIÓN FETAL: EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES EN LOS FOLÍCULOS PREEVULATORIOS Y SU REGULACIÓN EPIGENÉTICA .....	89
5.3 INFLUENCIA DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE LA PROGRAMACIÓN FETAL: EXPRESIÓN PROTEICA DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES EN LOS FOLÍCULOS PREEVULATORIOS.....	93
5.4 INFLUENCIA DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE LA PROGRAMACIÓN FETAL: EXPRESIÓN DE LOS CORREGULADORES EN LOS FOLÍCULOS PREEVULATORIOS .....	98
6. CONCLUSIONES .....	105
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	107

## ABREVIATURAS

- ITH:** Índice de temperatura y humedad
- RE:** Receptor de estrógenos
- RP:** Receptor de progesterona
- CpG:** dinucleótido Citosina Guanina unido por fosfato
- 5'UTR:** región no traducida
- ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- ARN:** Ácido Ribonucleico
- ARNm:** Ácido Ribonucleico mensajero
- RFA:** recuento de folículos antrales
- AMH:** Hormona Anti Mülleriana
- TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta
- Da:** Dalton
- pb:** pares de bases
- ALK:** Receptor de quinasa similar a la activina
- BMP:** Proteína morfogénica ósea
- FSH:** Hormona folículoestimulante
- LH:** Hormona luteinizante
- GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas
- P4:** progesterona
- E2:** 17 $\beta$ -estradiol
- PGF2 $\alpha$ :** prostaglandina F2 alfa
- FD:** folículo dominante
- CL:** cuerpo lúteo
- ACTH:** Hormona adrenocorticotrópica
- ERE:** elementos de respuesta a estrógenos
- COD:** enfermedad quística ovárica
- SRC-1:** Coactivador de receptores esteroides

**RIP-140:** proteína interactuante con receptor

**LCoR:** correpresor dependiente de ligando

**REA:** represor de la actividad del receptor de estrógenos

**SMRT:** mediador silenciador del ácido retinoico y del receptor de la hormona tiroidea

**SERM:** modulador selectivo de receptores de estrógeno

**P1:** periodo 1 de gestación (0-150 días)

**P2:** periodo 2 de gestación (151 días-nacimiento)

**T1:** trimestre 1 de gestación

**T2:** trimestre 2 de gestación

**T3:** trimestre 3 de gestación

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**B2M:**  $\beta$ -2 microglobulina

**Ct:** ciclo umbral

**ADNg:** ADN genómico

**ADNc:** ADN copia

**MS-MALDI-TOF:** espectrometría de masas con detector MALDI-TOF

**WB:** western blot

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

**RIPA:** radioinmunoprecipitación

**TBS-T:** Tris buffer salino con 0,05% de Tween 20

**PBS:** Buffer fosfato salino

**BSA:** Albúmina sérica bovina

**DAB:** 3-3'-diaminobencidina

**IHQ:** Inmunohistoquímica

**LF:** líquido folicular

**ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**ECLIA:** Inmunoensayo de electroquimioluminiscencia

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Pares de cebadores utilizados en PCR en tiempo real. Nº de acceso correspondiente a cada gen, secuencias sentido y antisentido (5' 3') de los oligonucleótidos, tamaño de los fragmentos amplificados y temperaturas de anillado. ....	48
<b>Tabla 2.</b> Especificidad de los anticuerpos primarios utilizados en IHQ.....	55
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos utilizados, dilución y tipo de recuperación antigénica utilizada en cada caso para la técnica de inmunohistoquímica indirecta.....	57
<b>Tabla 4.</b> Variables independientes relativas al estrés por calor y cálculo de las mismas. Ciclos: 3 o más días consecutivos con ITH>72.....	59
<b>Tabla 5.</b> Asociación entre la exposición a estrés por calor en las diferentes etapas de la gestación y las concentraciones hormonales sistémicas y RFA en las hijas durante la vida adulta. Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla). ....	62
<b>Tabla 6.</b> Asociación entre la exposición a estrés por calor en las diferentes etapas de la vida intrauterina y las concentraciones hormonales y AMH en líquido folicular (LF). Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).....	64
<b>Tabla 7.</b> Asociación entre la exposición a estrés por calor en las diferentes etapas de vida fetal y la expresión génica del RE $\alpha$ , RE $\beta$ , RP y el estado de metilación global del ADN. Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).....	66
<b>Tabla 8.</b> Asociación entre la exposición a ITH elevado en las distintas etapas de gestación y el estado de metilación de distintas posiciones CpG (CpG1 a CpG7) dentro de la región promotora del RE $\alpha$ . Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).....	67
<b>Tabla 9.</b> Asociación entre la exposición a estrés por calor en las distintas etapas de vida fetal y el estado de metilación de distintas posiciones CpG (CpG8-CpG17) dentro de la región promotora del RE $\alpha$ . Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).....	68
<b>Tabla 10.</b> Asociación entre la exposición a ITH elevado en las distintas etapas de la gestación y el estado de metilación de distintas posiciones CpG (CpG1 a CpG7) dentro de la región promotora del RE $\beta$ . Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando	

es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla)..... 70

**Tabla 11.** Asociación entre la exposición a ITH elevado en las distintas etapas de la gestación y el estado de metilación de distintas posiciones CpG (CpG8 a CpG13) dentro de la región promotora del RE $\beta$ . Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla)..... 71

**Tabla 12.** Asociación entre la exposición a estrés por calor en distintas etapas de la gestación y la expresión proteica de RE $\alpha$ , RE $\beta$  y RP en células de la granulosa (G) y de la teca interna (TI). Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla). . 74

**Tabla 13.** Asociación entre la exposición a ITH elevado en distintas etapas de la gestación y la expresión proteica de SRC-1 en células de la granulosa y de la teca. Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla). ..... 76

**Tabla 14.** Asociación entre la exposición a estrés por calor en distintas etapas de la gestación y la expresión proteica de RIP-140 y LCoR en células de la granulosa (G) y de la teca interna (TI). Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla). . 78

**Tabla 15.** Asociación entre la exposición a estrés por calor en distintas etapas de vida intrauterina y la expresión proteica de REA y SMRT en células de la granulosa (G) y de la teca interna (TI). Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla)..... 81

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representativo de los diferentes mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica del ADN. a) Metilación de citosinas en dinucleótidos CpG; b) Modificaciones de histonas presentes en los nucleosomas, que incluyen metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitinación, entre otras, que regulan el grado de compactación de los mismos; c) ARN no codificantes. Adaptado de Zaidi y col. (2010). ..... 4
- Figura 2.** Esquema representativo del ovario bovino con sus diferentes estructuras. Adaptado de König y Liebich (2011). ..... 7
- Figura 3.** Sucesión temporal de las etapas del desarrollo reproductivo en diferentes especies de mamíferos. Adaptado de Monniaux y col. (2014)..... 9
- Figura 4.** Vía de señalización de AMH. AMHRII es el receptor tipo II específico. El receptor tipo I corresponde a ALK-5. SMAD-1 fosforilado (F) interacciona con SMAD-4 y estos con cofactores (C) en el interior nuclear sobre genes específicos. Adaptado de Josso y col. (2013). ..... 11
- Figura 5.** Etapas de las fases folicular y lútea del ciclo estral bovino y las concentraciones hormonales de  $17\beta$ -estradiol (E2) y progesterona (P4) durante el mismo. La línea vertical amarilla indica el día de la ovulación. Adaptado de Peter y col. (2009). ..... 14
- Figura 6.** Mecanismos de señalización genómico en respuesta a estrógenos. Los estrógenos (E) se unen a su receptor ( $RE\alpha/\beta$ ), previa disociación de las chaperonas (Hsp), tras lo cual se dimerizan y se traslocan al núcleo induciendo cambios transcripcionales en presencia o no de elementos de respuesta a estrógenos (ERE). Por su parte, el mecanismo no genómico involucra un receptor de membrana (GPER) que produce cambios citoplasmáticos tales como producción de segundos mensajeros o apertura de canales iónicos de membrana, luego de su unión al ligando (E). Adaptado de Fuentes y Silveyra (2019)..... 22
- Figura 6.** Complejo de coreguladores. La regulación de la actividad transcripcional requiere de la acción de múltiples complejos proteicos que pueden ser reclutados de manera conjunta. Adaptado de Glass y Rosenfeld (2000). ..... 26
- Figura 8.** Protocolo de sincronización de celos utilizado, adaptado del protocolo G6G seguido de Ovsynch (Bello y col., 2006; Díaz y col., 2015). ..... 36
- Figura 9.** Imágenes representativas de ovarios bovinos (A y B) durante la evaluación por ultrasonografía donde se observa la presencia de folículos antrales (flecha blanca). ..... 37
- Figura 10.** Técnica de extracción sanguínea a través de la punción de los vasos coccígeos. .... 38
- Figura 11.** Técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonografía utilizando una sonda transvaginal. A) Técnica de aspiración folicular mediante una guía acomplada a una bomba de vacío. B) Imagen ultrasonográfica del folículo preovulatorio previo a su aspiración. C) Tuvo cónico con la muestra de líquido folicular obtenido por aspiración..... 39
- Figura 7.** Técnica de ovariectomía bilateral por flanco izquierdo. A) Ultrasonografía transrectal para confirmar la presencia del folículo preovulatorio. B) Imagen ultrasonográfica del folículo preovulatorio. C) Instrumental utilizado para la cirugía. D) Ligadura de los vasos adyacentes a los ovarios. E) Ovario sujetado por la pinza hemostática previo a ser retirado. F) Sutura de las capas musculares de la pared abdominal y la piel..... 40

**Figura 8.** Procesamiento de ovarios. A) Material para procesamiento utilizado a campo. B) Par ovárico obtenido listo para su procesamiento. C) Ovarios en formol bufferado para su fijación y utilización en técnicas histológicas, previa obtención de líquido y una porción de pared folicular del foliculo preovulatorio para técnicas moleculares. .... 42

**Figura 9.** Gráfico de la técnica EpiTYPER. El ADN<sub>g</sub> es amplificado por PCR utilizando cebadores específicos a través de un promotor T7 luego de ser tratado con bisulfito. El producto de PCR es transcripto *in vitro* y el ARN resultante es segmentado (clivaje) en cada U de manera sitio-específico. Los fragmentos obtenidos presentan diferentes tamaños y son analizados por MS-MALDI-TOF, obteniendo así un patrón de señal específico para cada masa. La señal roja corresponde al ADN<sub>g</sub> no metilado y la señal amarilla al ADN<sub>g</sub> metilado. El fragmento #1 presenta dos sitios CG contiguos, de manera tal que al encontrarse ambos metilados o no, los fragmentos obtenidos mostrarán una diferencia en la señal de masa de 32 Da. Mientras que para los fragmentos #2 y #3 la diferencia de masas es de 16 Da ya que ambos tienen sólo un sitio de metilación. Adaptado de Ehrich y col. (2005). .... 51

**Figura 10.** Esquema representativo de amplicones diseñados para evaluar el estado de metilación de la región 5'-UTR del gen del ER $\alpha$ . La línea horizontal representa la secuencia nucleotídica de la región a evaluar. Las líneas verticales azules representan CpGs que se pueden evaluar, y las líneas verticales rojas representan CpGs que no se pueden evaluar debido a la proximidad entre ellas. Las líneas horizontales numeradas del 1 al 22 representan los amplicones diseñados por la Universidad de Valencia, abarcando distintas secciones de la región de interés. Esquema provisto por el Laboratorio de Epigenética y Cromatina (INCLIVA, en la Universidad de Valencia, España), obtenido del sitio <http://www.epidesigner.com/> (Agena Biosciences, USA). Los cebadores elegidos para el análisis fueron el 1, 14 y 21. .... 52

**Figura 11.** Esquema representativo de amplicones diseñados para evaluar el estado de metilación de la región 5'-UTR del gen del ER $\beta$ . La línea horizontal representa la secuencia nucleotídica de la región a evaluar. Las líneas verticales azules representan CpGs que se pueden evaluar, y las líneas verticales rojas representan CpGs que no se pueden evaluar debido a la proximidad entre ellas. Las líneas horizontales numeradas del 1 al 18 representan los amplicones diseñados por la Universidad de Valencia, abarcando distintas secciones de la región de interés. Esquema provisto por el Laboratorio de Epigenética y Cromatina (INCLIVA, en la Universidad de Valencia, España), obtenido del sitio <http://www.epidesigner.com/> (Agena Biosciences, USA). Los cebadores elegidos para el análisis fueron el 11,16 y 18. .... 53

**Figura 12.** Imagen representativa de la posición de los sitios CpG (representados por las barras blancas) cuyo nivel de metilación fue analizado, en las regiones promotoras del RE $\alpha$  (A) y RE $\beta$  (B), respectivamente. En color rojo los amplicones utilizados para evaluar el grado de metilación de las CpG. .... 68

**Figura 13.** Imágenes representativas de inmunomarcación en folículos preovulatorios. A) RE $\alpha$  (*Receptor de Estrógenos alfa*); B) RE $\beta$  (*Receptor de Estrógenos beta*); C) RP (*Receptor de progesterona*); D) Control negativo. G (granulosa), T (teca). Barra = 25um. .... 72

**Figura 19.** Imagen representativa de inmunomarcación en folículo preovulatorio para SRC-1 (A). (*Steroid receptor coactivator*; coactivador). Control Negativo (B) G (granulosa), T (teca). Barra=25um. .... 75

**Figura 14.** Imágenes representativas de inmunomarcación en folículos preovulatorios. A) RIP-140 (*Receptor interacting protein 140*; correpresor); B) LCoR (*Ligand dependent corepressor*; correpresor); C) REA (*Repressor of estrogen receptor activity*; correpresor); D) SMRT (*Silencing*

*mediator of retinoid and thyroid hormone receptor; correpresor*; G (granulosa), T (teca).  
Barra=25um..... 77

## Resumen

El estrés por calor en vacas gestantes es capaz de inducir modificaciones epigenéticas en el embrión en desarrollo, que luego se manifestarán en variaciones en el animal adulto y en su descendencia. Existe evidencia que indica que las hormonas esteroides de origen fetal juegan un importante rol en la regulación de la formación y desarrollo de los folículos primordiales y posterior inicio del crecimiento folicular. Considerando que las hormonas esteroides producen sus acciones a través de su unión a los receptores nucleares específicos y que sus acciones están reguladas por correguladores de la transcripción es que nos propusimos como objetivo de esta tesis estudiar los niveles de expresión de los receptores de hormonas esteroides y correguladores transcripcionales asociados, así como probables modificaciones epigenéticas en vacas que fueron gestadas bajo distintas situaciones ambientales. Pudieron determinarse varias asociaciones entre las variables relacionadas con el ITH y la expresión de los receptores y correguladores. Del mismo modo se determinaron asociaciones entre las variables relacionadas con el estrés por calor durante la gestación con modificaciones epigenéticas en los receptores de estrógenos. Se observó una asociación positiva entre el índice de exposición a valores de ITH iguales o superiores a 72 y la expresión génica del RP durante el segundo trimestre de gestación, no así entre las variables referentes a estrés por calor y la expresión génica de los RE $\alpha$  y  $\beta$ . Esto permite suponer que dichas variaciones pueden deberse tanto a diferencias en los patrones de metilación de los sitios o “islas” CpG ubicados en la región 5'UTR de los receptores como a la relación entre estos, el ADN y las proteínas correguladoras. Debemos tener en cuenta que, además de la metilación del ADN, existen otras modificaciones epigenéticas que también podrían desempeñar un papel fundamental en la regulación de la expresión génica. En nuestros resultados se exponen los primeros indicios de un eventual efecto del estrés por calor en la programación fetal en vacas lecheras. Así, consideramos este trabajo como un punto de inicio para investigaciones futuras en este aspecto y lograr comprender los mecanismos implicados en la funcionalidad ovárica y la fertilidad en vacas lecheras.

## Abstract

Heat stress in pregnant cows is capable of inducing epigenetic modifications in the developing embryo, which will later manifest in variations in the adult animal and its offspring. There is evidence indicating that steroid hormones of fetal origin play an important role in regulating the formation and development of primordial follicles and subsequent initiation of follicular growth. Considering that steroid hormones produce their actions through their binding to specific nuclear receptors and that their actions are related to co-regulators of transcription, the objective of this thesis was to study the expression levels of steroid hormone receptors and associated transcriptional co-regulators, as well as probable epigenetic modifications in cows that were gestated under different environmental situations. Several associations could be determined between variables related to ITH and the expression of receptors and co-regulators. Similarly, associations were determined between variables related to heat stress during pregnancy and epigenetic modifications in estrogen receptors. A positive association was observed between the index of exposure to ITH values equal to or greater than 72 and the gene expression of RP during the second trimester of gestation, but not between the variables referring to heat stress and the gene expression of RE $\alpha$  and  $\beta$ . This allows us to suppose that these variations may be due both to differences in the methylation patterns of the CpG sites or "islands" located in the 5'UTR region of the receptors and to the relationship between them, the DNA and the co-regulatory proteins. We must bear in mind that, in addition to DNA methylation, there are other epigenetic modifications that were not studied in this study but that could also play a fundamental role in the regulation of gene expression. In our results, the first indications of a possible effect of heat stress on fetal programming in dairy cows are exposed. Thus, we consider this work as a starting point for future research in this regard and to understand the mechanisms involved in ovarian functionality and fertility in dairy cows.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 PROGRAMACIÓN FETAL Y EPIGENÉTICA

### 1.1.1 Programación fetal

Durante el periodo prenatal el genoma de un individuo se programa para expresar diferentes genes en tejidos y en momentos específicos de su vida (Probst y col., 2009). Sin embargo, modificaciones como la nutrición, el estrés o presencia de enfermedades en la hembra gestante (Gabory y col., 2011; Evans y col., 2012; Mossa y col., 2013) pueden alterar dicha expresión ocasionando cambios en la progenie que pueden impactar a largo plazo en la vida adulta.

Actualmente se utilizan varios términos para referirse a este concepto, incluyendo programación del desarrollo, programación fetal, y orígenes en el desarrollo de la salud y enfermedad. Los primeros indicios del fenómeno de programación fetal surgen de la hipótesis planteada por David Barker, que propone que la salud en la vida adulta es afectada por las condiciones del útero gestante y la infancia temprana (Barker y col., 1993; Barker, 1998; Barker, 1999). Desde ese momento, gran cantidad de evidencia experimental y epidemiológica en distintas especies de mamíferos han confirmado fehacientemente la hipótesis de que un ambiente adverso en el útero, durante el desarrollo temprano, es capaz de programar la fisiología y la patofisiología en la etapa posnatal (Fan y col., 2013; Zhang y col., 2009; Evans y col., 2012). Se denomina programación fetal al conjunto de estímulos recibidos durante la vida intrauterina capaces de interferir en el desarrollo fetal y tener consecuencias permanentes en la vida adulta (Barker y col., 1993a; Lucas y col., 1999; Drake y Walker, 2004; Abruzzese y col., 2018). Se ha demostrado que diversos factores pueden reprogramar el desarrollo fetal produciendo efectos a largo plazo en la edad adulta de distintas especies. En este sentido se pueden destacar alteraciones nutricionales (Roseboom y col., 2001) y tabaquismo en humanos (Bruin y col., 2010), hipoxia (Bae y col., 2003) y exposición a toxinas en ratas (Meyer y col., 2009) o a hormonas esteroides en ovejas (Ortega y col., 2009). El nivel nutricional de la madre es uno de los principales factores involucrados en la programación fetal. Tanto la subnutrición (Roseboom y col., 2011) como la sobrenutrición (Samuelsson y col., 2008) pueden impartir cambios en la progenie. La restricción nutricional en la gestación se define como una serie de eventos que reduce la disponibilidad de nutrientes para el feto. Dicha restricción puede ser resultado de

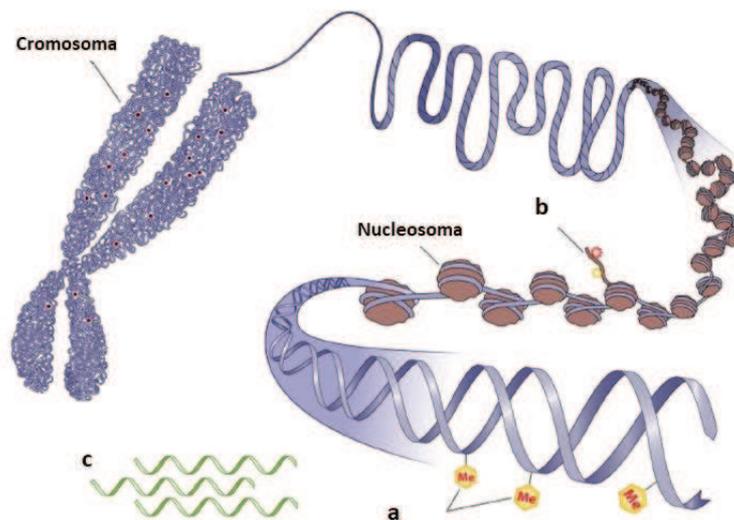
alteraciones en la nutrición materna, insuficiencia placentaria, irregularidades en el metabolismo o fisiología, o bien por cuestiones ambientales, entre otras. Una evidencia clara del efecto de estas restricciones se ha demostrado con la “Hambruna del invierno holandés”, que consistió en el bloqueo que sufrió una parte de la población holandesa durante la Segunda Guerra Mundial durante cinco meses que impidió la llegada de alimentos a la ciudad y ocasionó que gran parte de la población muriera. Dentro de los sobrevivientes, muchas mujeres embarazadas tuvieron hijos que, luego se determinó, padecieron en mayor proporción enfermedades cardiovasculares, metabólicas y neurológicas.

En los sistemas de producción animal las causas más comunes de restricción nutricional incluyen el manejo incorrecto de las hembras preñadas y las condiciones ambientales adversas a las que están expuestas durante la preñez que provocan estrés (Stalker y col., 2006; Cline y col., 2009).

### **1.1.2 Epigenética**

Mientras que las alteraciones genéticas son casi imposibles de revertir, las alteraciones epigenéticas pueden responder a señales físicas, biológicas o sociales del entorno de manera dinámica (Bollati y Baccarelli, 2010; Davies, 2012; Costenbader, 2011). Es así que las condiciones fenotípicas no pueden ser explicadas únicamente por cambios en la secuencia de ADN, ya que la heredabilidad no se limita solamente a la transmisión de información genética contenida en ella. El término epigenética, del griego “epi”, significa “por sobre la genética”, fue acuñado por primera vez por Conrad Waddington en 1942 para describir “la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos, los cuales modifican la expresión fenotípica en diferentes organismos” (Waddington, 1942). Hoy en día la epigenética es comúnmente definida como el estudio de los cambios heredables en la función génica que ocurren sin modificación de la secuencia de ADN (Chen y Zhang, 2011; Dupont y col., 2012; Chavette-Palmer y col., 2018). Durante el desarrollo embrionario se adquieren patrones epigenéticos que resultan en la expresión en células diploides de un grupo de genes heredados del cromosoma materno o paterno. Esto se conoce como impronta

genómica o imprinting (Barlow, 2011; Christophersen y Helin, 2010). Las marcas epigenéticas incluyen : 1) metilación del ADN, que refiere a la metilación de citosina en dinucleótidos CpG y se la asocia generalmente con el silenciamiento de la expresión génica; 2) modificación de histonas, que implica modificaciones postraslacionales de restos de aminoácidos en proteínas centrales de histonas, incluyendo acetilación y metilación de lisinas; algunas de estas modificaciones (marcas permisivas de histonas) hacen a las regiones regulatorias de genes más accesibles a la unión de factores de transcripción e incrementan la expresión génica, mientras que otras, por el contrario, disminuyen la accesibilidad e inhiben la expresión génica; y 3) ARN no codificante, que incluye ARNs funcionales que no codifican para proteínas pero que generalmente inhiben la expresión de otro genes. Los ARNs no codificantes se clasifican de acuerdo a su tamaño en: micro ARN (miARNs), los cuales se componen de 21-25 nucleótidos; pequeños ARN, de 100-200 nucleótidos; y ARN largos, de >200-10000 nucleótidos (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema representativo de los diferentes mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica del ADN. a) Metilación de citosinas en dinucleótidos CpG; b) Modificaciones de histonas presentes en los nucleosomas, que incluyen metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitinación, entre otras, que regulan el grado de compactación de los mismos; c) ARN no codificantes. Adaptado de Zaidi y col. (2010).

Los tres mecanismos mencionados cooperan entre sí modificando la estructura de la cromatina y regulando la expresión génica (Lasalle y col., 2013; Kelly y Trasler, 2004; Pastor y col., 2013; Bannister y Kouzarides, 2011; Sabin y col., 2013; Voigt y col., 2013).

Estas modificaciones epigenéticas (marcas) pueden determinar si partes del cromosoma se encuentran agrupados de manera más compacta o más laxa, lo cual establecerá que un gen se encuentre "encendido" o "apagado".

### **1.1.2.1 Metilación del ADN**

La marca epigenética más estudiada es la metilación de la citosina en el ADN o 5metilC. En los mamíferos, casi todas las 5metilC se encuentran en sitios donde las citosinas están unidas a guaninas (dinucleótidos CpG) (Illingworth y Bird, 2009). La mayor parte del genoma de los mamíferos presenta un número reducido de dinucleótidos CpG, excepto en "islas" CpG que usualmente se colocan en alta cantidad en regiones de promotores de aproximadamente la mitad de todos los genes que codifican para proteínas (Takai y Jones, 2002; Illingworth y Bird, 2009). La metilación de islas CpG en regiones promotoras habitualmente se asocian a silenciamiento génico (Illingworth y Bird, 2009; Jones, 2012; Cedar y Bergman, 2012). La hipermetilación de pares CpG en regiones reguladoras de los genes provoca una disminución en la expresión génica. Esto puede ocurrir por mecanismos directos o indirectos. En mecanismos directos, la metilación de un sitio CpG presente en un sitio de reconocimiento de un factor de transcripción, impide el reconocimiento del sitio y por lo tanto inhibe la unión de dicho factor de transcripción. En mecanismos indirectos, la metilación conlleva a la formación de un complejo multiproteico de represión que induce cambios en la acetilación de histonas, interfiriendo con la estructura general de la cromatina y, consecuentemente, con la accesibilidad de los factores de transcripción (Levine y col., 1992; Razin, 1998; Meaney y col., 2007). Por el contrario, la hipometilación de regiones regulatorias de los genes usualmente se asocia con una estructura de la cromatina transcripcionalmente activa (Weaver y col., 2004).

La metilación es crucial para el desarrollo en los mamíferos (Smith y Meissner, 2013). Ésta es requerida para la expresión de alelos específicos de genes establecidos, la represión transcripcional de retrotransposones (elementos genéticos móviles que se transponen a través de intermediarios de ARN) (Bourc'his y Bestor, 2004) en células germinales y somáticas, inactivación del cromosoma X en hembras (Deuve y Avner,

2011) y silenciamiento permanente de algunos genes asociados a la diferenciación de células pluripotenciales. Los grupos metilo son incorporados al ADN por un conjunto de proteínas denominadas DNMT (ADN metiltransferasas) (Goll y Bestor, 2005). Las DNMT *de novo* (DNMT3A, DNMT3B, y sus cofactores DNMT3L) establecen los patrones de metilación durante el desarrollo temprano (Ooi y col., 2009). De esta manera, dichas proteínas, aseguran que los patrones de metilación permanezcan estables a través de las generaciones celulares. DNMT1 preserva esos patrones a lo largo de las divisiones celulares mediante la adición de grupos metilo a los dinucleótidos CpG hemimetilados (Leonhardt y col., 1992).

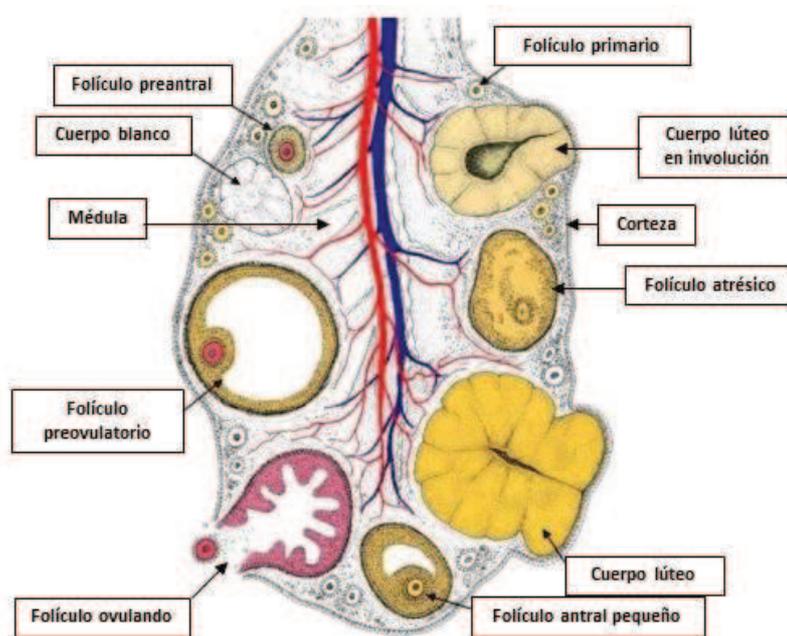
La distribución de la metilación del ADN en el genoma no es homogénea y no tiene los mismos efectos en la transcripción génica independientemente de su presencia en promotores, cebadores, cuerpos génicos, regiones ricas en CpG (Islas CpG), zonas lindantes a islas CpG o en regiones pobres en sitios CpG (Jones, 2012). Se ha demostrado que la metilación no sólo ocurre a nivel gen-específico sino también a nivel global. Un estudio en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 1 evidenció niveles disminuidos de metilación sistémico respecto de pacientes sanos (Arroyo-Jousse y col., 2015).

## 1.2 FISIOLÓGÍA DEL OVARIO

### 1.2.1 El ovario

El ovario es una glándula endocrina y exocrina, capaz de sintetizar hormonas y de liberar en cada ciclo reproductivo una célula germinal, el ovocito (**Figura 2**). Estos complejos procesos de biosíntesis y desarrollo celular se llevan a cabo en un ambiente muy complejo, donde factores endocrinos, paracrinos y autocrinos entran en relación para lograr la correcta regulación de estos acontecimientos (Field y col., 2014). 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 (Hafez y Hafez, 2002). 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). En el ovario adulto, los ovocitos se encuentran rodeados por una o más capas de células que cumplen múltiples funciones, como protección, nutrición y sostén, que crecen gradualmente en número y forman eventualmente un folículo esférico lleno de líquido (Geneser, 2005).



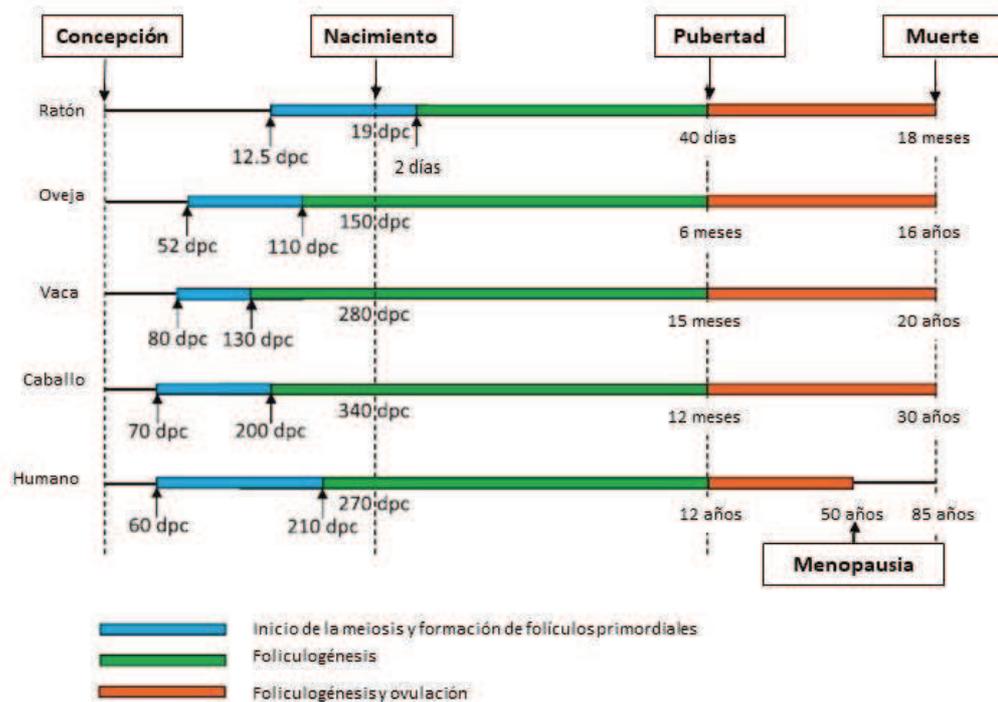
**Figura 2.** Esquema representativo del ovario bovino con sus diferentes estructuras. Adaptado de König y Liebich (2011).

El folículo es el compartimiento que permite al ovario cumplir su doble función de gametogénesis y esteroidogénesis. Es una unidad fisiológica equilibrada cuyo funcionamiento y estructura dependen de factores externos y locales, los que llevan a una sucesión de transformaciones subcelulares y moleculares en sus diversos componentes: el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca (Hafez y Hafez, 2002).

### 1.2.2 Desarrollo embrionario y reserva folicular

Uno de los períodos más sensibles a la influencia del ambiente durante el desarrollo embrionario en mamíferos es la diferenciación sexual de las gónadas en la línea germinal. El establecimiento de la reserva de folículos primordiales en mamíferos ocurre en diferentes momentos de la vida fetal o neonatal, dependiendo de la especie. En todos los casos, la formación de la reserva de células germinales comienza con la migración de las células germinales primordiales hacia la cresta genital. En las hembras, las ovogonias proliferan, atravesando sucesivas divisiones mitóticas para luego convertirse en ovocitos primarios que inician la profase de su primera división meiótica. La meiosis se detiene al final de la profase I y los ovocitos primarios son rodeados por una capa de células somáticas (pre-granulosa) aplanadas, formándose así los folículos primordiales (Fortune y col., 2013; Monniaux y col., 2014). De esta manera, se establece el pool de folículos primordiales que luego podrán activarse y crecer para continuar el desarrollo folicular. En bovinos, la diferenciación de los folículos primordiales comienza entre los 90 y 140 días de gestación (Yang y Fortune, 2008; Evans y col., 2012) (**Figura 3**) y cuando la ontogenia del ovario finaliza, los folículos quedan ubicados en la corteza periférica dentro de una matriz de fibroblastos, colágeno y elastina (Aerts y Bols, 2010). Además, se ha establecido que, en el ovario bovino en desarrollo, el número de ovogonias alcanza un máximo y desciende rápidamente por apoptosis en el último tramo de la vida fetal, hasta alcanzar un número de folículos al nacimiento que es altamente variable entre individuos (Evans y col., 2012; Cushman y Perry, 2019).

En la vaca, de un máximo de aproximadamente 2.700.000 folículos primordiales, el 90% se perderán por degeneración en las divisiones meióticas iniciales, quedando al nacimiento una cantidad aproximada de 135.000 folículos primordiales (Van Den Hurk y Zhao, 2005).



**Figura 3.** Sucesión temporal de las etapas del desarrollo reproductivo en diferentes especies de mamíferos. Adaptado de Monniaux y col. (2014).

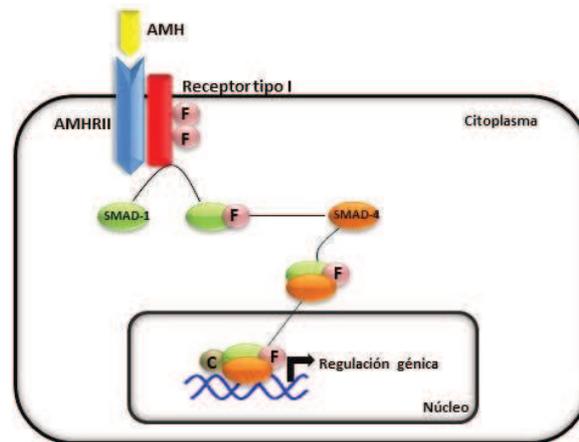
### 1.2.3 Recuento de folículos antrales, AMH y fertilidad

El crecimiento, desarrollo y maduración de los folículos ováricos es un proceso fundamental para lograr una alta eficiencia reproductiva en los animales domésticos.

En el ganado bovino se identificó la presencia de folículos primordiales, primarios y secundarios en el ovario los días 90, 140 y 210 de vida fetal, respectivamente (Yang y Fortune, 2008; Burkhart, 2009). El pool de folículos primordiales se denomina “Reserva Folicular Ovárica” (RFO) y, como mencionamos previamente, se forma durante la vida fetal temprana (Fortune y col., 2013). Es a partir de esta reserva que tiene lugar la formación de folículos antrales y presenta una estrecha relación con la fertilidad de las hembras (Monniaux y col., 2014). El recuento de folículos antrales (RFA) puede ser determinado por dos métodos: por ultrasonografía ovárica, la cual provee estimaciones precisas de la cantidad de folículos (Burns y col., 2005) y la medición de marcadores endócrinos como la hormona Anti- Mulleriana (AMH), que permite una valoración indirecta del tamaño de la reserva (Ireland y col., 2008; Rico y col., 2009; Lahoz, 2014; Monniaux, 2011).

La AMH, también llamada sustancia inhibidora Müllleriana (MIS), es una glicoproteína homodimérica con puentes disulfuros de 140 kDa en bovinos, perteneciente a la superfamilia del TGF- $\beta$ . Es secretada por las células de la granulosa de folículos sanos en crecimiento (La Marca y Volpe, 2006) y es conocida por ser un factor testicular distinto a la testosterona que causa la regresión de los conductos de Müller en el feto macho (Jost, 1947) y que subsecuentemente se ha encontrado que es producido por las células de Sertoli (Josso y col., 1993).

En humanos el gen que codifica para la AMH posee 275 pb y está dividido en 5 exones. La porción 3' del quinto exón codifica para la parte bioactiva de esta molécula y es extremadamente rica en guanina-citosina. Además, este es el único dominio que posee homología con los otros miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  (Josso y col., 2001). AMH al igual que otros miembros de la superfamilia TGF- $\beta$  se une a receptores tipo I y II, específicamente al receptor AMH tipo II que tiene la capacidad de interactuar con dos tipos de receptores tipo I, el ALK-5 y el BMPR-IB. Luego de la unión con el receptor BMPR-IB, éste fosforila a proteínas SMAD-1, la cual interacciona formando un complejo con SMAD-4 que continúan la vía de señalización corriente abajo (**Figura 4**). La expresión de AMH puede estar regulada por la actividad concomitante de la familia de las BMPs (Proteína Morfogénica Ósea), en este sentido BMP-6 demostró aumentar la expresión de AMH en cultivos de células de la granulosa y de la teca interna humanas (Shi y col., 2009).



**Figura 4.** Vía de señalización de AMH. AMHR II es el receptor tipo II específico. El receptor tipo I corresponde a ALK-5. SMAD-1 fosforilado (F) interactúa con SMAD-4 y estos con cofactores (C) en el interior nuclear sobre genes específicos. Adaptado de Josso y col. (2013).

Diferentes trabajos han postulado a AMH como el marcador endocrino más adecuado para establecer la población de folículos antrales, tanto en mujeres (La Marca y col., 2010; Loh y col., 2011) como en rumiantes (Ireland y col., 2008; Rico y col., 2009; Lahoz, 2014; Monniaux, 2011).

Tanto la AMH como el RFA son considerados indicadores de diferentes parámetros relacionados a la fertilidad entre los que se encuentran, la síntesis de progesterona y andrógenos en el ovario (Jimenez-Krassel y col., 2009; Mossa y col., 2010; Sheetz y col., 2012), la calidad ovocitaria (Ireland y col., 2009), la respuesta a protocolos de superovulación (Ireland y col., 2007), fertilidad (Mossa y col., 2012; Ribeiro y col., 2014) y tiempo de vida productiva dentro del rodeo (Jimenez-Krassel y col., 2015). Según el número de folículos antrales mayores o iguales a 3 mm presentes en los ovarios en el momento del reclutamiento de cada onda folicular, las hembras bovinas pueden ser clasificadas como: de bajo recuento (hasta 15 folículos), recuento intermedio (entre 16 y 24 folículos) y alto recuento (25 o más folículos). Así, se establece que la reserva ovárica está positivamente asociada con la fertilidad (Ireland y col., 2011). Por otra parte, se ha demostrado que la restricción nutricional o presencia de enfermedades en la hembra durante la gestación, en el momento del desarrollo de los ovarios en sus fetos, repercute negativamente en la proliferación de células germinales primordiales y, por lo tanto, en el número de folículos después del nacimiento (Evans y col., 2012). Mossa y col. han determinado que vacas sometidas a

una restricción nutricional durante el primer trimestre de la gestación tienen crías con menor RFA y menores concentraciones séricas de AMH en comparación con animales provenientes de madres sin restricciones nutricionales (Mossa y col., 2013).

Las vaquillonas con un bajo RFA tienen niveles menores de P4 circulares durante su ciclo estral (Jimenez-Krassel y col., 2009). Además, el desempeño reproductivo es inferior en vacas lecheras con bajos RFA (Mossa y col., 2012). Por otra parte, las bajas concentraciones de AMH en vaquillonas están relacionadas con una vida productiva más corta, bajos niveles de producción en la primera lactancia, los más bajos índices de preñez, las tasas de descarte más altas por problemas productivos y reproductivos, en comparación con vaquillonas que presentaron altos niveles de AMH (Jimenez-Krassel y col., 2015).

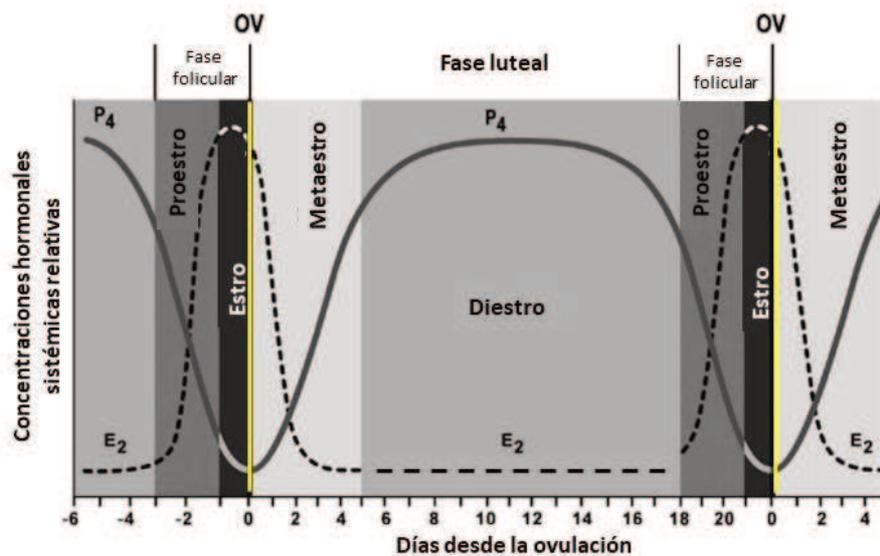
#### **1.2.4. Clasificación folicular**

En orden de poder estudiar sistemáticamente a los folículos presentes en el ovario, es importante poder realizar una correcta clasificación de ellos. Braw-Tal y Yossefi, (1997) clasificaron los folículos presentes en los ovarios bovinos de acuerdo con sus características morfológicas. Los folículos primordiales (tipo I) se caracterizan por un ovocito quiescente, detenido en profase I de la meiosis que se encuentra rodeado por un número limitado (<10) de células de la granulosa aplanadas. 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. Primero 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. Los folículos primarios (tipo II) están caracterizados 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 al menos unas 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). Las células de la teca derivan del estroma intersticial y están presentes como células individuales sobre la lámina basal de los folículos primarios (Hirshfield, 1985). Las primeras células de la teca interna pueden ser identificadas en los folículos tipo III, pero se distingue completa y claramente en los folículos tipo IV. La formación del antro folicular comienza cuando el folículo alcanza las 250 células de la granulosa. Inicialmente aparecen como parches llenos de líquido entre las células de la granulosa, y finalmente cuando se produce la coalescencia de estos parches en una sola cavidad, el folículo pasa a llamarse “antral” (tipo V) (Smitz y Cortvrindt, 2002).

#### **1.2.5 Ciclo estral bovino y su regulación endócrina**

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 vaquillonas entre los 6-12 meses de edad, dependiendo de la raza y generalmente a un peso de 200-250 kg. 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) (**Figura 5**). 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.



**Figura 5.** Etapas de las fases folicular y lútea del ciclo estral bovino y las concentraciones hormonales de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) y progesterona ( $P_4$ ) durante el mismo. La línea vertical amarilla indica el día de la ovulación. Adaptado de Peter y col. (2009).

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).

El ciclo es regulado por las hormonas del hipotálamo (hormona liberadora de gonadotropinas; GnRH, *del inglés: gonadotropinreleasing hormone*), la adenohipófisis (hormona foliculoestimulante; FSH, *del inglés: follicle stimulating hormone* y hormona luteinizante; LH, *del inglés: luteinizing hormone*), los ovarios (progesterona;  $P_4$ ,  $17\beta$ -estradiol;  $E_2$ , e inhibina) y el útero (prostaglandina  $F2\alpha$ ;  $PGF2\alpha$ ) a través de mecanismos de retroalimentación negativa y positiva que gobiernan el control del ciclo estral (Roche, 1996). La GnRH controla el ciclo a través de sus acciones sobre la adenohipófisis regulando la secreción de las gonadotropinas LH y FSH (Schally y col., 1971). Durante la fase folicular, un incremento en las concentraciones de  $E_2$ , debido al rápido crecimiento y proliferación celular que sufre el folículo dominante (FD), sumado a la caída concomitante de los niveles circulantes de  $P_4$  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 minutos 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, tiene una duración de 3 a 4 días y 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 si 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 FDs que crecen durante esta fase no llegan a ovular. La P4 que es dominante en esta fase, ejerce retroalimentación negativa y sólo permite la liberación de pulsos de LH de gran amplitud, pero de baja frecuencia que no desencadenan la ovulación del FD (Rahe y col., 1980). Finalmente, durante el proestro, la P4 cae debido al proceso de luteólisis a partir de la secreción de PGF $2\alpha$  desde el útero (Hansel y Convey, 1983).

### **1.3 INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA REPRODUCCIÓN**

#### **1.3.1 Estrés**

El estrés puede ser considerado como un proceso de adaptación del organismo en donde éste reacciona ante estímulos internos o externos activando una serie de mecanismos fisiológicos y conductuales para mantener un estado de equilibrio con su medio interno y con el ambiente externo (Charmandari y col., 2005; Möstl y Palme, 2002). Cuando estos mecanismos resultan insuficientes 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). El ganado bovino experimenta numerosas situaciones de estrés durante su vida productiva debido a factores ambientales o de manejo, por

lo cual podría verse afectada su productividad en general y bienestar ante la alteración neuroendócrina e inmunosupresión.

### **1.3.2 Estrés por calor**

El estrés físico representa aquel asociado con lesiones, temperaturas demasiado altas o bajas, hambre y sed, fatiga y enfermedad (Grandin, 1997; Carroll y Forsberg, 2007). Algunos factores se pueden prevenir o superar a través de prácticas alternativas de manejo y diferentes estrategias nutricionales, sin embargo, otros tales como el estrés térmico a menudo son difíciles de evitar.

El estrés calórico se define como la suma de fuerzas externas a un animal homeotermo que provoca un aumento de la temperatura corporal por sobre el estado de reposo, generando una respuesta fisiológica (Hansen y Aréchiga, 1999; Polsky y von Keyserlingk, 2017).

El ganado bovino de la cuenca lechera santafesina está expuesto a altas temperaturas durante un número considerable de días en el período estival que comprende los meses entre noviembre y marzo (Gallardo y Valtorta, 2011). El rango normal de temperatura corporal de la vaca lechera oscila los  $38,6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Esta condición es esencial para que el conjunto de condiciones fisiológicas y reacciones metabólicas se realicen en óptimas condiciones (García, 2010). El ambiente meteorológico óptimo para el ganado lechero Holando (Holstein) es caracterizado como aquel que presenta temperaturas entre  $13\text{ y }18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa hasta 60-70 %, velocidad del viento de 5 a 8 km/hora y radiación no superior a 700 ly/día (Mc Dowell, 1972). Ante un aumento de la temperatura ambiente, la vaca trata de eliminar el exceso de calor por vasodilatación subcutánea y evaporación de agua a nivel respiratorio. Si esto no es suficiente, la vaca continúa minimizando sus movimientos y por último disminuyendo el consumo de alimentos. A partir de cierta temperatura ambiental se considera que la vaca no podrá manejar su homeostasia y entrará en estrés calórico (García, 2010). Cuando la temperatura del aire supera el valor máximo de confort de un animal ( $27^{\circ}\text{C}$ ), comienzan a tener importancia otros elementos del clima como es el caso de la humedad del aire. Si la temperatura del ambiente es elevada, disminuyen en forma

rápida las pérdidas de calor que dependen fundamentalmente del gradiente de temperatura entre el animal y el ambiente, en tanto que se elevan las pérdidas evaporativas, que se transforman en el único proceso importante de eliminación de calor. Si el aire se encuentra saturado o presenta un alto contenido de vapor de agua, esta vía de disipación se verá frenada y el ambiente se tornará más estresante para el animal (Valtorta y Gallardo, 1996).

Los signos asociados al estrés calórico se pueden presentar como un aumento de la frecuencia cardiaca superior a 80 pulsaciones por minuto (valor normal 50 pul/min), incremento de la temperatura corporal (mayor a 39°C), jadeo, excesiva salivación, disminución de la rumia, reducción del consumo de materia seca e incremento del consumo de agua entre otros. (Wiersma, 1990; Ghiano y col., 2014). Sobre la base de lo expuesto, el Índice de Temperatura y Humedad (ITH) permite definir, en función de la combinación de las variables temperatura y humedad, el grado de estrés calórico que pueden estar sufriendo los animales (Fuquay, 1981; Armstrong, 1994; Kadzere y col., 2002; Polsky y von Keyserlingk, 2017). En la bibliografía se categorizan los valores de ITH de manera de estimar los niveles de estrés calórico: se considera que valores de ITH hasta 71 están en la zona de confort o zona termoneutral; ITH entre 72 y 79 implican estrés calórico leve; entre 80 y 90, estrés calórico moderado; y mayores a 90, estrés calórico severo (Armstrong, 1994; Gallardo y col., 2005; Polsky y von Keyserlingk, 2017). El valor considerado como límite entre situaciones de confort y estrés varía según los autores. Sin embargo, existe coincidencia en el valor crítico de 72 determinado por Johnson y col., (1961). Por encima de este valor comenzarían a sufrir estrés especialmente las vacas de alta producción. Para el cálculo del ITH se utiliza una fórmula adaptada de Thom (1959):

$$ITH = 1,8 \text{ tm} + 32 - (0,55 - 0,55 \text{ hr}) (1,8 \text{ tm} - 26)$$

Donde “tm” es la temperatura horaria, expresada en grados centígrados °C y “hr” la humedad relativa horaria, en base decimal.

Cuando las temperaturas o índices de estrés se ubican por encima de dicho umbral durante un periodo de 3 o más días consecutivos, se lo conoce como olas de calor (Hahn y col., 2000) y se ha establecido que, cuando esto ocurre, el ganado bovino

requiere al menos 8 horas de recuperación con ITH por debajo del umbral de confort (Leva y col., 2008)

### **1.3.3 Efectos del estrés sobre la reproducción**

Ha sido ampliamente estudiado y confirmado que los factores estresantes afectan la fertilidad del ganado lechero de manera directa por interferir con los mecanismos que regulan el cronograma de eventos dentro del ciclo estral y específicamente en la fase folicular. En algunas situaciones, como durante el estrés crónico debido a laminitis o fiebre, la frecuencia pulsátil de GnRH/LH puede ser menor, de modo tal que el desarrollo folicular comienza, pero no puede continuar a estadios avanzados donde se necesita una alta frecuencia de liberación. De esta manera, el animal es incapaz de desarrollar ciclos estrales normales y se produce anestro. En otros casos, la frecuencia del pulso de GnRH/LH puede ser suficiente para permitir el desarrollo folicular, pero con alteraciones en la liberación de GnRH o la sensibilidad de la hipófisis al  $17\beta$ -estradiol. De esta forma, se produce una liberación inadecuada de LH, incapaz de conducir a la ovulación y luteinización, ocasionando la persistencia folicular y el desarrollo de quistes foliculares (Dobson y Smith, 1995; Ortega y col., 2008; Salvetti y col., 2012; Díaz y col., 2015; Belotti y col., 2020).

### **1.3.4 Influencia del estrés por calor sobre la eficiencia reproductiva**

El estrés calórico es un factor altamente perjudicial en la eficiencia reproductiva del rodeo lechero. En diferentes trabajos realizados en los meses de verano, se ha observado una disminución de entre un 20 y 30% de la tasa de concepción y patrones estacionales de detección de celo (Hansen y Aréchiga, 1999; De Rensis y Scaramuzzi, 2003; Polsky y Von Keyserlingk, 2017), ya que las elevadas temperaturas ambientales afectan de manera negativa la capacidad de las hembras de demostrar la conducta natural de apareamiento, reduciendo tanto la duración como la intensidad de la expresión del estro (Orihuela, 2000). Esta reducción en el comportamiento de celo puede relacionarse con la disminución en el consumo de materia seca que ocurre en situaciones de estrés por calor (Westwood y col., 2002). Otros autores lo relacionan

con el estado de letargo físico que forma parte de los mecanismos adaptativos de la vaca ante las situaciones de estrés por calor (Hansen y Aréchiga, 1999; Polsky y von Keyserlingk, 2017).

El estrés térmico afecta al desarrollo folicular y altera la composición del líquido folicular desencadenando envejecimiento prematuro de los ovocitos, lo que se ha asociado a la reducción de fertilidad provocando grandes pérdidas económicas a los productores (Vanselow y col.,2016). Por lo tanto, el estrés por calor podría afectar el desarrollo de las gónadas en la descendencia durante la gestación y causar alteraciones a largo plazo en la fertilidad de la progenie debido a modificaciones en los estímulos hormonales necesarios para el desarrollo ovárico (Hansen, 2009).

Las condiciones adversas durante la vida intrauterina pueden provocar cambios permanentes en la fisiología y el metabolismo de la descendencia, lo que a su vez conduce a un mayor riesgo de enfermedad en la edad adulta. Esta es una respuesta de adaptación del feto a los cambios en las señales ambientales que recibe durante la vida temprana para asegurar su supervivencia y prepararse para la vida posnatal (Cheng y Zhang, 2011). Se ha demostrado que vacas expuestas a estrés calórico en etapas tempranas del desarrollo folicular presentaron un efecto posterior en la esteroidogénesis en células de la granulosa y de la teca de folículos antrales y preovulatorios, lo cual podría afectar la viabilidad del ovocito (Roth y col., 2001). Por otro lado, el estrés por calor puede reducir el tamaño del folículo dominante y alterar los niveles hormonales del líquido folicular y la sangre (Hansen y Aréchiga 1999).

Por otro lado, se ha reportado en distintos estudios la asociación entre la mortalidad embrionaria temprana y el estrés por calor, dependiendo de la severidad del mismo (Hansen y Aréchiga, 1999; De Rensis y Scaramuzzi, 2003). Esto puede asociarse a alteraciones en la secreción hormonal endometrial, que provocan luteólisis prematura y pérdida del embrión (De Rensis y Scaramuzzi, 2003).

Existen trabajos que demuestran la importancia de las prácticas de manejo del rodeo y su influencia sobre los efectos del estrés por calor. El uso de aspersores y ventiladores o la presencia de sectores con sombra podrían atenuar los efectos del estrés térmico sobre la producción mejorando el confort en vacas lecheras (Valtorta y col., 1996; Gallardo y col 2005). Sin embargo, estas prácticas suelen aplicarse en los lugares de

ordeño, donde los animales pasan sólo una pequeña parte del día. Además, los mecanismos fisiológicos desencadenados para hacer frente a la situación no son suficientes para eliminar las consecuencias a largo plazo en los animales y en su descendencia.

### **1.3.5 Efectos del estrés prenatal en el feto**

El estrés durante la gestación conduce a numerosos cambios cardiovasculares y endócrinos en la madre, incluyendo aumento de ACTH plasmática y en las concentraciones de beta endorfinas, glucocorticoides y catecolaminas (Young, 2002; Kapoor y col., 2006; Weinstock, 2007). Pueden existir efectos indirectos sobre el feto a través de la modificación de la función placentaria, barrera estructural y bioquímica para muchos factores maternos, principalmente al final de la gestación cuando las demandas del feto son mayores. Estudios previos han mostrado que el estrés térmico durante la etapa final de la gestación afecta la performance y desarrollo posnatalmente (Ahmed y col., 2017). Estos estudios han reportado que el estrés por calor disminuye el peso de la cría al año de edad (Monteiro y col., 2016ab). Se observó que vaquillonas nacidas de madres expuestas a estrés térmico durante el último tercio de la gestación tenían más posibilidades de abandonar el rodeo debido a enfermedades, malformaciones, o retardo en el desarrollo (Monteiro y col., 2016a). Estos estudios se realizaron en vacas bajo condiciones controladas durante el último tercio de la gestación, donde un grupo fue colocado en condiciones de alta temperatura y otro fue sometido a técnicas de manejo para reducir el calor. Akbarinejad y col. (2017) mostraron fertilidad reducida en vaquillonas lecheras hijas de madres expuestas a condiciones de estrés por calor y detectaron como etapas críticas el segundo y tercer tercios de la gestación. En humanos, el aumento de cortisol en la madre produce en la placenta una regulación a la baja de la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo II, encargada de convertir el cortisol en cortisona inactiva. Dicha enzima previene el paso de altos niveles de cortisol hacia la circulación fetal (Díaz, Barba, 2016). Los glucocorticoides son capaces de atravesar la barrera placentaria, lo que los convierte en candidatos preferidos como “factores de programación” para transmitir los efectos del estrés materno hacia el feto. La

exposición fetal a glucocorticoides programaría un fenotipo caracterizado por la flexibilidad y adaptabilidad ante cambios frecuentes en el ambiente (Cáceres y col., 2017). Existe evidencia en estudios en animales que demuestran asociación entre estrés durante la preñez y resultados adversos luego del nacimiento en la descendencia. En un estudio con ratas Wistar, la exposición a estrés psicológico durante la preñez, en un modelo de restricción física, se asoció con bajo peso al nacer y nacimientos prematuros en comparación con el grupo control (Govindaraj, Shanmuganathan & Rajan, 2017).

#### **1.4 HORMONAS ESTEROIDES, SUS RECEPTORES Y PARTICIPACIÓN DE CORREGULADORES**

##### **1.4.1 Hormonas esteroides y su mecanismo de acción**

Los esteroides juegan un rol importante en el crecimiento, diferenciación y función de tejidos reproductivos femeninos, incluyendo los folículos ováricos (Apostolakis y col., 2002). En este sentido, los andrógenos, estrógenos y progesterona producidos localmente están involucrados en la regulación de diferentes funciones foliculares (Rosenfeld y col., 2001, Bramley y col., 2002; Schams and Berisha, 2002; Ortega y col., 2009, Alfaro y col., 2012).

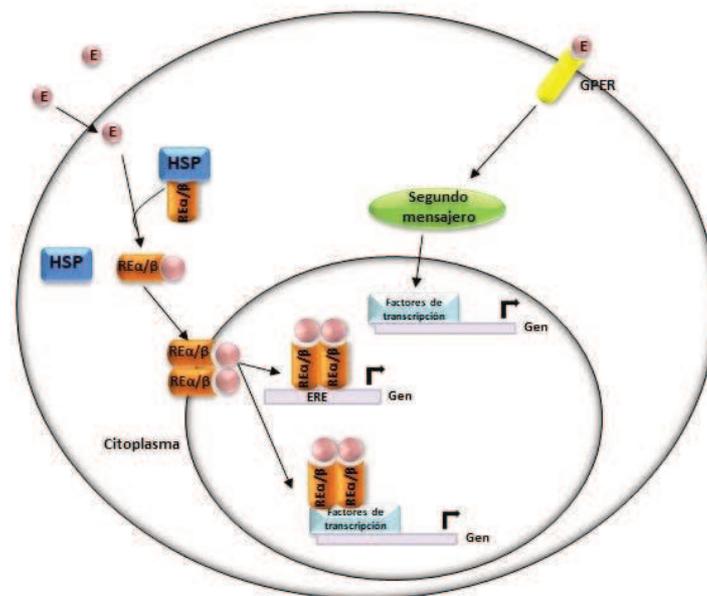
Las hormonas esteroides, a través de sus receptores nucleares, regulan importantes eventos transcripcionales asociados a la reproducción (Beato y Klug, 2000).

Los **estrógenos** fueron las primeras hormonas que se identificaron y se creía que sólo tenían implicancia en procesos relacionados a la reproducción femenina (Hamilton y col., 2017). Actualmente se sabe que están involucrados en los sistemas neuroendócrino, vascular, esquelético, inmune y reproductivo tanto en hembras como en machos (Hamilton y col., 2017). Los estrógenos influyen en muchos procesos fisiológicos y se encuentran asociados a distintas enfermedades como la obesidad, desordenes metabólicos, cáncer, osteoporosis, lupus, endometriosis y fibroma uterino (Burns y Korach, 2012; Deroo y Korach, 2006). El tipo de estrógeno presente varía según la especie, siendo generalmente el más dominante el  $17\beta$ -estradiol. En los mamíferos, los estrógenos participan en el crecimiento, diferenciación y funciones del

aparato reproductor femenino, a través de sus receptores RE $\alpha$  y RE $\beta$ , y las variables de ambos originadas por *splicing* alternativo (Schams y Berisha, 2002).

Los receptores de hormonas esteroides son miembros de la superfamilia de factores de transcripción regulados por ligando que modulan la transcripción génica por diferentes mecanismos de modo que pueden activar o reprimir la expresión de un determinado gen (**Figura 6**). El mecanismo clásico o genómico de acción de RE incluye la unión de los estrógenos a los receptores en el núcleo previa disociación de las chaperonas Hsp90 (*heat shock protein*), luego de lo cual los receptores dimerizan y se unen a elementos de respuesta específicos conocidos como elementos de respuesta a estrógenos (ERE) localizados en los promotores de los genes blanco (Nilsson y col., 2001; Björnström y Sjöberg, 2005; Tang y col., 2019).

Ambos subtipos de RE unen el 17- $\beta$ -estradiol con alta afinidad y especificidad.



**Figura 6.** Mecanismos de señalización genómico en respuesta a estrógenos. Los estrógenos (E) se unen a su receptor (RE $\alpha/\beta$ ), previa disociación de las chaperonas (Hsp), tras lo cual se dimerizan y se traslocan al núcleo induciendo cambios transcripcionales en presencia o no de elementos de respuesta a estrógenos (ERE). Por su parte, el mecanismo no genómico involucra un receptor de membrana (GPER) que produce cambios citoplasmáticos tales como producción de segundos mensajeros o apertura de canales iónicos de membrana, luego de su unión al ligando (E). Adaptado de Fuentes y Silveyra (2019).

Además, existe un mecanismo de acción no genómico, el cual involucra un receptor de membrana denominado GPER (*G Protein-Coupled Estrogen Receptor*) (Prossnitz y Barton, 2011), mediante el cual se activan mecanismos de traducción de señal con la subsecuente producción de segundos mensajeros intracelulares, regulación y activación de cascadas de señalización por AMPc y proteínas kinasas que culminan en cambios indirectos de la expresión génica (Lösel y Wehling, 2003).

Además de los mecanismos clásicos y no genómicos, los receptores de estrógenos también pueden ser activados por factores generales de la transcripción o por mecanismos indirectos generando acciones a nivel genómico (Hevener y col., 2015).

Si bien RE $\beta$  comparte muchas características funcionales con RE $\alpha$ , los mecanismos moleculares que regulan su actividad transcripcional y la localización tisular son distintos para ambos y difiere entre especies (Kuiper y col., 1996; Wang y col., 2000; Mal y col., 2020). El RE $\alpha$  se localiza principalmente en útero, glándula pituitaria, hígado, hipotálamo, hueso, glándula mamaria, cérvix y vagina. Por su parte el RE $\beta$  se expresa en ovario, pulmón y próstata (Couse y col., 1997; Jia y col., 2015). En el ovario, se ha detectado expresión del RE $\beta$  en células de la granulosa, y RE $\alpha$  en células de la teca, glándulas intersticiales, células estromales y epitelio germinal en rata, bovino y humano (Amrozi y col., 2004; Berisha y col., 2002; D'Haeseleer y col., 2006; Rosenfeld y col., 2001; Van Den Broeck y col., 2002). En bovinos la expresión de ARNm de RE $\beta$  en células de la granulosa disminuye a medida que aumenta el tamaño folicular, debido a la habilidad de las gonadotrofinas de regular hacia abajo la expresión génica de este receptor (Kuiper y col., 1996; Byers y col., 1997). Por el contrario, la expresión de ARNm de RE $\alpha$  se incrementa en células de la teca interna continuamente hacia el final del crecimiento folicular sin cambios en la proliferación de células de la granulosa. Así también, existe evidencia que la expresión de RE $\alpha$  durante el desarrollo folicular en bovinos está regulado por microARNs (Özdemir y Çomakli, 2018). Estudios previos en nuestro laboratorio han evidenciado expresión génica y proteica de ambos receptores en células de la teca como en granulosa de ovarios bovinos (Alfaro y col., 2012, Salvetti y col., 2012). En algunas especies, el gen RE $\alpha$  se expresa en las células de la granulosa cuando se aplica sobre ellas un estímulo inductor de diferenciación (Yang y col., 2002). Si bien las células de la granulosa son sitios primarios de la expresión de RE $\beta$ , la

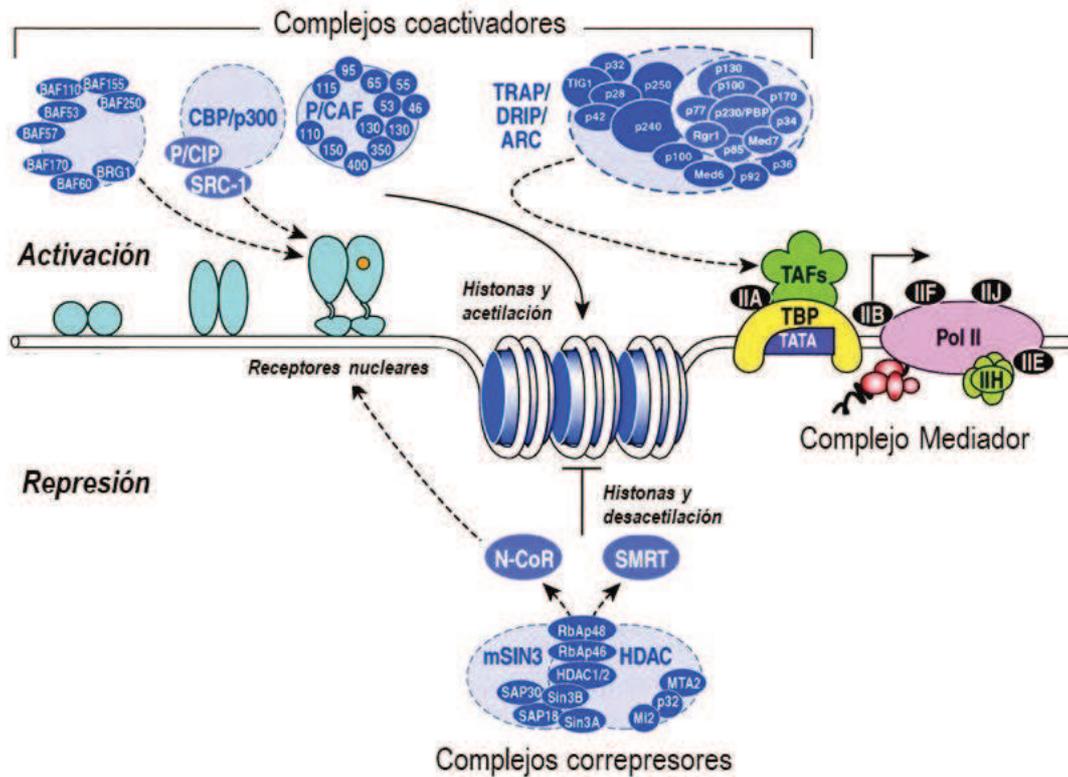
coexpresión de este con una relativamente alta expresión de RE $\alpha$  en las células de la teca e intersticiales sugieren que ambos subtipos deben ser necesarios para el normal funcionamiento ovárico (Yang y col., 2002). El gen que codifica RE $\beta$  es más sensible a los efectos de los estrógenos ya que los efectos de la progesterona son revertidos ni bien comienzan a aumentar los niveles de estrógenos. Si bien ambos receptores tienen aparentemente la misma afinidad por los estrógenos, considerando los patrones de expresión espacio-temporales diferentes de estos dos subtipos de receptores de estrógenos en las células foliculares y no-foliculares, es probable que haya una regulación diferencial de los estrógenos sobre la función celular (Enmark y col., 1997). Además, RE $\beta$  y RE $\alpha$  pueden formar heterodímeros en las células blanco. La transcripción génica mediada por RE involucra la unión del homodímero-receptor ligando con el ERE, sin embargo, los RE también median la transcripción a través del elemento mejorador de respuesta AP1 que depende de la unión con un ligando, así como también de factores de transactivación de AP1, tales como Fos y Jun (Gaub y col., 1990; Hevener y col., 2015). Paech y col., (1997) han demostrado que sin bien la unión del complejo estrógenos-RE $\alpha$  tanto al sitio ERE como al AP1 estimula la transcripción, la unión del complejo estrógenos-RE $\beta$  al sitio ERE estimula, pero la unión al sitio AP1 inhibe la transcripción. Por otro lado, estudios realizados en nuestro laboratorio en los que se ha evaluado la expresión de ambos receptores en ovarios de diferentes especies en modelos experimentales y animales con COD (*Cystic Ovarian Disease*) de presentación espontánea han permitido corroborar esa expresión diferencial entre tipos celulares y además evidenciar diferencias con la expresión en animales normales (Salvetti y col., 2007, 2009, 2012; Ortega y col., 2009; Zurvarra y col., 2009; Alfaro y col., 2012). Además, pudo determinarse en hembras ovinas tratadas prenatalmente con testosterona un aumento en la expresión proteica de los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  junto con el incremento en la expresión de los receptores de andrógenos en las células de la granulosa de folículos antrales a los de 10 y 21 meses de edad. Estos resultados proporcionan evidencia de la programación fetal alterada que se manifiesta de manera temprana por la alteración en el equilibrio en la expresión de estos receptores (Ortega y col., 2009).

La **progesterona**, mediante sus receptores, juega un rol crucial en la ovulación, implantación y mantenimiento de la preñez (Graham y Clarck, 1997; Ogle y col., 1998). El receptor de progesterona (RP) posee tres isoformas codificadas por un mismo gen (Bramley, 2003). Las tres isoformas (RP-A, RP-B y RP-C) fueron detectadas en tejidos bovinos (Schams y col., 2003). Se ha sugerido que RP-A y RP-C podrían tener efectos restrictivos sobre la actividad transcripcional de RP-B (Conneely, 2001), así como también la capacidad para contribuir a la actividad antiestrogénica observada para la progesterona (Conneely y col., 2002; Bramley, 2003; Akison y Robker, 2012; Salvetti y col., 2012). La expresión de las distintas isoformas se solapa espacial y temporalmente en los órganos reproductivos de las hembras (Conneely, 2001; Gava y col., 2004). La expresión de los receptores de progesterona es inducida por los estrógenos en la mayoría de los tejidos blanco y declinan en respuesta a la progesterona. En los folículos preovulatorios maduros, la LH induce la expresión de RP en las células de la granulosa. La importancia de los RP en la fertilidad de la hembra esta subrayada por la infertilidad en los ratones KnockOut (KO) para RP (Lydon y col., 1995). Si bien los ratones muestran histológicamente ovarios normales, estos fallan en ovular aún luego de una estimulación exógena, como lo indica la presencia de folículos preovulatorios intactos en el ovario y la ausencia de ovocitos en el oviducto y cuernos uterinos (Lydon y col., 1995; Gava y col., 2004).

Por su parte la progesterona influiría negativamente sobre los receptores de estrógeno. El efecto inhibitorio de la progesterona sobre la expresión de RE puede verse por los bajos niveles de ambos receptores en el momento en que la progesterona incrementa significativamente sus niveles (Roy y Kole, 1995). A la luz de los efectos inhibitorios de la progesterona sobre la expresión de proteínas y ARNm de los RE, la diferencia entre la expresión de RE $\beta$  y RE $\alpha$  puede explicarse por una mayor sensibilidad del gen que codifica RE $\alpha$  a la presencia de progesterona ya que este no se comienza a expresar en tanto los niveles de esta hormona no bajan hasta niveles basales (Roy y Kole, 1995).

### 1.4.2 Correguladores

Los mecanismos moleculares utilizados por los receptores de hormonas esteroides han sido asociados con moléculas que poseen funciones correguladoras (Perissi y Rosenfeld, 2005).



**Figura 6.** Complejo de coreguladores. La regulación de la actividad transcripcional requiere de la acción de múltiples complejos proteicos que pueden ser reclutados de manera conjunta. Adaptado de Glass y Rosenfeld (2000).

Los correguladores son proteínas que interactúan con factores de transcripción y modulan positiva o negativamente su actividad. Estas proteínas son reguladores característicos de cualquier miembro de la superfamilia de receptores nucleares, aunque no existe información acerca de su interacción con receptores de membrana (Lonard y O'Malley, 2012). Desde un punto de vista funcional se clasifican en dos grupos: **coactivadores**, proteínas que intensifican la transcripción de determinados genes; y **correpresores**, proteínas que inhiben la transcripción génica (Xu y col., 1999) (**Figura 7**). Los coactivadores tienen una actividad intrínseca de histona acetil transferasa que, mediante acetilación de histonas, abre la cromatina y de esta forma

los factores de transcripción y la polimerasa tienen mejor acceso a una secuencia génica determinada (Tyler y Kadonaga, 1999) (**Figura 7**).

Por su parte muchos de los los correpresores tienen actividad de desacetilasas de histonas, incrementando la condensación de la cromatina e inhibiendo la transcripción del gen en cuestión (Lazar, 2003) (**Figura 7**).

Muchas de las moléculas corre reguladoras han sido detectadas en el ovario normal en relación a la expresión de los distintos receptores esteroides (Hlaing y col., 2001; Hussein-Fikret, 2005; Chang y col., 2005), indicando que la regulación espacio-temporal de la expresión génica mediada por los distintos receptores nucleares es crítica en la fertilidad (Leonardsson y col., 2002).

### **Coactivadores:**

Dentro de los coactivadores transcripcionales, la familia del SRCs (Coactivador de receptores esteroides) es una de las más estudiadas en relación con los receptores de estrógenos. Estas son proteínas nucleares que interactúan con receptores de esteroides que se encuentran unidos al ERE en el ADN para potenciar su eficiencia transcripcional (Apostolakis y col., 2002). Estos coactivadores están involucrados en la fisiología reproductiva regulando el crecimiento uterino, implantación embrionaria y la fertilidad (Han y col., 2006; Mukherjee y col., 2007). Esta familia esta compuesta por tres miembros: SRC-1 (también llamado NcorA-1), SRC-2 (también llamado GRIP o TIF2) y SRC-3 (también llamado p/CIP, ACTR, AIB-1, or RAC-3) (McKenna y col., 1999).

Los coactivadores son reclutados por los dominios AF-1 y AF-2 de los receptores de esteroides que han sido activados por la hormona y han formado dímeros en los elementos de respuesta hormonal de consenso del ADN dentro de la región reguladora de los genes diana (Apostolakis y col., 2002).

Estudios realizados en ratones con el gen para el coactivador SRC-1 bloqueado demostraron que este corre regulador está implicado en la regulación positiva y negativa del gen de la hormona liberadora de corticotrofina, y es un factor importante para la capacidad de adaptación al estrés (Lachize y col., 2009). Además, la disrupción del gen de SRC-1 en ratones resulta en una disminución del crecimiento y desarrollo de los

órganos reproductivos sin modificar su viabilidad y fertilidad (Xu y col., 1998; Dasgupta y col., 2014).

**Correpresores:**

Las alteraciones en la ovulación son una de las causas más frecuentes de infertilidad en las hembras y varios autores han encontrado que RIP-140 (*Receptor interacting protein*) es un correpresor que está íntimamente involucrado en el proceso de ovulación (White y col., 2000). Se ha demostrado que RIP-140 interactúa preferentemente con RE $\beta$  en comparación con RE $\alpha$  (Docquier y col., 2013) y que el número de sitios de unión de RIP-140 se incrementa significativamente sobre la expresión de RE $\beta$ , lo que sugiere una acción preferencial de RIP-140 con RE $\beta$  (Madak-Erdogan y col., 2013).

El correpresor REA (*Repressor of estrogen activity*) se ha establecido como un correpresor clave de RE en glándula mamaria y tracto reproductivo femenino, así como también en células cancerígenas mamarias (Park y col., 2005, 2011 y 2012). Se ha demostrado que REA se localiza en el núcleo celular y es capaz de modular la actividad transcripcional mediante interacción con varios factores de transcripción, ya sea directamente o a través de interacciones con proteínas remodeladoras de la cromatina (Matsuyama y col., 1997). Además, puede traslocarse desde el citoplasma al núcleo o viceversa en muchas células, incluidas las células de la granulosa de folículos que experimentan atresia. Por otro lado, estas proteínas son marcadamente visibles en células de folículos antrales pequeños y grandes (Thompson y col., 2004).

El correpresor dependiente de ligando (LCoR) representa una clase diferente correpresor de receptores nucleares que actúa atenuando la señal mediante agonistas unidos a receptores. Se ha determinado que se expresa extensamente en tejidos humanos, tanto adultos como fetales, y en líneas celulares (Fernandes y col., 2003; Gurevich y col., 2007). El LCoR se expresa en embriones de dos células, lo que sugiere que desempeña sus funciones ya en estadíos tempranos de desarrollo embrionario. La función de LCoR como atenuante de la señal de receptores nucleares propone que podría ser un importante modulador de las señales de hormonas esteroides en sincitiotrofoblastos, ya que en sus capas se expresan receptores de estrógenos, progesterona y glucocorticoides (Fernandes y col., 2003).

El SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) es un correpresor que forma parte de un complejo proteico que contiene deacetilasas de histonas que se une a antiestrógenos ligados a RE $\alpha$  y contribuye a la regulación negativa de la expresión génica (Peterson y col., 2007). Este interactúa con RE $\alpha$  en presencia de moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), como por ejemplo 4HT (4-hidroxitamoxifeno), y reprime la débil actividad agonista de este antiestrógeno (Jackson y col., 1997; Lavinsky y col., 1998; Smith y col., 1997; Zhang y col., 1998). Es así que SMRT contribuye a la proliferación de células neoplásicas positivas a RE $\alpha$  en carcinoma mamario (Peterson y col., 2007). La expresión de SMRT se detectó tanto en ovarios normales como en tumores ováricos de diferentes clases (Hussein-Fikret y Fuller, 2005).

Debido a que los esteroides sexuales y sus receptores (ER, PR) ejercen una profunda influencia en el desarrollo y la reproducción, es fundamental comprender la regulación molecular de los mismos mediante los complejos de correguladores en bovinos.

En ovejas, se ha establecido que la expresión de receptores de hormonas esteroides en hembras adultas puede reprogramarse mediante la exposición de la madre a testosterona (Ortega y col., 2009). Los receptores de esteroides como así también los coactivadores y correpresores fueron detectados con su expresión alterada en enfermedades relacionadas con infertilidad en bovinos (Salvetti y col., 2012; Notaro y col., 2016; Notaro y col., 2017)

Estos receptores y correguladores se ven afectados por cambios epigenéticos cuyas consecuencias serían significativas en la programación fetal (Gicquel y col., 2008).

## 1.5 HIPÓTESIS

En base a lo antes mencionado, planteamos como **hipótesis general** que las condiciones ambientales desfavorables que sufren las vacas lecheras durante la gestación afectan la dinámica folicular ovárica de las hijas produciendo cambios a nivel molecular en receptores de hormonas esteroides y corre reguladores de la transcripción que influyen en la fertilidad de las hembras.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Estudiar los niveles de expresión de los receptores de hormonas esteroides y correguladores transcripcionales asociados, así como probables modificaciones epigenéticas en ovarios de hembras bovinas que fueron gestadas bajo distintas situaciones ambientales de temperatura y humedad.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar la dinámica folicular en hembras bovinas adultas provenientes de madres que cursaron la gestación bajo diferentes condiciones ambientales identificando modificaciones en la cantidad de folículos antrales  $\geq 3\text{mm}$  y niveles de AMH como indicadores de la reserva folicular y de fertilidad.
2. Estudiar la expresión de los receptores de hormonas esteroides y correguladores transcripcionales en tejidos ováricos de hembras bovinas cuyas madres las gestaron bajo diferentes condiciones ambientales de temperatura y humedad.
3. Evaluar posibles mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación de la expresión de los receptores de hormonas esteroides en los diferentes grupos de animales estudiados.
4. Identificar relaciones entre las modificaciones epigenéticas y la expresión de los receptores de hormonas esteroides en los ovarios de los animales en los grupos estudiados.
5. Determinar posibles alteraciones en la fertilidad de las hembras con origen en la programación fetal alterada debido a modificaciones en el ambiente uterino de las madres.

### **3. MATERIALES Y METODOS**

### **3.1 Aspectos éticos**

Los procedimientos efectuados con los animales fueron evaluados y aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la FCV-UNL bajo las resoluciones número 157/13 y 220/15. Tales procedimientos se realizaron de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (*Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*. 3° ed. Federation of Animal Science Societies, 2010).

### **3.2 Animales**

Se trabajó con siete establecimientos lecheros de la zona de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional del Litoral), ubicados en la zona centro-norte de las provincias de Santa Fe y Córdoba. Los productores y médicos veterinarios de los establecimientos lecheros permitieron la incorporación de animales al experimento. En todos los casos se contaba con registros completos de los animales para evaluar la fecha de nacimiento, así como otros parámetros reproductivos y productivos. Se trabajó con vacas adultas (promedio de edad=5 años; rango de edad= 3 a 11 años) multíparas, raza Holando argentino, en lactancia o con indicación de rechazo por causas no reproductivas. En todos los casos se realizó una anamnesis de los animales y el rodeo y la correspondiente evaluación clínica para corroborar la ausencia de alteraciones tanto reproductivas como sistémicas. La alimentación estuvo basada en pastura de alfalfa, silaje de maíz, alimento balanceado comercial, heno de alfalfa y agua ad libitum.

### **3.3 Criterios de selección y grupos**

Se seleccionaron aquellos animales que contaban con registro de su fecha real de nacimiento a partir de la cual se estimó la fecha de servicio efectivo de la madre, considerando una gestación de 282 días. Para determinar las condiciones ambientales durante la gestación se consideró el Índice de Temperatura y Humedad (Thom, 1959)

de manera de establecer la exposición de las madres gestantes a condiciones de ITH elevados durante las diferentes etapas de gestación.

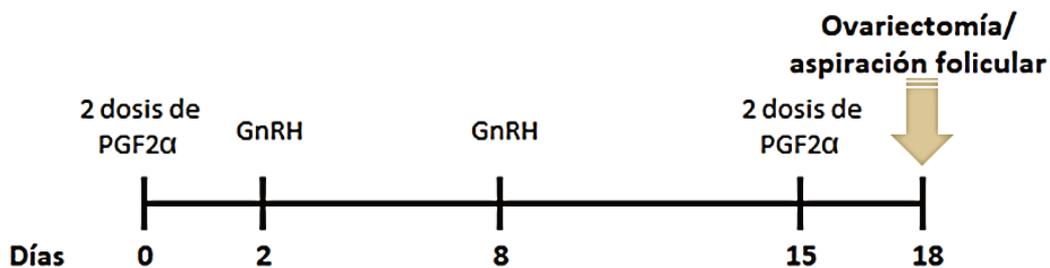
Teniendo en cuenta el momento en el cual se establece la reserva folicular ovárica en bovinos se dividió la gestación en dos periodos: **periodo 1** (P1, 0-150 días) y **periodo 2** (P2, 151 días-nacimiento). Además, se realizaron análisis considerando tres trimestres: **trimestre 1** (T1, 0-90 días), **trimestre 2** (T2, 91-180 días) y **trimestre 3** (T3, 181-nacimiento). Los registros de promedio de ITH diarios fueron facilitados por INTA, Estación Experimental Agropecuaria de la ciudad de Rafaela. Para cada animal se calcularon los *promedios de ITH* y *el porcentaje de días con  $ITH \geq 72$*  durante toda la gestación, en cada periodo y en cada trimestre. Se estableció como límite el valor de  $ITH=72$ , ya que es a partir del cual los mecanismos fisiológicos para disipar calor se vuelven insuficientes en el ganado bovino (Gallardo y Valtorta, 2011). Además, se calculó para cada caso un *“índice de exposición”*, con el fin de discriminar la exposición continua de la exposición a intervalos cortos de ITH elevados. En este punto es importante resaltar que en la cuenca lechera santafesina, sobre todo durante los meses de verano, es frecuente la ocurrencia de olas de calor, definidas como al menos 3 días consecutivos con temperaturas por fuera de los niveles de confort (Hahn y col., 2000). Para el cálculo de este índice se consideraron sólo los días con  $ITH \geq 72$  que se presentaron en ciclos de tres o más días consecutivos y se los relacionó al número de ciclos. Así, un mayor índice de exposición denota que hubo mayor cantidad de días con  $ITH \geq 72$  o que éstos se presentaron en un menor número de ciclos. Es decir, que los ciclos u olas de calor fueron más largos.

### 3.4 PROCEDIMIENTOS CON ANIMALES

#### 3.4.1 Sincronización del ciclo estral

Para garantizar que antes de la toma de muestras ováricas los animales se encontraran en proestro se procedió a la sincronización de celos. Para ello se aplicó el protocolo adaptado G6G seguido por Ovsynch (Bello y col., 2006; Díaz y col., 2016) (**Figura 8**). Se determinó como día 0 del protocolo el día de inicio de la sincronización. Al comenzar se aplicaron dos dosis de  $PGF2\alpha$  (150  $\mu$ g D + cloprostenol; Enzaprost DC, Biogénesis-

Bagó, Garín, Buenos Aires, Argentina) separadas por 12 horas para inducir la luteólisis (Hatler y col., 2008), seguido de una dosis de GnRH (20 µg acetato de buserelina; Gonaxal, Biogénesis-Bagó, Argentina) dos días después para estimular la ovulación de los folículos dominantes presentes (día 2). Seis días posteriores a la primera dosis de GnRH, las vacas recibieron una segunda dosis de GnRH (día 8). Siete días más tarde, recibieron las dos últimas dosis de PGF<sub>2</sub>α, separadas por 12 horas, para inducir la luteólisis (día 15). El día 18 del protocolo, día previo al esperado de ovulación, se realizó la ovariectomía o aspiración del líquido folicular, según correspondiera.



**Figura 8.** Protocolo de sincronización de celos utilizado, adaptado del protocolo G6G seguido de Ovsynch (Bello y col., 2006; Díaz y col., 2015).

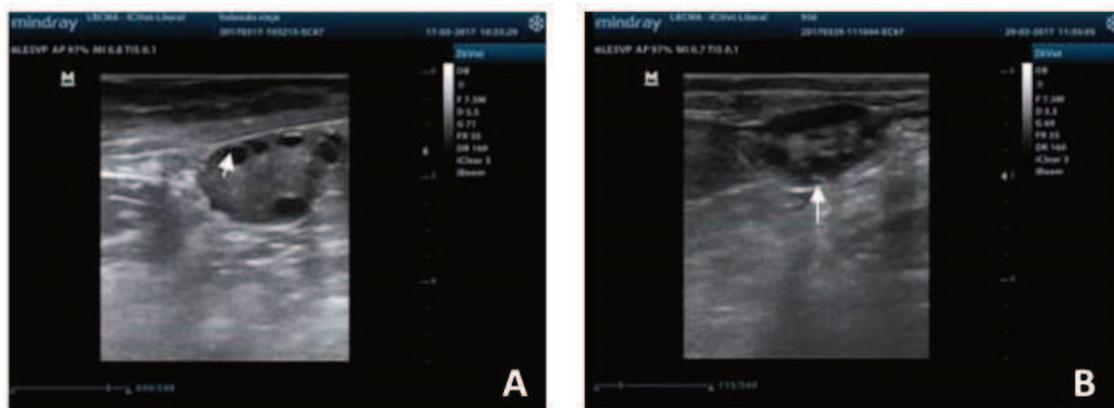
### 3.4.2 Seguimiento de los animales y recuento de folículos antrales

Durante todo el protocolo, el aparato reproductivo de las hembras fue controlado por palpación rectal y por ultrasonografía, de tal forma de evidenciar algún cambio que ocurriese durante el ciclo. Para dicha evaluación se utilizó un ecógrafo Mindray Z6 Vet con un transductor transrectal lineal.

Además, se llevó a cabo la evaluación de la dinámica folicular contabilizando por ecografía transrectal la cantidad de folículos antrales iguales o mayores a tres milímetros de diámetro (n=80) (RFA, recuento de folículos antrales). Dicho parámetro es utilizado como indicador de fertilidad (Ireland y col., 2011) (**Figura 9**) y se llevó a cabo 48 hs luego de la aplicación de la primera dosis de GnRH, en coincidencia con el reclutamiento folicular y el pico de cantidad de folículos en ambos ovarios (Burns y col., 2005). El mismo método se implementó en hembras cuyo destino fue la obtención

de ovarios por ovariectomía bilateral o la aspiración de líquido folicular. En todos los casos se tomaron muestras de sangre.

Los parámetros considerados normales para proestro fueron: un diámetro medio de los folículos preovulatorios de 15-18 mm, presencia de cuerpo lúteo en regresión, presencia de tono uterino, presentación de comportamiento de celo el día 18-20 del ciclo estral.



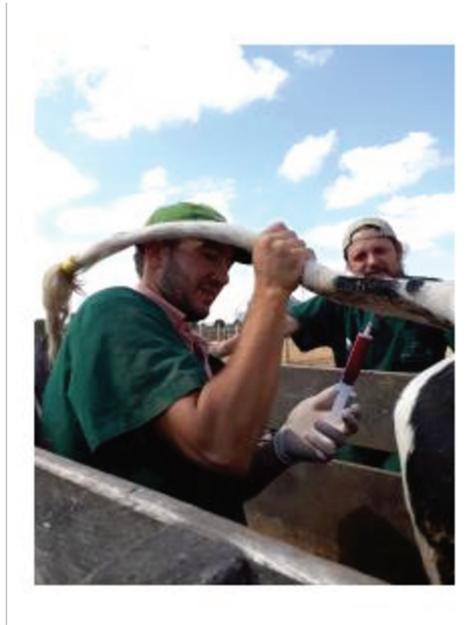
**Figura 9.** Imágenes representativas de ovarios bovinos (A y B) durante la evaluación por ultrasonografía donde se observa la presencia de folículos antrales (flecha blanca).

### 3.5 Obtención de muestras

Una vez realizada la sincronización de celos en las vacas, el día previo al esperado de ovulación se obtuvieron diferentes muestras: 1) Sangre; 2) ovarios completos (26 vacas con indicación de rechazo por motivos no reproductivos) y 3) líquido folicular (41 vacas sin indicación de rechazo). Los ovarios completos fueron obtenidos mediante ovariectomía bilateral por flanco izquierdo, mientras que la extracción de líquido folicular se realizó mediante aspiración folicular guiada por ecografía como se detalla más adelante. Por otro lado, se recabó información acerca de la alimentación, niveles de producción, manejo e índices reproductivos, para un posterior análisis en trabajos paralelos dentro de nuestro grupo de investigación.

### 3.5.1 Muestras de sangre

Para todos los casos se obtuvieron muestras de sangre con y sin anticoagulante al momento de la ovariectomía, de la aspiración folicular o el recuento de folículos antrales. Para ello se utilizaron agujas 25/12 (25 mm largo x 1,2 mm diámetro) acopladas a jeringas plásticas de 20 ml. La técnica de extracción utilizada fue la de punción a través de vasos coccígeos en la zona ventral de las primeras vértebras coccígeas (**Figura 10**).



**Figura 10.** Técnica de extracción sanguínea a través de la punción de los vasos coccígeos.

### 3.5.2 Muestras de aspirado folicular

Para la aspiración del líquido folicular del folículo preovulatorio dominante se adaptó la técnica de Seneda y col. (2003) que ha sido ampliamente utilizada en la obtención de muestras para estudios moleculares. Para ello se utilizó un equipo de ultrasonografía Chison 8300Vet 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 metálica la cual le brinda rigidez a un conducto de teflón, la cual lleva colocada una aguja de 20 G en un extremo y en el otro descarga el contenido en un tubo cónico de 50 ml. A su vez, al mismo tubo cónico, se

encuentra conectada una tubuladura de goma que se une a una bomba de vacío (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil) la cual facilita el aspirado del líquido folicular. La presión de aspiración utilizada fue de 500 mmHg. Para este procedimiento se realizó, en primer lugar, la sujeción del animal. Luego se le practicó una anestesia epidural baja mediante la aplicación de 5 ml de clorhidrato de lidocaína (Lidocaína 2%, Over®) en el espacio sacrococcígeo. A continuación, la sonda se introdujo por vía vaginal hasta contactar con el fondo de vagina. Al mismo tiempo a través del recto se localizó el ovario de interés y se lo acercó próximo al transductor microconvexo acoplado a la sonda. Seguidamente se introdujo la aguja a través de la pared vaginal y posteriormente a través de la pared folicular para proceder a la aspiración del líquido folicular. Inmediatamente de recolectada la muestra, se conservó a una temperatura de entre 4 y 6°C y se trasladó al laboratorio para su procesamiento (**Figura 11**).



**Figura 11.** Técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonografía utilizando una sonda transvaginal. A) Técnica de aspiración folicular mediante una guía acomplada a una bomba de vacío. B) Imagen ultrasonográfica del folículo preovulatorio previo a su aspiración. C) Tuvo cónico con la muestra de líquido folicular obtenido por aspiración.

### 3.5.3 Muestras de ovarios completos

Los ovarios completos se obtuvieron mediante ovariectomía bilateral por flanco izquierdo con el animal en pie. Inmediatamente después de la sujeción del animal se le aplicó una dosis intramuscular de 6-8 mg de clorhidrato de xilazina (xilazina 2 % Over®). A continuación, se llevó a cabo la tricotomía de la zona a intervenir para posteriormente realizar una anestesia local infiltrativa por medio de la técnica Magda modificada, “L” invertida o infiltrativa del flanco y epidural baja en el espacio sacrococcígeo (Garnero y Perusia, 2002) utilizando 160 ml, 40-100 ml y 1 ml/100 kg de

peso vivo respectivamente de clorhidrato de lidocaína (Lidocaína 2 %, Over®). Luego de la antisepsia de la zona se procedió con una incisión desde caudo-dorsal hacia cráneo-ventral de la piel en un primer paso y luego de los planos musculares de la pared abdominal izquierda, de una longitud suficiente para facilitar al cirujano el acceso a la cavidad abdominal. Se localizó el ovario derecho y se colocó una pinza hemostática Kocher modificada ad hoc (sin diente) y se realizó la ligadura del pedículo ovárico por transfixión con hilo de lino no absorbible simple. Luego, se seccionó con tijera y se extrajo el ovario (de la misma forma se procedió con el ovario izquierdo). Para finalizar se suturaron los planos musculares y la piel y se trataron los animales con antibióticos sistémicos, coagulantes, antiinflamatorios y antiparasitarios externos durante 3 días (**Figura 12**).



**Figura 7.** Técnica de ovariectomía bilateral por flanco izquierdo. A) Ultrasonografía transrectal para confirmar la presencia del folículo preovulatorio. B) Imagen ultrasonográfica del folículo preovulatorio. C) Instrumental utilizado para la cirugía. D) Ligadura de los vasos adyacentes a los ovarios. E) Ovario sujetado por la pinza hemostática previo a ser retirado. F) Sutura de las capas musculares de la pared abdominal y la piel.

### 3.6 PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA) del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral),

Universidad Nacional del Litoral – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

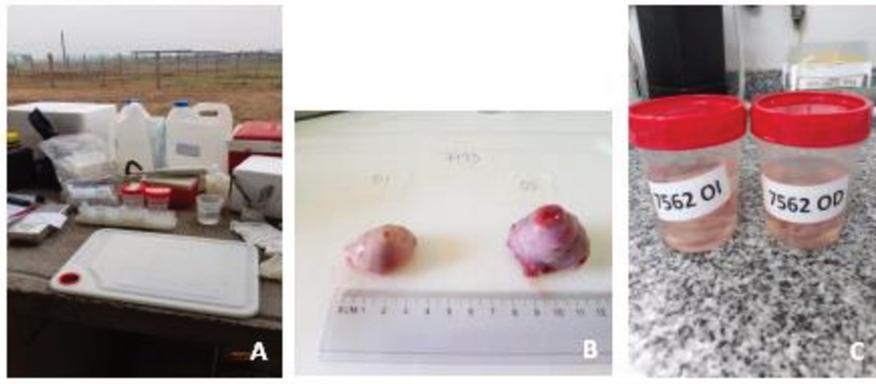
- **Muestras de sangre**

Las muestras de sangre sin anticoagulante se mantuvieron a 37 °C durante 30 minutos, se llevaron a 4 °C por 1 hora y finalmente se centrifugaron a 2000 G por 10 minutos para extraer el suero. Las muestras de sangre con anticoagulante se mantuvieron refrigeradas a una temperatura de entre 2 y 6 °C por al menos 30 minutos y luego se centrifugaron a 2000 G por 10 minutos para la extracción del plasma. Las muestras de suero y plasma fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior utilización.

Por su parte, una alícuota de sangre entera anticoagulada se separó y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenó a -80 °C hasta su posterior utilización.

- **Muestras de ovarios completos**

Se realizó la evaluación macroscópica del par ovárico para identificar el folículo preovulatorio, teniendo en cuenta la información obtenida por ultrasonografía. Se aspiró el líquido folicular del folículo preovulatorio con jeringa de 1 ml y aguja 25 G, lentamente con la precaución de no separar las células de la granulosa. Luego se tomó una porción de pared del mismo folículo. Ambas muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. Posteriormente los ovarios fueron fijados en formol bufferado 10% por un tiempo de entre 8 y 12 horas a temperatura ambiente y se procesaron siguiendo protocolos de rutina hasta su inclusión en parafina (**Figura 13**).



**Figura 8.** Procesamiento de ovarios. A) Material para procesamiento utilizado a campo. B) Par ovárico obtenido listo para su procesamiento. C) Ovarios en formol bufferado para su fijación y utilización en técnicas histológicas, previa obtención de líquido y una porción de pared folicular del folículo preovulatorio para técnicas moleculares.

- **Muestras del aspirado folicular**

El líquido folicular y células de la granulosa obtenidos por aspiración folicular guiada por ecografía fueron separados mediante centrifugación a 2000 G durante 10 minutos a 4 °C (Centrífuga Sorvall ST16R, Thermo Scientific, USA). Como resultado se obtuvo un precipitado de células de la granulosa y un sobrenadante de líquido folicular. Ambas muestras se almacenaron por separado a -80 °C hasta su utilización.

### 3.6.1 Destino de cada muestra

Tanto el líquido folicular como el plasma se utilizaron para la medición de diferentes hormonas, mientras que la sangre completa fue empleada para la evaluación de modificaciones epigenéticas globales. Por su parte la pared folicular se procesó para evaluar la expresión génica mediante PCR en tiempo real, y para la posterior evaluación de modificaciones epigenéticas específicas. En el caso de los ovarios completos, se los destinó para la determinación de la expresión proteica de los receptores de hormonas esteroideas y correguladores mediante la técnica de inmunohistoquímica indirecta.

### 3.6.2 Procesamiento de muestras para PCR en tiempo real

#### 3.6.2.1. Extracción de ARN total

Se realizó a partir de las muestras de pared folicular en un procedimiento de doble extracción, de la siguiente manera:

Se tomó una porción de tejido de aproximadamente 50 mg, se colocó en un tubo con 750  $\mu$ l del reactivo TRIzol<sup>®</sup> LS Reagent (Invitrogen) y luego se procedió a la homogeneización del tejido con un homogeneizador manual (Ultra Turrax<sup>®</sup> IKA T10 Basic) hasta lograr la dispersión total del mismo. La suspensión celular obtenida fue incubada durante 5 min a temperatura ambiente y luego se agregaron 150  $\mu$ l de cloroformo, agitando vigorosamente en vórtex (ZX Classic, VELP Científica<sup>®</sup>) para favorecer el contacto entre las fases. Se dejó reposar la mezcla por 5 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 14000 g durante 15 min a 4 °C (centrífuga Sorvall Legend Micro 21R, Thermo Scientific, USA), permitiendo la separación de fases. De la fase acuosa (superior) se tomó un volumen no superior al 70 % y se transfirió a otro tubo con 750  $\mu$ l de TRIzol LS para realizar una segunda extracción. Se homogeneizó con vórtex, se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó nuevamente a 14000 g durante 15 min a 4 °C. Se tomó aproximadamente el 70 % de la fase acuosa y se trasvasó a un tubo estéril. Se adicionaron 500  $\mu$ l de isopropanol y 2  $\mu$ l de un coprecipitante (GlycoBlue, Invitrogen), se homogeneizó suavemente por inversión y se incubó toda la noche a -20 °C para favorecer la precipitación del ARN. Posteriormente, se centrifugó a 14000 g durante 45 min a 4 °C. El precipitado de ARN total fue lavado dos veces con etanol 75 % y, una vez evaporado el resto de alcohol, fue resuspendido en agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato, inactivador de ARNasas), precalentada a 60 °C. La concentración y calidad del ARN se determinó espectrofotométricamente (Clario Star, BMG LABTECH), y luego se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

### 3.6.2.2. Transcripción reversa

Inicialmente se trataron las muestras de ARN con ADNasa (DNase I RNase-Free, PB-L) siguiendo las instrucciones del fabricante, de manera de eliminar las posibles contaminaciones de ADN genómico presentes. Para la síntesis del ADN copia (ADNc) se utilizó una cantidad constante de ARN (1 µg) en una mezcla de reacción conteniendo: retrotranscriptasa MMLV (del inglés: Moloney Murine Leukemia Virus, Invitrogen), buffer 5X (Invitrogen), dithiothreitol (DTT, Invitrogen), inhibidor de ribonucleasas (RNaseOUT, Invitrogen), desoxiribonucleotidos trifosfato (dNTP) y cebadores con secuencia al azar. Las condiciones para la transcripción reversa fueron: 10 min a 25 °C para el anillado; 50 min a 37 °C para la síntesis del ADNc; 15 min a 70 °C para la inactivación de la enzima. Todas las reacciones se llevaron a cabo para un volumen final de 20 µl utilizando un termociclador estándar (TC-3000G, Techne Inc., NJ, USA). La concentración y calidad del ADNc se determinó espectrofotométricamente (Clario Star, BMG LABTECH), y luego fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

### 3.6.3 Procesamiento de muestra para evaluación de modificaciones epigenéticas

Se obtuvo el ADN genómico (ADNg) a partir de las muestras de pared folicular y de sangre completa, utilizando un kit comercial basado en columnas de microcentrífuga (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se prepararon los lisados según la muestra de partida, utilizando los reactivos provistos por el kit:

- a) Para muestras de pared folicular, se colocó una porción de tejido de aproximadamente 15-20 mg en un tubo estéril y se le agregaron 180 µl del buffer de digestión y 20 µl de proteinasa K. Se incubó a 55 °C por 3 hs hasta digestión completa del tejido. Se centrifugó 3 min a máxima velocidad (centrífuga MiniSpin®, Eppendorf) y se transfirió el sobrenadante a otro tubo estéril. Se agregaron 20 µl de ARNasa A, 200 µl de buffer de lisis y unión, y 200 µl de etanol absoluto, y se homogeneizó con vórtex, obteniendo de esta manera el lisado.
- b) Para muestras de sangre completa con anticoagulante, se colocaron 200 µl de muestra en un tubo estéril y se le agregaron 20 µl de proteinasa K, 20 µl de

ARNasa A y 200 µl de buffer de lisis y unión. Se incubó a 55 °C por 10 min para promover la digestión proteica. Se agregaron 200 µl de etanol absoluto y se homogeneizó con vórtex, obteniendo el lisado.

Se colocó el lisado correspondiente en una columna de microcentrífuga provista por el fabricante, se centrifugó durante 1 min a 10000 g y se lavó dos veces con *buffers* de lavado provistos por el kit, centrifugando cada vez a máxima velocidad por 3 min. Finalmente, se eluyó el ADNg con 30 µl de *buffer* de elución provisto en el kit.

La concentración y calidad del ADNg fueron determinadas espectrofotométricamente (Clario Star, BMG LABTECH), y luego el ADN fue almacenado a -20 °C hasta su utilización.

#### **3.6.4 Procesamiento histológico para la técnica de inmunohistoquímica**

Los ovarios completos fueron procesados mediante técnicas histológicas de rutina. Luego de la fijación con formol bufferado 10% por 8-12h, las muestras fueron lavadas en buffer fosfato salino (PBS), reducidas en su tamaño y procesadas siguiendo el protocolo descrito por Salvetti y col. (2010) para finalmente ser incluidas en parafina. Para esto las muestras fueron deshidratadas en sucesivas concentraciones crecientes de etanol, aclaradas en xileno y posteriormente incluidas en parafina. Se realizaron secciones de 4 µm de espesor con un micrótopo rotativo (Leica RM2245), los cuales fueron montados en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropil-triethoxisilane (Sigma, USA) y luego se secaron a 37 °C durante 24 horas. Como etapa inicial, se utilizó una coloración de hematoxilina-eosina de manera de evidenciar las diferentes estructuras que componen el ovario.

### **3.7 CUANTIFICACIÓN HORMONAL**

#### **3.7.1 Determinación de 17β estradiol, progesterona, testosterona**

Los niveles de 17β-estradiol, progesterona y testosterona, a nivel sistémico e intrafolicular (n=67), se midieron en un laboratorio privado externo. Las

determinaciones se realizaron mediante kits de inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA, del inglés: electrochemiluminescence immunoassay) (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) en un sistema COBAS e411 (Roche Diagnostics), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, que se validaron previamente en bovinos (Díaz y col., 2015). La sensibilidad del ensayo fue de 5,00 pg/ml para el 17 $\beta$ -estradiol, 0,05 ng/ml para la progesterona y 0,025 ng/ml para la testosterona.

### **3.7.2 Determinación de AMH (hormona anti-mülleriana)**

Se determinó la concentración de AMH en líquido folicular (n=48) utilizando un kit comercial de ELISA (Beckman Coulter, Inc., USA, referencia A73818). Se siguieron las instrucciones del fabricante, realizando una curva estándar de 7 puntos, para lo cual se utilizaron los calibradores correspondientes (Beckman Coulter, Inc., USA, referencia A73819). Se determinó la absorbancia (OD) de cada calibrador y de las muestras en un lector de microplacas (Clario Star, BMG LABTECH), a una longitud de onda de 450 nm con corrección a 600 nm. La concentración de cada muestra luego se calculó por extrapolación de la curva estándar.

## **3.8 ANÁLISIS DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA**

### **3.8.1 Evaluación de la expresión génica de los receptores de estrógenos $\alpha$ , $\beta$ y de progesterona**

La evaluación de la expresión génica relativa se realizó mediante PCR en tiempo real sobre el ADNc obtenido a partir de la pared de folículos preovulatorios. Se evaluó la expresión de  $\beta$ -actina y  $\beta$ 2-microglobulina (B2M) como genes constitutivos de referencia con el objetivo de seleccionar el más representativo. Dicha selección se basó en la variación Ct (referida a la desviación standard) entre grupos escogiendo B2M como gen de referencia para el análisis (Baddela y col., 2014).

### 3.8.1.1 Diseño de cebadores específicos

Los cebadores para RE $\alpha$ , RE $\beta$  y RP fueron obtenidos de trabajos previos en nuestro laboratorio (Alfaro y col 2012). A partir de las secuencias de ARNm correspondientes a  $\beta$ -actina y B2M, obtenidas de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>), se diseñaron los cebadores específicos para su amplificación. Para el diseño se utilizó la herramienta *PrimerQuest Tool* de la plataforma [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com). Para la verificación de la especificidad de todos los cebadores se utilizó la herramienta *Olygo Analyzer Tool* de la misma plataforma y la aplicación del programa Primer Select LASERGENE (DNASStar, WI, USA). Los oligonucleótidos utilizados fueron provistos por Invitrogen. A su vez, se verificó su especificidad mediante la comparación directa de la secuencia con el genoma de *Bos taurus* usando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### 3.8.1.2 Amplificación por PCR en tiempo real

Para el análisis de la expresión de ARNm de RE $\alpha$ , RE $\beta$  y RP total en pared follicular por PCR en tiempo real se utilizó el equipo StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems, Life Technology, Carlsbad, CA, USA) y SYBR Green I (Invitrogen). Se aplicó un protocolo optimizado: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 38 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, anillado a 64°C (RE $\alpha$ ), 60°C ( $\beta$ -actina), 57°C (B2M) por 20 segundos, 54, 1°C (RE $\beta$ ) y 51, 2°C (RP total) durante 25 segundos, lectura de extensión y fluorescencia a 72°C por 25 segundos (**Tabla 1**). Las mediciones para cada muestra se realizaron por duplicado y la variación entre pruebas (CV) se calculó como lo describió Bustin y col. (2009). La eficiencia de las reacciones de PCR y las cantidades relativas fueron determinadas por una curva standard y la eficiencia de PCR se calculó mediante el software StepOne v2.3. Los niveles de expresión de ARNm se registraron según los valores de su Ct (ciclo umbral, del inglés *cycle threshold*), correspondiente al número de ciclos en los que la señal de fluorescencia podría detectarse por encima de un valor umbral. Aquellas reacciones con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) mayores a 0,98 y una eficiencia entre 95 y 105% fueron consideradas óptimas. Se incluyeron controles negativos en todos los ensayos los que

no produjeron amplificación consistente. La pureza del producto se confirmó mediante curvas de disociación. Todos los productos de PCR se procesaron en geles de agarosa para verificar los tamaños de dichos productos. La especificidad de los productos de PCR se comprobó mediante secuenciación para verificar la amplificación de las secuencias correctas, utilizando el Servicio de secuenciación de Macrogen (Macrogen, Corea).

**Tabla 1.** Pares de cebadores utilizados en PCR en tiempo real. N° de acceso correspondiente a cada gen, secuencias sentido y antisentido (5' 3') de los oligonucleótidos, tamaño de los fragmentos amplificados y temperaturas de anillado.

Nombre	Secuencia (5' 3')	N° de acceso	Tamaño del fragmento	Temperatura de anillado (°C)
RE $\alpha$	Sentido: AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC Antisentido: CGGTGGATGTGGTCCTTCTCT	AY862875	234 pb	64
RE $\beta$	Sentido: CTTCGTGGAGCTCAGCCTGT Antisentido: GAGATATTCTTTGTGTTGGAGTTT	NM_174051	241 pb	54.1
RPtotal	Sentido: GAGATCTTATAAGCATGTCAGTGG Antisentido: TCATGCAAGTTATCAAGAAGTTT	XM_583951	360 pb	51.2
$\beta$ -actina	Sentido: ACCCACA CTGTGCCCATCTA Antisentido: CGGAACCGCTCATTGCC	BT030480.1	290 pb	60
B2M	Sentido: GCGTCCTCCAAGATTCAAG Antisentido: GGTCTGACTGCTCCGATTTA	NM_173893.3	152 pb	57

### 3.8.1.3 Cálculo de la expresión génica relativa

Los niveles relativos de ARNm se cuantificaron mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Como gen constitutivo de referencia se seleccionó B2M debido a que se observó que el mismo presenta valores de  $C_t$  similares entre las diferentes

muestras, además de tener niveles de expresión semejantes a los del gen de interés, lo cual no ocurrió con la expresión de  $\beta$ -actina. Los niveles relativos de transcripto de cada muestra se expresaron en relación con la expresión en las muestras de aquellos animales con baja exposición a estrés térmico durante toda la vida intrauterina ( $\leq 20\%$  días con  $ITH \geq 72$ ). Tal como fue detallado previamente, en nuestra zona geográfica ocurren largas temporadas con  $ITH$  elevados, por lo que no disponemos de muestras obtenidas de animales que no hayan cursado ningún período de estrés por calor durante su vida intrauterina.

### **3.8.2 Evaluación de modificaciones epigenéticas**

#### **3.8.2.1 Análisis del estado de metilación global del ADNg**

Se determinó el estado de metilación global (Arroyo-Jousse y col., 2015) de los animales en muestras de ADNg extraídas de sangre completa como parámetro de sus niveles transcripcionales generales. Para esta prueba se utilizó un kit comercial (Abcam®, Methylated DNA Quantification Kit – Colorimetric; referencia ab117128) en el cual el ADN se une a pocillos específicamente tratados para tener alta afinidad hacia el mismo. La fracción de ADN metilado fue detectada utilizando anticuerpos de captura y de detección provistos por el fabricante, y luego cuantificada colorimetricamente a través de la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro para microplacas (Clario Star, BMG LABTECH). La cantidad absoluta de ADN metilado fue proporcional a la densidad óptica medida, y se determinó realizando una curva standard de 5 puntos con los reactivos provistos por el kit.

#### **3.8.2.2 Evaluación del grado de metilación de la región promotora para los genes de los receptores de estrógenos $\alpha$ y $\beta$**

Dentro de las posibles modificaciones epigenéticas involucradas específicamente en la regulación de la expresión de los  $RE\alpha$  y  $\beta$ , se llevó a cabo la evaluación del estado de metilación de la región 5'UTR de los respectivos receptores, donde se hallan los promotores encargados de la regulación de la transcripción.

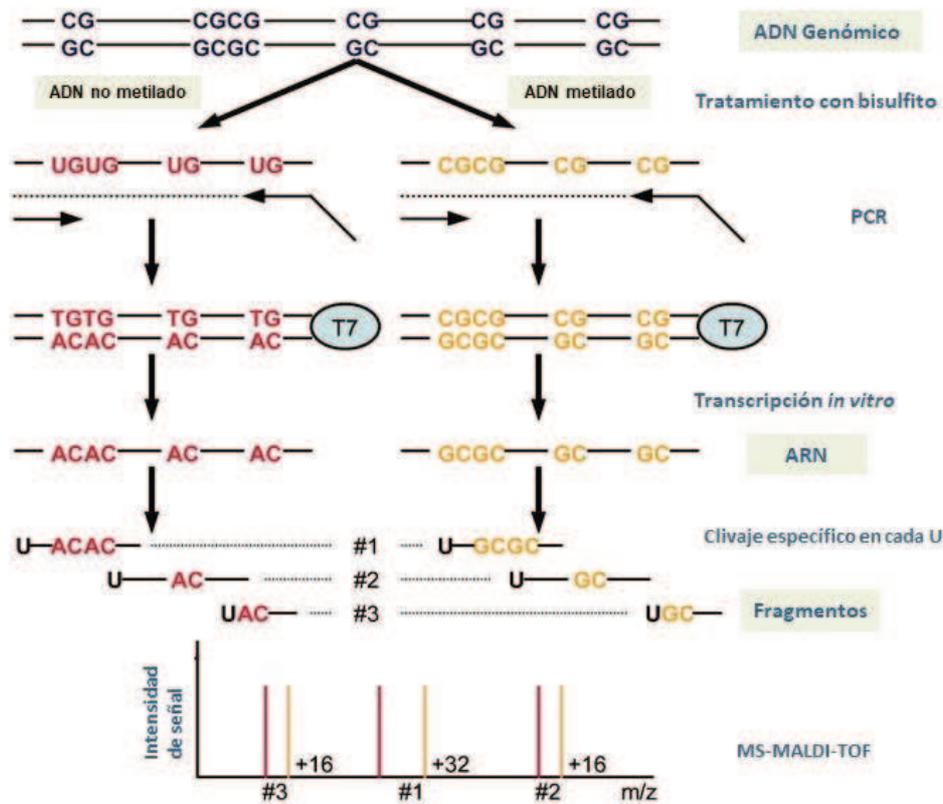
### 3.8.2.2.1 Análisis del grado de metilación de CpG: EpiTYPER

La técnica EpiTYPER (Agena Biosciences, USA) fue realizada por el servicio externo del Laboratorio de Epigenética y Cromatina (INCLIVA), en la Universidad de Valencia, España. La misma se llevó a cabo sobre el ADNg aislado de la pared de folículos preovulatorios. Su método se fundamenta en detectar cuantitativamente la metilación del ADN a través del clivaje sitio-específico de ADNg tratado con bisulfito de sodio y su posterior análisis mediante espectrometría de masas con un detector MALDI-TOF (del inglés: *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) (Ehrich y col., 2005; Kunze, 2018).

En esta técnica el ADNg fue tratado con bisulfito de sodio utilizando un kit comercial (EZ-96 DNA Methylation Kit, Zymo Research). En este paso, las citosinas (C) no metiladas fueron convertidas a uracilos (U) mientras que las C metiladas permanecieron sin alteraciones, protegidas por el grupo metilo. Cada muestra de ADNg se analizó por triplicado en placas multipocillos. Luego el ADNg tratado con bisulfito fue amplificado por PCR, utilizando cebadores específicamente diseñados, de manera que los U sean reemplazados por timinas (T). Así, dependiendo de la presencia o no del grupo metilo en cada sitio CpG, se produjeron cambios CxT en la secuencia.

A continuación, se realizó una transcripción *in vitro* sobre la cadena reversa del producto de PCR, seguida del clivaje sitio-específico en cada U de la molécula de ARN resultante, utilizando ARNasa A. De esta manera, se generaron fragmentos de diferentes tamaños y masas, que fueron analizados por MS-MALDI-TOF. La abundancia de cada fragmento (nivel de señal en el espectro) es indicativo de la cantidad de ADN metilado en la secuencia analizada. En este procedimiento, los fragmentos resultantes de cada sitio CpG, provenientes de moléculas de ADNg metilado o no metilado, tienen el mismo tamaño, pero diferente composición de nucleótidos. Es decir, a partir de un sitio metilado, que conserva su C, se obtiene una molécula de ARN con una guanina (G) en ese sitio. A partir de un sitio no metilado, en el que la C se convirtió en U, se genera una molécula de ARN con una adenosina (A) en dicha posición. Este cambio GxA se

observa en los gráficos generados por MS-MALDI-TOF, como picos con diferencia de masa de 16 Da (**Figura 14**).



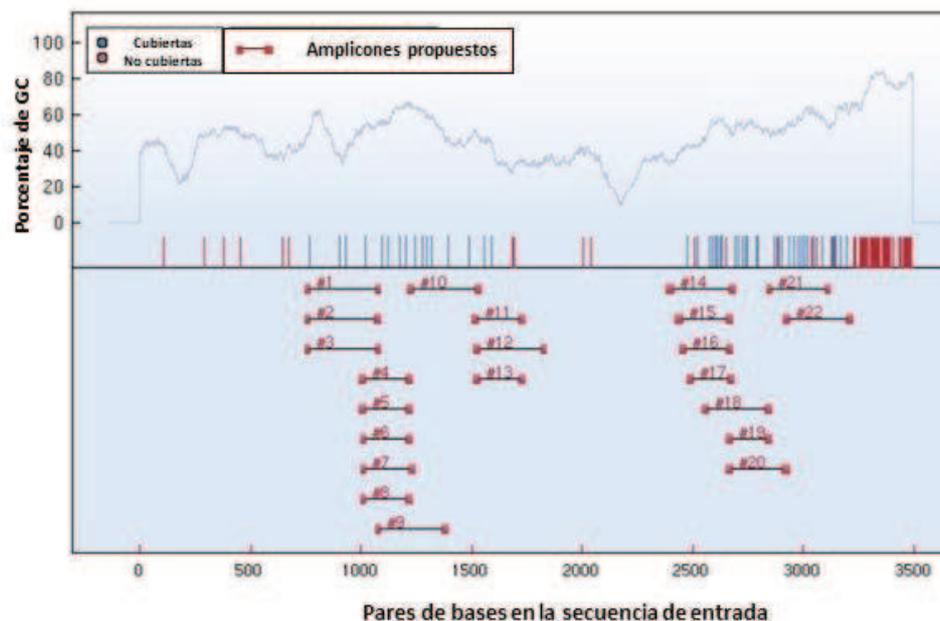
**Figura 9.** Gráfico de la técnica EpiTYPER. El ADNg es amplificado por PCR utilizando cebadores específicos a través de un promotor T7 luego de ser tratado con bisulfito. El producto de PCR es transcripto *in vitro* y el ARN resultante es segmentado (clivaje) en cada U de manera sitio-específico. Los fragmentos obtenidos presentan diferentes tamaños y son analizados por MS-MALDI-TOF, obteniendo así un patrón de señal específico para cada masa. La señal roja corresponde al ADNg no metilado y la señal amarilla al ADNg metilado. El fragmento #1 presenta dos sitios CG contíguos, de manera tal que al encontrarse ambos metilados o no, los fragmentos obtenidos mostrarán una diferencia en la señal de masa de 32 Da. Mientras que para los fragmentos #2 y #3 la diferencia de masas es de 16 Da ya que ambos tienen sólo un sitio de metilación. Adaptado de Ehrich y col. (2005).

### 3.8.2.2.2. Cebadores utilizados

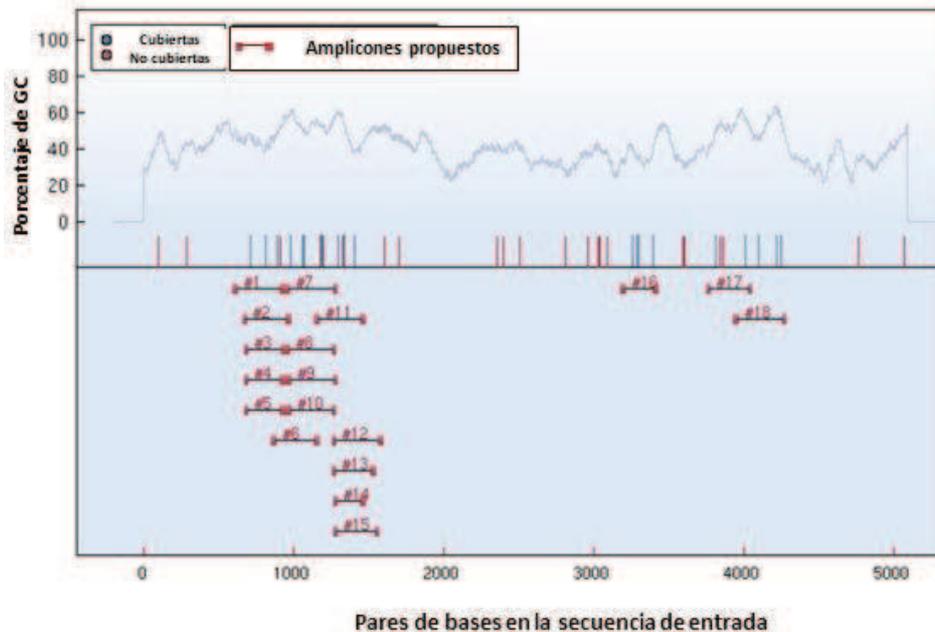
Tal como se describió previamente, para la amplificación por PCR, se diseñan cebadores específicos para la región de interés dentro de la secuencia a evaluar, y que contienen una secuencia para un promotor T7. Esto permite la posterior transcripción *in vitro* del producto de PCR. Para este trabajo de tesis, a partir de la secuencia 5'-UTR del gen del RE $\alpha$  y  $\beta$ , en la Universidad de Valencia, se diseñaron y propusieron una

serie de cebadores específicos a través de la plataforma Epidesigner (<http://www.epidesigner.com/>, Agena Biosciences, USA). Los amplicones correspondientes, que abarcan distintas secciones de la región de interés, se representan en las **Figuras 15 y 16**.

Como se observa en la figura 15, algunas CpG están muy cercanas una a la otra (regiones en rojo), de manera que no pueden ser discriminadas para evaluarse mediante esta técnica. Teniendo en cuenta la ubicación de los promotores se seleccionaron para ser evaluados los amplicones correspondientes que permiten abarcar la mayor cantidad de sitios de metilación (CpG).



**Figura 10.** Esquema representativo de amplicones diseñados para evaluar el estado de metilación de la región 5'-UTR del gen del ERalfa. La línea horizontal representa la secuencia nucleotídica de la región a evaluar. Las líneas verticales azules representan CpGs que se pueden evaluar, y las líneas verticales rojas representan CpGs que no se pueden evaluar debido a la proximidad entre ellas. Las líneas horizontales numeradas del 1 al 22 representan los amplicones diseñados por la Universidad de Valencia, abarcando distintas secciones de la región de interés. Esquema provisto por el Laboratorio de Epigenética y Cromatina (INCLIVA, en la Universidad de Valencia, España), obtenido del sitio <http://www.epidesigner.com/> (Agena Biosciences, USA). Los cebadores elegidos para el análisis fueron el 1, 14 y 21.



**Figura 11.** Esquema representativo de amplicones diseñados para evaluar el estado de metilación de la región 5'-UTR del gen del ERbeta. La línea horizontal representa la secuencia nucleotídica de la región a evaluar. Las líneas verticales azules representan CpGs que se pueden evaluar, y las líneas verticales rojas representan CpGs que no se pueden evaluar debido a la proximidad entre ellas. Las líneas horizontales numeradas del 1 al 18 representan los amplicones diseñados por la Universidad de Valencia, abarcando distintas secciones de la región de interés. Esquema provisto por el Laboratorio de Epigenética y Cromatina (INCLIVA, en la Universidad de Valencia, España), obtenido del sitio <http://www.epidesigner.com/> (Agena Biosciences, USA). Los cebadores elegidos para el análisis fueron el 11,16 y 18.

### 3.10 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DEL REA, REB Y RP Y LOS CORREGULADORES SRC-1, LCOR, RIP-140, REA-330 Y SMRT

#### 3.10.1 Evaluación de la especificidad de los anticuerpos primarios

La especificidad de los anticuerpos utilizados para la detección y cuantificación de la expresión proteica fue determinada por la técnica de Western Blot (WB). La especificidad de algunos de los anticuerpos utilizados en esta tesis fue demostrada en

trabajos previos en nuestro grupo (**Tabla 2**). La especificidad de los corre reguladores LCor y SRC-1 fue determinada mediante western blot.

#### **3.10.1.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con un tamaño de poro correspondiente a la concentración de 10% de acrilamida y luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Las muestras fueron obtenidas a partir de la pared folicular, homogeneizadas con buffer de lisis de radioinmunoprecipitación (RIPA) conteniendo un 10% de inhibidor de proteasas (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tables, Roche, Mannheim, Germany). Se diluyeron en buffer de muestra y se incubaron en baño termostático en ebullición durante cinco minutos. Se sembraron 40 µg de proteínas por calle, considerando la concentración del homogeneizado, determinada previamente por el método Lowry utilizando para las lecturas y cálculo de concentraciones el espectrofotómetro y el software provisto por el mismo (Clario Star, BMG LABTECH). La electroforesis se realizó en una cuba vertical (Mini-PROTEAN, Bio-Rad) utilizando un buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1% de SDS a un pH 8,3. Luego, la transferencia a la membrana de nitrocelulosa se re realizó a 100 V, en frío, durante 1:30 hs, utilizando un buffer de transferencia Twin modificado (Tris-Glicina y 20% de metanol). Las membranas resultantes se colorearon con Rojo Ponceau para comprobar la efectividad de la transferencia, luego se lavaron con agua destilada para retirar el sobrante de colorante y se almacenaron a 4°C hasta el momento de la inmunodetección.

#### **3.10.1.2. Western Blot**

Para la inmunodetección de las proteínas en la membrana de nitrocelulosa se empleó el siguiente procedimiento:

- 1) Hidratación de la membrana con Tris buffer salino conteniendo 0,05% de Tween 20 (TBS-T), 15 min a temperatura ambiente.

2) Bloqueo los sitios de unión inespecíficos con leche al 5% diluida en TBS-T, 1 h a temperatura ambiente y en agitación.

3) Lavado a temperatura ambiente en agitación (agitador orbital BOECO OS-10, Alemania) con TBS-T: 2 lavados rápidos y 5 lavados de 5 min.

4) Incubación con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4 °C. Para la dilución del anticuerpo primario se utilizó TBS-T leche 0,5% (SRC-1: 1:100; LCoR: 1:100; RIP-140: 1:100).

5) Lavado a temperatura ambiente en agitación con TBS-T: 2 lavados rápidos y 5 lavados de 5 min.

6) Incubación con el anticuerpo secundario según cada caso, durante una 1:30 h a temperatura ambiente en agitación. Para la dilución se utilizó TBS-T leche 0,5%.

7) Lavado a temperatura ambiente en agitación con TBS-T: 2 lavados rápidos y 5 lavados de 5 min.

8) Incubación con reactivo quimioluminiscente (ECL Plus, GE Healthcare).

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

Se detectaron las bandas específicas en la zona de 160 kDa para SRC-1, 140 kDa para RIP-140 y 50 kDa para LCoR además de algunas bandas no específicas con menor intensidad.

**Tabla 2.** Especificidad de los anticuerpos primarios utilizados en IHQ.

Anticuerpo primario	Referencia
RE $\alpha$ Monoclonal (Clon 1D5. Cat N $^{\circ}$ M7047, Dako, CA, USA)	Salveti y col., 2012
RE $\beta$ Policlonal (Cat. N $^{\circ}$ PU385-UP, BioGenex, CA, USA)	Salveti y col., 2012
RP Monoclonal (Clon PR88. Cat. N $^{\circ}$ MU328-UC, BioGenex, CA, USA)	Salveti y col., 2012
SRC1 Policlonal (Cat. N $^{\circ}$ sc-8995 M-341, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)	Esta tesis
REA Policlonal (Cat. N $^{\circ}$ LETH-REA330, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Santa Fe, Argentina)	Salveti y col., 2012
SMRT-180 Policlonal (Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Santa Fe, Argentina)	Salveti y col., 2012
LCoR Policlonal (Cat. N $^{\circ}$ sc-134674 H-195, Santa Cruz Biotechnology,	Esta tesis

Inc., CA, USA)	
RIP140 Policlonal (Cat. Nº sc-8897 H-300, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)	Esta tesis

### 3.10.2. Técnica de inmunohistoquímica indirecta para la detección y cuantificación de la expresión proteica

Se utilizaron cortes histológicos de ovario bovino, como fuera mencionado anteriormente, para localizar y cuantificar la expresión proteica de RE $\alpha$ , RE $\beta$ , RP y los correguladores SRC-1, LCor, RIP-140, REA y SMRT por inmunohistoquímica indirecta con los anticuerpos específicos comerciales.

Se empleó el siguiente protocolo (Salveti y col., 2012):

- 1) Acondicionamiento de los cortes durante 10 minutos en estufa a 60 °C.
- 2) Desparafinación en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 y 10 minutos, respectivamente.
- 3) Hidratación seriada en alcoholes de graduación decreciente: etanol absoluto (dos pasajes de 2 minutos), etanol 96° (un pasaje de 2 minutos) y finalmente etanol 70° (un pasaje de 2 minutos).
- 4) Lavado en PBS pH 7,2 durante 5 minutos.
- 5) Tratamiento de recuperación antigénica en horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 800 W). Como solución de recuperación se usó buffer citrato 0,01 M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en un recipiente couplin sumergido parcialmente en un baño con agua destilada, y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación convencional: 3 minutos al 100% de potencia, 6 minutos al 40% de potencia, 6 minutos al 40% y 20 minutos dentro del microondas apagado. Entre los diferentes pasos se recargó el recipiente couplin con agua destilada en ebullición.
- 6) Lavado en PBS durante 5 minutos.
- 7) Inactivación de la peroxidasa endógena: se incubaron los cortes durante 10 minutos en una solución al 3 % de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto, agregando nuevamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno por 10 minutos más.
- 8) Tres lavados de 5 minutos en PBS.
- 9) Incubación en cámara húmeda con anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C en las diluciones adecuadas para las proteínas a detectar (**Tabla 3**). Para los controles de especificidad (controles negativos) se sustituyó el anticuerpo primario por PBS-BSA.
- 10) Dos lavados durante 5 minutos en PBS.

- 11) Incubación en cámara húmeda con anticuerpo secundario universal (Cytoscan HRP Detection System Cell Marque), durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 12) Dos lavados durante 5 minutos en PBS.
- 13) Incubación con complejo streptavidina-peroxidasa (Cytoscan HRP Detection System Cell Marque) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 14) Cinco lavados durante 5 minutos en PBS.
- 15) Revelado de la reacción con 3-3'-diaminobencidina (DAB Substrate Kit, Cell Marque, referencia 957D-20). Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y estandarizarlo.
- 16) Dos lavados de 5 minutos en agua destilada.
- 17) Coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur®), deshidratación y montaje con bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur®) y cubreobjetos acorde al tamaño de la muestra.

**Tabla 3.** Anticuerpos utilizados, dilución y tipo de recuperación antigénica utilizada en cada caso para la técnica de inmunohistoquímica indirecta.

Anticuerpo primario	Dilución
RE $\alpha$ Monoclonal (Clon 1D5. Cat N° M7047, Dako, CA, USA)	1/50
RE $\beta$ Policlonal (Cat. N° PU385-UP, BioGenex, CA, USA)	1/100
RP Monoclonal (Clon PR88. Cat. N° MU328-UC, BioGenex, CA, USA)	1/200
SRC1 Policlonal (Cat. N° sc-8995 M-341, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)	1/200
RIP140 Policlonal (Cat. N° sc-8897 H-300, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)	1/300
REA Policlonal (Cat. N° LETH-REA330, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Santa Fe, Argentina)	1/150
SMRT-180 Policlonal (Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Santa Fe, Argentina)	1/25
LCoR Policlonal (Cat. N° sc-134674 H-195, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)	1/50

### 3.10.3. Análisis digital de imágenes

Se digitalizaron imágenes del folículo preovulatorio utilizando una cámara digital (Nikon DS-Fi2 Tokyo, Japan), acoplada a un microscopio óptico (Nikon Eclipse Ni), empleando un objetivo de 40X de aumento. La resolución de las imágenes fue establecida en 1200 x 1600 píxeles. Las imágenes fueron analizadas usando el analizador digital de imágenes Image Pro-Plus 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA) según estudios realizados previamente (Ortega y col., 2010). El porcentaje de área inmunopositiva para cada anticuerpo se calculó como el porcentaje del área total evaluada, a través de un análisis de segmentación de colores, el cual extrae objetos mediante la localización de todos los objetos de un color específico (en este caso, tinción marrón correspondiente al precipitado de DAB). Estos valores se verificaron y normalizaron con controles evaluados en varios ensayos, usando la misma región (verificada por comparación de imágenes) para la calibración. Para todos los anticuerpos, se evaluó solamente la inmunomarcación nuclear. El porcentaje de área inmunopositiva o área inmunomarcada, se calculó separadamente para cada compartimiento (granulosa y teca interna), evaluando al menos 10 secciones representativas de cada folículo.

### 3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se evaluó el efecto de la exposición a estrés calórico en distintas etapas del desarrollo fetal, sobre las diferentes variables de respuesta, con el programa SPSS 25.0 para Windows. Se utilizaron modelos lineales generalizados mixtos (MLGM), escogiendo la función de enlace correspondiente según la distribución de probabilidad de la variable de respuesta (Normal, Gamma, Poisson). Se enfrentaron las variables independientes (variables de entrada) con las variables de respuesta (variables de salida) en análisis univariados. Se consideró que existe una asociación estadísticamente significativa en los casos en que dicha asociación ( $p$ ) fue menor o igual a 0,05, y una tendencia si  $p \leq 0,10$ . En todos los casos se incorporó la variable "Tambo" como factor aleatorio del

modelo, correspondiente a la procedencia de cada animal. Además, se añadió la variable “Edad” (al momento del muestreo) como factor fijo, de manera de corregir la influencia que puede tener la misma sobre las variables de respuesta

### 3.11.1 Variables independientes analizadas

**Tabla 4.** Variables independientes relativas al estrés por calor y cálculo de las mismas. Ciclos: 3 o más días consecutivos con ITH>72.

Variable independiente	Cálculo de variable
Promedio de ITH durante la gestación	$\frac{\text{Suma de valores de ITH}}{282 \text{ días}}$
Promedio de ITH en P1, P2, T1, T2 y T3	$\frac{\text{Suma de valores de ITH de un periodo o trimestre}}{\text{Total de días de ese periodo o trimestre}}$
Porcentaje de días con ITH $\geq$ 72 durante la gestación	$\frac{\text{Suma de días con ITH} \geq 72}{282 \text{ días}} \times 100 \%$
Porcentaje de días con ITH $\geq$ 72 en P1, P2, T1, T2, T3	$\frac{\text{Suma de días con ITH} \geq 72 \text{ de un periodo o trimestre}}{\text{Total de días de ese periodo o trimestre}} \times 100 \%$
Índice de exposición en P1, P2, T1, T2 y T3	$\frac{\text{Suma de días con ITH} \geq 72 \text{ dentro de los ciclos de un periodo o trimestre}}{\text{Total de ciclos de ese periodo o trimestre}}$

### 3.11.2 Variables de respuesta analizadas

- Concentraciones hormonales sistémicas e intrafoliculares (E2, P4, AMH)
- RFA (recuento de folículos antrales)
- Niveles relativos de ARNm del RE $\alpha$ , RE $\beta$ , RP
- Estado de metilación global del genoma
- Nivel de metilación de distintos sitios CpG dentro de la región 5'UTR de los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$

- Expresión proteica del RE $\alpha$ , RE $\beta$ , RP, SRC-1, RIP-140, LCoR, SMRT y REA

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1 VALORES HORMONALES SISTÉMICOS Y RECUENTO DE FOLÍCULOS ANTRALES

La **tabla 5** muestra la asociación entre el estrés por calor durante la gestación y las concentraciones hormonales en plasma y con el recuento de folículos antrales de la progenie en su vida adulta.

Según las distribuciones de frecuencia, para P4 se utilizó una función de enlace Gamma, para RFA la función Poisson y para E2 se utilizó la función Normal.

**Tabla 5.** Asociación entre la exposición a estrés por calor en las diferentes etapas de la gestación y las concentraciones hormonales sistémicas y RFA en las hijas durante la vida adulta. Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).

Variable de salida	17 $\beta$ -estradiol		Progesterona	RFA	
Variable de entrada	$p$	$\beta$	$p$	$p$	$\beta$
Promedio ITH Gestación	0,44		0,683	0,122	
% Días ITH Alto Gestación	0,765		0,91	0,149	
Promedio ITH P1	0,264		0,782	0,323	
% Días Totales ITH Alto P1	0,177		0,926	0,616	
Índice exposición P1	0,392		0,62	0,1	-0,303
Promedio ITH P2	0,084	-0,215	0,977	0,951	
% Días Totales ITH Alto P2	0,121		0,979	0,611	
Índice exposición P2	0,291		0,475	0,283	
Promedio ITH T1	0,116		0,853	0,345	
% Días Totales ITH Alto T1	0,052	0,05	0,844	0,37	
Índice exposición T1	0,116		0,892	0,214	
Promedio ITH T2	0,474		0,753	0,605	
% Días Totales ITH Alto T2	0,298		0,509	0,892	
Índice exposición T2	0,567		0,89	0,896	
Promedio ITH T3	0,138		0,94	0,99	
% Días Totales ITH Alto T3	0,275		0,812	0,777	
Índice exposición T3	0,405		0,828	0,991	

Se puede observar que, a nivel sistémico, existe una asociación estadísticamente significativa positiva entre el porcentaje de días con ITH superior a 72 en el primer trimestre de la gestación y la concentración de E2 en las hijas ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta > 0$ ). Esto

indicaría que aquellas hembras que estuvieron expuestas a un mayor porcentaje de días con ITH superiores a 72 durante el primer trimestre de gestación presentaron, cuando adultas, un aumento plasmático de la concentración de E2. Así también se observó una tendencia de asociación negativa con el promedio de ITH en el segundo periodo de gestación (151 días hasta el nacimiento) ( $p=0,08$ ;  $\beta<0$ ). Esto indicaría que aquellas vacas que sufrieron exposición a altos valores de ITH durante el segundo periodo de gestación, tuvieron hijas con una menor concentración de E2 en su vida adulta.

En lo que refiere a P4, no se registraron asociaciones significativas con las variables de estrés calórico analizadas.

Por su parte, la medición de la concentración de testosterona plasmática estuvo por debajo de la sensibilidad de la técnica ( $<0,025$  ng/ml), de manera que esta variable no pudo ser analizada estadísticamente.

El recuento de folículos antrales iguales o mayores a 3 mm se realizó a las 48 hs de la aplicación de GnRH, en el momento del reclutamiento folicular ( $n=80$ ). El número máximo fue de 25 y el mínimo de 2 folículos por onda. Se evidenció una tendencia de asociación estadísticamente negativa ( $p=0,1$ ;  $\beta<0$ ) frente al índice de exposición a estrés calórico durante el primer periodo de gestación. Esto se traduce en que las hijas de las vacas expuestas a estrés por calor en estos primeros 150 días de gestación tuvieron una tendencia a un menor RFA en su adultez.

#### 4.2 CONCENTRACIONES DE HORMONAS INTRAFOLICULARES

En la **tabla 6** se observa la asociación entre las variables de estrés por calor durante la gestación y las concentraciones hormonales en el folículo preovulatorio de las hijas en su vida adulta. De acuerdo a la distribución de frecuencias, para E2 se utilizó una función de enlace Normal, mientras que para el resto se utilizó la función Gamma.

Se puede observar una asociación estadísticamente significativa negativa entre el porcentaje de días con  $ITH \geq 72$  en toda la gestación y la concentración de E2 en LF del folículo preovulatorio ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta < 0$ ). También se detectó una tendencia de asociación negativa de esta variable con el promedio de valores de ITH durante la gestación

completa ( $p=0,06$ ;  $\beta<0$ ). A partir de esto, podemos interpretar que las hijas de las vacas expuestas a mayor porcentaje de días con  $ITH \geq 72$  y/o a mayor promedio de ITH a lo largo de toda la gestación, presentaron menores niveles de E2 intrafolicular en su etapa de vida adulta.

**Tabla 6.** Asociación entre la exposición a estrés por calor en las diferentes etapas de la vida intrauterina y las concentraciones hormonales y AMH en líquido folicular (LF). Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).

Variable de salida	17 $\beta$ -estradiol		Progesterona		Testosterona		AMH
	$p$	$\beta$	$p$	B	$p$	$\beta$	
Promedio ITH Gestación	0,06	-10037	0,229		0,818		0,472
% Días ITH Alto Gestación	0,051	-27471	0,223		0,762		0,541
Promedio ITH P1	0,937		0,464		0,258		0,88
% Días Totales ITH Alto P1	0,944		0,347		0,367		0,656
Índice exposición P1	0,839		0,389		0,534		0,582
Promedio ITH P2	0,242		0,856		0,19		0,498
% Días Totales ITH Alto P2	0,239		0,697		0,289		0,397
Índice exposición P2	0,627		0,811		0,05	-0,056	0,499
Promedio ITH T1	0,549		0,798		0,18		0,683
% Días Totales ITH Alto T1	0,58		0,684		0,147		0,745
Índice exposición T1	0,793		0,627		0,951		0,699
Promedio ITH T2	0,126		0,202		0,816		0,7
% Días Totales ITH Alto T2	0,221		0,206		0,416		0,994
Índice exposición T2	0,528		0,025	0,097	0,46		0,801
Promedio ITH T3	0,392		0,706		0,219		0,496
% Días Totales ITH Alto T3	0,364		0,557		0,381		0,428
Índice exposición T3	0,19		0,94		0,041	-0,048	0,753

Para el caso de la P4, se evidenció una asociación estadísticamente significativa positiva entre la concentración de dicha hormona y el índice de exposición a estrés calórico en el segundo trimestre de gestación ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta > 0$ ). Considerando estos resultados, podemos interpretar que las hijas de las vacas sometidas a un mayor índice de exposición a estrés térmico en el segundo trimestre de la gestación, presentaron una mayor concentración de P4 intrafolicular en la edad adulta.

En relación con la testosterona, se observó una asociación estadísticamente significativa negativa entre los niveles intrafoliculares de esta hormona en la vida

adulta y el índice de exposición a altos valores de ITH de las madres en el segundo periodo (151 días hasta el parto) así como en el tercer trimestre de gestación ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta < 0$ ). Esto indicaría que, si el índice de exposición de las madres a estrés por calor en este último periodo de la gestación fue mayor, la concentración de testosterona intrafolicular en las hijas adultas resultó menor.

No se detectaron asociaciones entre la concentración de AMH y las variables relacionadas al estrés por calor durante la gestación de las madres.

### 4.3 EXPRESIÓN DE RE $\alpha$ , RE $\beta$ Y RP

#### 4.3.1 Expresión génica del RE $\alpha$ , RE $\beta$ y RP y estado de metilación global del ADN

En la **tabla 7** se muestra la asociación entre las variables de ITH durante la gestación y la expresión génica de RE $\alpha$ , RE $\beta$  y el RP en los folículos preovulatorios de las hijas en la etapa adulta, expresada como niveles relativos de ARNm. Además, se detalla la asociación entre las variables relativas al ITH elevado con el estado de metilación global, expresado como porcentaje de ADN metilado. Según las distribuciones de frecuencia, tanto para los niveles de ARNm de los receptores de hormonas esteroides como para el porcentaje de metilación global, se utilizó una función de enlace Gamma.

Se pudo observar una asociación positiva entre la expresión génica del RP en el folículo preovulatorio y el índice de exposición ITH elevado en el segundo trimestre de gestación ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta > 0$ ). Por el contrario, no se identificaron asociaciones entre las variables de exposición elevados ITH y la expresión génica de los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  para las diferentes variables analizadas.

Con respecto al estado de metilación global, se observó una tendencia de asociación positiva con el promedio de valores de ITH en el segundo trimestre de gestación ( $p = 0,08$ ;  $\beta > 0$ ), lo que indicaría que, una mayor exposición a elevados valores de ITH en el segundo trimestre, implicaría un mayor estado de metilación global del ADN.

**Tabla 7.** Asociación entre la exposición a estrés por calor en las diferentes etapas de vida fetal y la expresión génica del RE $\alpha$ , RE $\beta$ , RP y el estado de metilación global del ADN. Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).

Variable de salida	Niveles relativos de ARNm de RE $\alpha$	Niveles relativos de ARNm de RE $\beta$	Niveles relativos de ARNm de RP		Estado de metilación global del ADN	
	$p$	$p$	$p$	$\beta$	$p$	$\beta$
Variable de entrada						
Promedio ITH Gestación	0,964	0,326	0,388		0,32	
% Días ITH Alto Gestación	0,747	0,51	0,549		0,71	
Promedio ITH P1	0,776	0,817	0,629		0,395	
% Días Totales ITH Alto P1	0,538	0,868	0,753		0,278	
Índice exposición P1	0,545	0,983	0,655		0,509	
Promedio ITH P2	0,761	0,52	0,886		0,859	
% Días Totales ITH Alto P2	0,719	0,577	0,807		0,534	
Índice exposición P2	0,48	0,144	0,154		0,427	
Promedio ITH T1	0,902	0,909	0,874		0,897	
% Días Totales ITH Alto T1	0,525	0,566	0,831		0,761	
Índice exposición T1	0,963	0,754	0,756		0,645	
Promedio ITH T2	0,8	0,432	0,504		0,08	0,036
% Días Totales ITH Alto T2	0,95	0,249	0,412		0,226	
Índice exposición T2	0,338	0,117	0,032	0,188	0,802	
Promedio ITH T3	0,705	0,745	0,939		0,58	
% Días Totales ITH Alto T3	0,811	0,944	0,89		0,211	
Índice exposición T3	0,393	0,17	0,685		0,172	

#### 4.3.2. Estado de metilación de la región promotora de los RE $\alpha$ y RE $\beta$

Se evaluó el estado de metilación en la zona 5'UTR para RE $\alpha$  y RE $\beta$ .

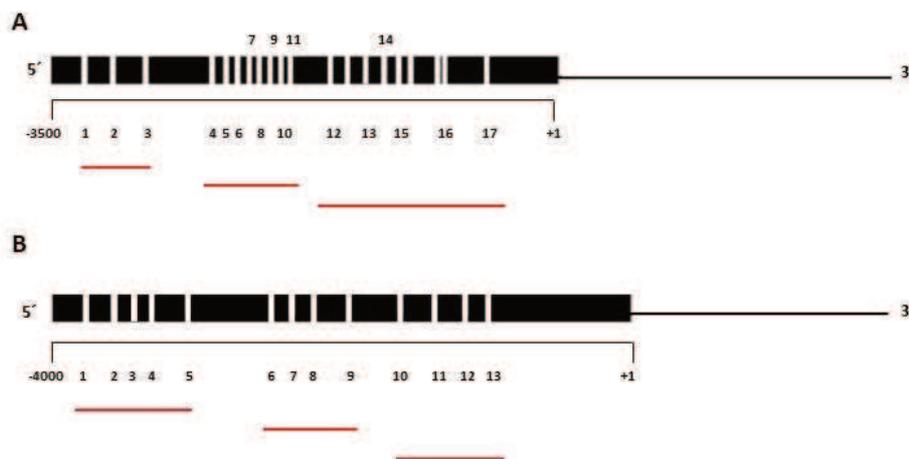
Se analizaron los distintos sitios CpG ubicados a -3500 pb del sitio de inicio de la transcripción del RE $\alpha$ , donde sólo 17 de estos sitios pudieron ser evaluados (**Figura 17**). Según las distribuciones de frecuencias, para las CpG 4, 11 y 14 se utilizó una función de enlace Gamma, mientras que para las restantes se utilizó la función de enlace Normal. Las asociaciones entre las variables de estrés por calor durante gestación y el estado de metilación de los distintos sitios CpG para el RE $\alpha$  en los folículos preovulatorios de las hijas se muestran en las **tablas 8 y 9**.

En cuanto al RE $\beta$ , se analizaron sitios CpG que se encuentran agrupados a aproximadamente 4000pb hacia arriba del sitio de inicio de la transcripción, donde

sólo 13 de estos sitios pudieron ser evaluados para cuantificar su estado de metilación (**Figura 17**). Las asociaciones entre las variables de ITH durante la gestación y el grado de metilación de los distintos sitios CpG para el RE $\beta$  en los folículos preovulatorios de las hijas durante la vida adulta se detallan en las **tablas 10 y 11**.

**Tabla 8.** Asociación entre la exposición a ITH elevado en las distintas etapas de gestación y el estado de metilación de distintas posiciones CpG (CpG1 a CpG7) dentro de la región promotora del RE $\alpha$ . Se detalla la significancia (p) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).

Variable de salida	Met CpG1	Met CpG2	Met CpG3	Met CpG4	Met CpG5	Met CpG6	Met CpG7
Variable de entrada	p	p $\beta$	p $\beta$	p $\beta$	p $\beta$	p $\beta$	p $\beta$
Promedio ITH Gestación	0,503	0,342	0,873	0,461	0,964	0,525	0,386
% Días ITH Alto Gestación	0,943	0,954	0,209	0,661	0,617	0,492	0,556
Promedio ITH P1	0,996	0,039 0,566	0,166	0,09 0,028	0,105	0,09 0,376	0,107
% Días Totales ITH Alto P1	0,857	0,08 0,126	0,298	0,09 0,007	0,17	0,053 0,112	0,09 0,081
Índice exposición P1	0,505	0,09 0,919	0,502	0,123	0,331	0,244	0,178
Promedio ITH P2	0,689	0,19	0,147	0,259	0,18	0,252	0,321
% Días Totales ITH Alto P2	0,901	0,103	0,06 -0,07	0,194	0,1	0,227	0,258
Índice exposición P2	0,546	0,325	0,212	0,451	0,389	0,519	0,485
Promedio ITH T1	0,751	0,118	0,106	0,192	0,119	0,241	0,283
% Días Totales ITH Alto T1	0,476	0,35	0,433	0,303	0,255	0,18	0,335
Índice exposición T1	0,5	0,46	0,506	0,256	0,256	0,102	0,255
Promedio ITH T2	0,401	0,229	0,998	0,287	0,726	0,252	0,182
% Días Totales ITH Alto T2	0,274	0,228	0,701	0,231	0,62	0,275	0,163
Índice exposición T2	0,703	0,176	0,906	0,16	0,187	0,218	0,148
Promedio ITH T3	0,925	0,08 0,385	0,12	0,135	0,07 -0,267	0,118	0,16
% Días Totales ITH Alto T3	0,63	0,033 -0,11	0,051 -0,07	0,08 -0,005	0,06 -0,067	0,1 -0,07	0,1 -0,059
Índice exposición T3	0,656	0,06 0,782	0,049 -0,58	0,1 -0,042	0,031 -0,599	0,1 -0,599	0,08 -0,506



**Figura 12.** Imagen representativa de la posición de los sitios CpG (representados por las barras blancas) cuyo nivel de metilación fue analizado, en las regiones promotoras del RE $\alpha$  (A) y RE $\beta$  (B), respectivamente. En color rojo los amplicones utilizados para evaluar el grado de metilación de las CpG.

**Tabla 9.** Asociación entre la exposición a estrés por calor en las distintas etapas de vida fetal y el estado de metilación de distintas posiciones CpG (CpG8-CpG17) dentro de la región promotora del RE $\alpha$ . Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).

Variable de salida	Met CpG8	Met CpG9	Met CpG10	Met CpG11	Met CpG12	Met CpG13	Met CpG14	Met CpG15	Met CpG16	Met CpG17
Variable de entrada	$p$	$p$ $\beta$	$p$	$p$	$p$	$p$ $\beta$	$p$	$p$ $\beta$	$p$	$p$
Promedio ITH Gestación	0,273	0,454	0,295	0,493	0,466	0,477	0,552	0,23	0,777	0,466
% Días ITH Alto Gestación	0,504	0,496	0,45	0,95	0,47	0,07 -0,071	0,28	0,391	0,119	0,47
Promedio ITH P1	0,117	0,055 0,452	0,539	0,666	0,463	0,765	0,87	0,119	0,475	0,463
% Días Totales ITH Alto P1	0,126	0,042 0,125	0,508	0,799	0,357	0,451	0,302	0,132	0,918	0,357
Índice exposición P1	0,179	0,157	0,686	0,889	0,549	0,291	0,823	0,036 -0,451	0,514	0,549
Promedio ITH P2	0,437	0,23	0,985	0,991	0,791	0,93	0,902	0,363	0,395	0,791
% Días Totales ITH Alto P2	0,362	0,225	0,918	0,785	0,716	0,743	0,887	0,385	0,375	0,716
Índice exposición P2	0,668	0,586	0,777	0,758	0,915	0,767	0,73	0,448	0,719	0,915
Promedio ITH T1	0,34	0,205	0,999	0,998	0,657	0,928	0,79	0,202	0,317	0,657
% Días Totales ITH Alto T1	0,47	0,18	0,964	0,891	0,625	0,605	0,551	0,349	0,885	0,625
Índice exposición T1	0,457	0,141	0,846	0,793	0,381	0,974	0,392	0,127	0,908	0,381
Promedio ITH T2	0,181	0,215	0,139	0,28	0,445	0,417	0,361	0,304	0,659	0,445
% Días Totales ITH Alto T2	0,181	0,226	0,151	0,243	0,33	0,728	0,722	0,226	0,875	0,33
Índice exposición T2	0,193	0,148	0,178	0,155	0,825	0,573	0,794	0,262	0,583	0,825
Promedio ITH T3	0,248	0,09 -0,316	0,692	0,714	0,617	0,954	0,863	0,244	0,452	0,617
% Días Totales ITH Alto T3	0,166	0,07 -0,081	0,433	0,316	0,421	0,682	0,973	0,241	0,282	0,421
Índice exposición T3	0,169	0,07 -0,647	0,511	0,447	0,858	0,927	0,667	0,3	0,353	0,858

Se puede observar una asociación positiva entre el promedio de valores de ITH y el grado de metilación de la **CpG 2** durante el primer periodo de gestación (0-150 días) ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta > 0$ ), así como una tendencia de asociación con el resto de las variables de entrada correspondientes al mismo periodo (**tabla 8**). Esto significa que a medida que la exposición a ITH elevado en este periodo fue mayor, también lo fue el grado de metilación de este sitio. Lo opuesto ocurre durante el tercer trimestre de gestación donde la asociación es negativa ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta < 0$ ) en relación al porcentaje de días con  $ITH \geq 72$ , registrándose una tendencia de asociación en el resto de las variables de esta misma etapa, lo que indica que la relación entre las variables en este momento fue inversa. En referencia a la **CpG 3** sucede algo similar, donde se determinó una asociación negativa entre el patrón de metilación de este sitio y el porcentaje de días e índice de exposición a  $ITH \leq 72$  en el tercer trimestre de gestación de la madre ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta < 0$ ), interpretándose que el grado de metilación fue menor cuanto mayor es la exposición a ITH altos durante este trimestre (**tabla 8**). Ocurrió algo similar en relación con las **CpG 4**, **CpG 5**, **CpG 6**, **CpG 7** y **CpG 9**, donde se evidenciaron asociaciones y tendencias con una relación inversa ( $\beta < 0$ ) entre las variables de ITH durante el tercer trimestre de gestación y el grado de metilación de estos sitios. Por otra parte, la metilación de algunas CpGs (**CpG 4**, **CpG 6** y **CpG 9**) muestra una relación directa ( $\beta > 0$ ) con las variables referentes a ITH durante el primer periodo gestacional (**tabla 8 y 9**). Por el contrario, se observó una asociación negativa ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta < 0$ ) entre el nivel de metilación de la **CpG 15** y el índice de exposición a ITH elevado durante la primera etapa de la gestación (0-150 días), indicando una disminución en el grado de metilación de este sitio en relación a la exposición a elevados valores de ITH durante esta fase (**tabla 9**).

Los patrones de metilación observados en la región promotora del gen del RE $\beta$  fueron muy variables, destacándose una asociación negativa entre el nivel de metilación de la **CpG 5** y el promedio de valores de ITH y el porcentaje de días de  $ITH \geq 72$  durante el segundo trimestre de gestación ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta < 0$ ) (**tabla 10**). Asimismo, el grado de metilación de la **CpG 10** presentó una asociación negativa respecto al índice de exposición a ITH elevado durante P2 ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta < 0$ ). Para ambos sitios corresponde la misma interpretación, destacándose que el grado de metilación disminuye en la

medida en que la exposición a ITH alto aumenta en los respectivos periodos (**tabla 11**). Por el contrario, la metilación de la **CpG 11** exhibe una asociación positiva en relación al índice de exposición a ITH alto en el segundo trimestre de gestación ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta > 0$ ), evidenciando un aumento en el nivel de metilación de este sitio cuando aumenta la exposición a índices de temperatura y humedad elevados. Así también se pueden observar algunas tendencias entre el grado de metilación de la **CpG 6** y variables relativas al estrés por calor, tanto durante el P1 como en el segundo trimestre de gestación (**tabla 10**).

**Tabla 10.** Asociación entre la exposición a ITH elevado en las distintas etapas de la gestación y el estado de metilación de distintas posiciones CpG (CpG1 a CpG7) dentro de la región promotora del RE $\beta$ . Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).

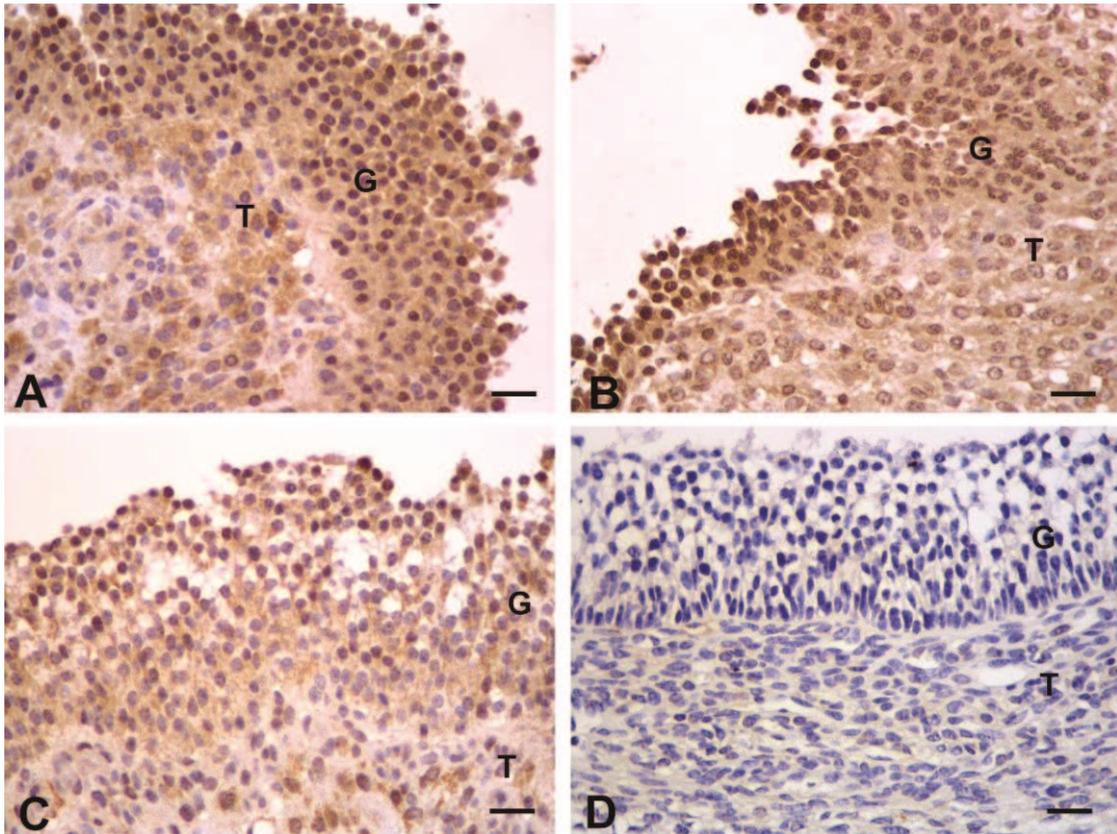
Variable de salida	Met CpG1	Met CpG2	Met CpG3	Met CpG4	Met CpG5		Met CpG6		Met CpG7
Variable de entrada	$p$	$p$	$p$	$p$	$P$	$\beta$	$p$	$\beta$	$p$
Promedio ITH Gestación	0,619	0,142	0,293	0,628	0,06	-2	0,613		0,448
% Días ITH Alto Gestación	0,733	0,157	0,255	0,788	0,266		0,413		0,791
Promedio ITH P1	0,985	0,841	0,924	0,75	0,436		0,159		0,206
% Días Totales ITH Alto P1	0,846	0,857	0,799	0,923	0,466		0,09	0,05	0,223
Índice exposición P1	0,794	0,408	0,53	0,553	0,605		0,285		0,464
Promedio ITH P2	0,775	0,289	0,638	0,993	0,776		0,298		0,462
% Días Totales ITH Alto P2	0,691	0,239	0,656	0,762	0,944		0,314		0,337
Índice exposición P2	0,725	0,147	0,245	0,47	0,309		0,805		0,736
Promedio ITH T1	0,907	0,411	0,593	0,817	0,949		0,328		0,462
% Días Totales ITH Alto T1	0,657	0,24	0,726	0,748	0,589		0,236		0,648
Índice exposición T1	0,361	0,307	0,849	0,861	0,996		0,139		0,433
Promedio ITH T2	0,812	0,258	0,175	0,749	0,048	-0,59	0,272		0,268
% Días Totales ITH Alto T2	0,698	0,188	0,172	0,451	0,023	-0,132	0,313		0,239
Índice exposición T2	0,998	0,147	0,345	0,964	0,125		0,08	0,356	0,145
Promedio ITH T3	0,807	0,384	0,854	0,905	0,867		0,159		0,312
% Días Totales ITH Alto T3	0,776	0,429	0,953	0,468	0,534		0,185		0,189
Índice exposición T3	0,99	0,314	0,495	0,945	0,856		0,469		0,876

**Tabla 11.** Asociación entre la exposición a ITH elevado en las distintas etapas de la gestación y el estado de metilación de distintas posiciones CpG (CpG8 a CpG13) dentro de la región promotora del RE $\beta$ . Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).

Variable de salida	Met CpG8	Met CpG9	Met CpG10	Met CpG11	Met CpG12	Met CpG13
Variable de entrada	$p$	$p$	$p$ $\beta$	$p$ $\beta$	$p$	$p$
Promedio ITH Gestación	0,454	0,406	0,268	0,197	0,859	0,716
% Días ITH Alto Gestación	0,341	0,811	0,206	0,395	0,888	0,799
Promedio ITH P1	0,898	0,668	0,559	0,702	0,291	0,657
% Días Totales ITH Alto P1	0,55	0,468	0,791	0,757	0,364	0,666
Índice exposición P1	0,344	0,939	0,527	0,396	0,575	0,842
Promedio ITH P2	0,657	0,371	0,212	0,704	0,351	0,524
% Días Totales ITH Alto P2	0,735	0,384	0,233	0,755	0,334	0,564
Índice exposición P2	0,444	0,833	0,031	-1,1	0,635	0,855
Promedio ITH T1	0,84	0,518	0,282	0,762	0,258	0,444
% Días Totales ITH Alto T1	0,667	0,319	0,332	0,532	0,38	0,632
Índice exposición T1	0,531	0,355	0,62	0,615	0,798	0,845
Promedio ITH T2	0,633	0,775	0,355	0,133	0,927	0,634
% Días Totales ITH Alto T2	0,421	0,745	0,28	0,143	0,853	0,885
Índice exposición T2	0,437	0,602	0,705	0,016	0,799	0,461
Promedio ITH T3	0,669	0,337	0,31	0,997	0,335	0,567
% Días Totales ITH Alto T3	0,736	0,452	0,448	0,866	0,306	0,639
Índice exposición T3	0,173	0,5	0,254	0,869	0,195	0,568

#### 4.3.3. Expresión proteica del receptor de estrógenos ( $\alpha$ y $\beta$ ) y progesterona

Se detectó la presencia de ambos subtipos del receptor de estrógenos y el receptor de progesterona en el núcleo y citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna del folículo preovulatorio.



**Figura 13.** Imágenes representativas de inmunomarcación en folículos preovulatorios. A) RE $\alpha$  (*Receptor de Estrógenos alfa*); B) RE $\beta$  (*Receptor de Estrógenos beta*); C) RP (*Receptor de progesterona*); D) Control negativo. G (granulosa), T (teca). Barra = 25um.

En la **tabla 12** se muestra la asociación entre variables de exposición a ITH elevado (variables de entrada) y la expresión proteica de los RE $\alpha$ , RE $\beta$  y el RP en el núcleo de las células de la granulosa y la teca (variables de salida). Según la distribución de frecuencias, para ambas isoformas del receptor de estrógenos y el receptor de progesterona en células de la teca se utilizó una función de enlace Gamma y para la expresión del receptor de progesterona en células de la granulosa su utilizó la función de enlace Normal.

Se observó una tendencia de asociación positiva entre la expresión del RE $\alpha$  en células de la granulosa y el índice de exposición a estrés por calor durante P1 ( $p=0,07$ ;  $\beta>0$ ). En las células de la teca se pudo evidenciar una asociación positiva entre la expresión del RE $\alpha$  y el porcentaje de días con valores de ITH elevados durante la totalidad de la gestación ( $p\leq 0,05$ ;  $\beta>0$ ). Se observó lo mismo entre el índice de exposición a estrés calórico durante P1. Esto podría indicar que a medida que aumentó el porcentaje de

días con valores de ITH elevados durante toda la gestación, la expresión de RE $\alpha$  en células de la teca se incrementó. La misma interpretación corresponde para la asociación existente con el índice de exposición a estrés por calor en el primer periodo de gestación.

En cuanto al RE $\beta$ , se pudo determinar una asociación negativa entre la expresión del receptor en ambos tipos celulares y las variables de ITH correspondientes a P1 y al primer trimestre de gestación ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta < 0$ ). Estos datos indicarían que, a una mayor exposición a ITH elevado durante la gestación, la expresión de RE $\beta$  en ambos tipos celulares disminuye en la edad adulta. También se evidenció una asociación positiva entre la expresión de RE $\beta$  y las variables de entrada pertenecientes a P2 y al tercer trimestre de gestación ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta > 0$ ), lo que indicaría que conforme la exposición aumentó durante las fases mencionadas, la expresión proteica de RE $\beta$  aumentó en la vida adulta (**Tabla 12**).

**Tabla 12.** Asociación entre la exposición a estrés por calor en distintas etapas de la gestación y la expresión proteica de RE $\alpha$ , RE $\beta$  y RP en células de la granulosa (G) y de la teca interna (TI). Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).

Variable de salida	RE $\alpha$ -G		RE $\alpha$ -TI		RE $\beta$ -G		RE $\beta$ -TI		RP -G	RP-TI	
Variable de entrada	$p$	$\beta$	$p$	$\beta$	$p$	$\beta$	$p$	$\beta$	$p$	$p$	$\beta$
Promedio ITH Gestación	0,535		0,156		0,305		0,377		396		0,437
% Días ITH Alto Gestación	0,429		0,036	0,047	0,397		0,852		0,637		0,335
Promedio ITH P1	0,271		0,296		0,001	-0,099	<0,001	-0,224	0,778		0,711
% Días Totales ITH Alto P1	0,28		0,266		0,001	-0,025	<0,001	-0,056	0,801		0,998
Índice exposición P1	0,071	0,093	0,003	0,268	0,002	-0,195	<0,001	-0,409	0,959		0,525
Promedio ITH P2	0,508		0,807		0,017	0,065	<0,001	0,16	0,793		0,198
% Días Totales ITH Alto P2	0,605		0,917		0,018	0,017	<0,001	0,044	0,933		0,194
Índice exposición P2	0,346		0,956		0,049	0,109	0,001	0,295	0,767	0,023	0,17
Promedio ITH T1	0,323		0,589		0,003	-0,069	<0,001	-0,163	0,934		0,227
% Días Totales ITH Alto T1	0,391		0,712		0,011	-0,015	<0,001	-0,037	0,996		0,175
Índice exposición T1	0,773		0,847		0,014	-0,125	0,006	-0,27	0,952		0,935
Promedio ITH T2	0,587		0,142		0,235		0,256		0,289		0,399
% Días Totales ITH Alto T2	0,871		0,206		0,137		0,134		0,388		0,136
Índice exposición T2	0,819		0,175		0,348		0,163		0,571		0,255
Promedio ITH T3	0,489		0,733		0,009	0,064	<0,001	0,154	0,998		0,35
% Días Totales ITH Alto T3	0,706		0,898		0,006	0,017	<0,001	0,041	0,774		0,62
Índice exposición T3	0,524		0,766		0,009	0,125	<0,001	0,308	0,914		0,271

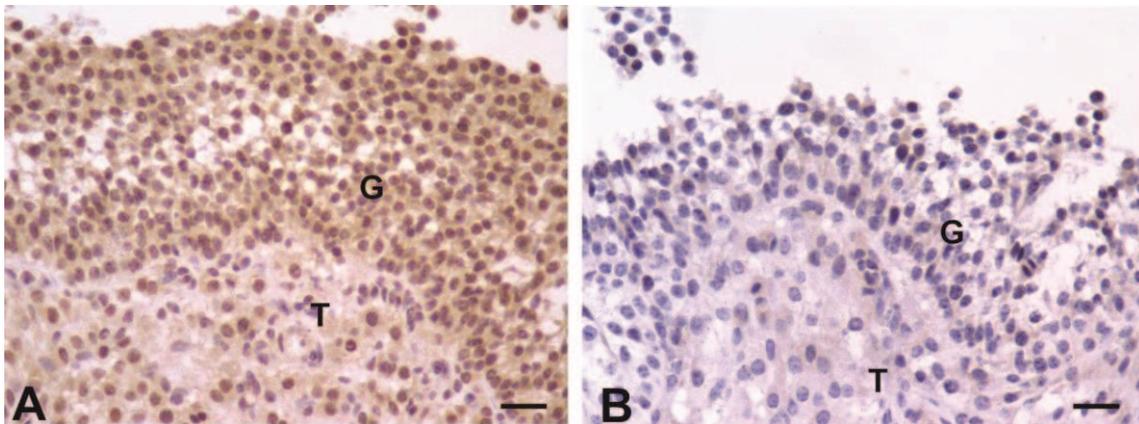
Con respecto al RP, no se observaron asociaciones significativas entre su expresión en células de la granulosa y las variables de entrada relacionadas al estrés calórico. La expresión proteica en células de la teca evidenció una asociación positiva con el índice de exposición a estrés por calor durante P2 ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta > 0$ ). Dicho resultado refiere que,

a mayor índice de exposición a valores de ITH elevados durante el segundo periodo gestacional, corresponde un aumento en la expresión proteica de RP en células de la teca del folículo preovulatorio en la etapa de adultez.

#### 4.4 EXPRESIÓN PROTEICA DE LAS PROTEÍNAS CORREGULADORAS

##### 4.4.1 Coactivadores

Se detectó la presencia de SRC-1 en células de la granulosa y de la teca interna en los folículos preovulatorios analizados (**Figura 19**).



**Figura 19.** Imagen representativa de inmunomarcación en folículo preovulatorio para SRC-1 (A). (*Steroid receptor coactivator*; coactivador). Control Negativo (B) G (granulosa), T (teca). Barra=25um.

En la **tabla 13** se muestra la asociación entre las variables relativas al estrés por calor con la expresión de SRC-1. Según la distribución de frecuencias, para la expresión del mismo en células de la granulosa se utilizó una función de enlace Normal, mientras que para su expresión en células de la teca se utilizó la función Gamma.

**Tabla 13.** Asociación entre la exposición a ITH elevado en distintas etapas de la gestación y la expresión proteica de SRC-1 en células de la granulosa y de la teca. Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).

Variable de salida	SRC-1 granulosa	SRC-1 teca	
Variable de entrada	$P$	$p$	$\beta$
Promedio ITH Gestación	0,964	0,913	
% Días ITH Alto Gestación	0,578	0,826	
Promedio ITH P1	0,836	0,104	-0,049
% Días Totales ITH Alto P1	0,714	0,123	
Índice exposición P1	0,574	0,54	
Promedio ITH P2	0,867	0,115	
% Días Totales ITH Alto P2	0,971	0,084	0,01
Índice exposición P2	0,514	0,084	0,08
Promedio ITH T1	0,837	0,069	-0,041
% Días Totales ITH Alto T1	0,543	0,089	-0,009
Índice exposición T1	0,402	0,179	
Promedio ITH T2	0,926	0,983	
% Días Totales ITH Alto T2	0,909	0,952	
Índice exposición T2	0,624	0,438	
Promedio ITH T3	0,836	0,104	0,036
% Días Totales ITH Alto T3	0,987	0,088	0,01
Índice exposición T3	0,681	0,202	

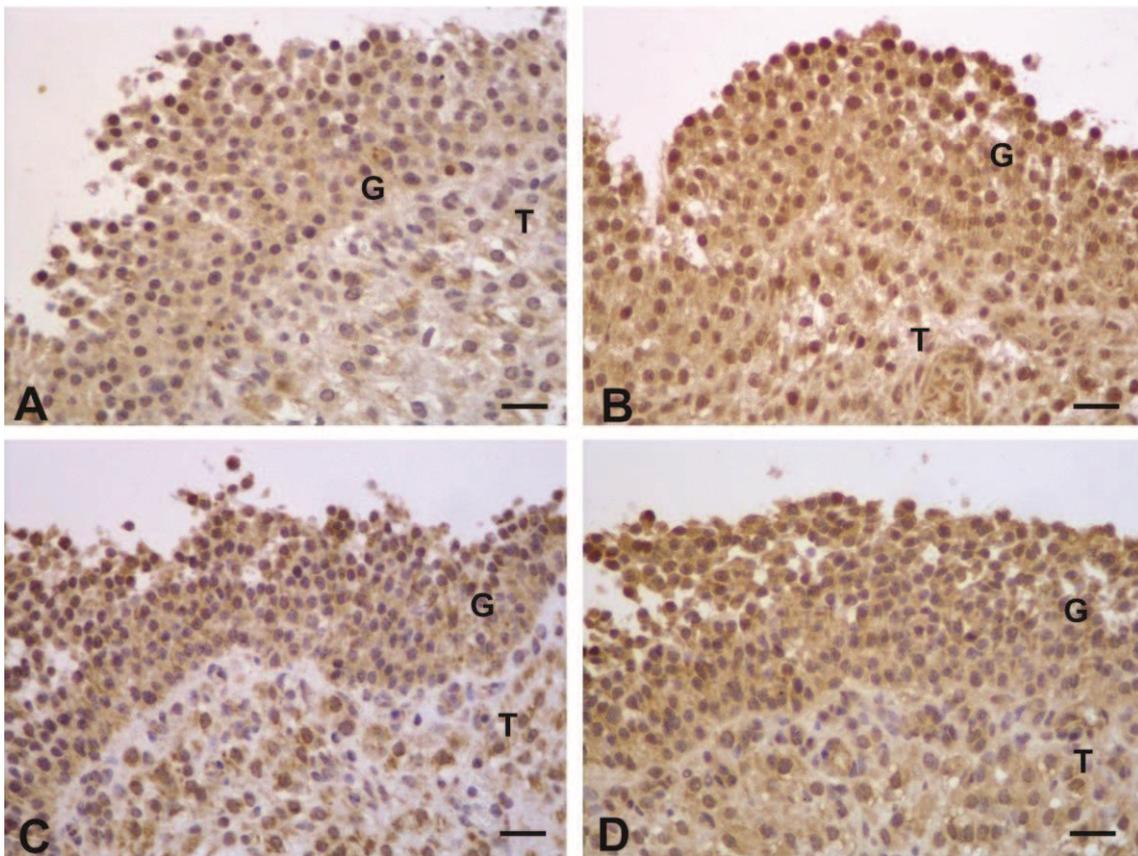
Para SRC-1 no se identificaron asociaciones significativas entre su expresión en células de la granulosa de folículos preovulatorios en la edad adulta y las variables de entrada relativas al estrés térmico.

En células de la teca se determinó una tendencia de asociación negativa entre la expresión de SRC-1 y el promedio de valores de ITH durante P1 ( $p=0,1$ ;  $\beta < 0$ ). Así también, se identificó una tendencia de asociación negativa entre la expresión proteica de este coactivador y el promedio de valores de ITH, así como con el porcentaje de días con valores de ITH elevados en el primer trimestre de gestación ( $0,05 < p \leq 0,1$ ;  $\beta < 0$ ). Esto podría indicar que, una mayor cantidad de días expuestos a ITH elevados, tanto en el primer periodo como en el primer trimestre de gestación, se reflejaría en una disminución en la expresión de este corregulador en las hijas durante la vida adulta. Por otro lado, se evidenció una tendencia de asociación positiva entre la expresión proteica de SRC-1 y las variables relativas al ITH elevado tanto en el P2 como en tercer

trimestre de gestación ( $0,05 < p \leq 0,1$ ;  $\beta > 0$ ). Contrariamente, esto podría señalar que a mayor exposición a valores de ITH elevados durante la gestación, la expresión proteica de SRC-1 podría ser mayor en la adultez.

#### 4.4.2 Correpresores

Los correpresores RIP-140, LCoR, REA y SMRT, fueron detectados en las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos preovulatorios (**Figura 20**). Según la distribución de frecuencias, para la expresión de RIP-140 y REA en células de la granulosa se utilizó una función de enlace Normal, mientras que para la expresión de RIP-140 (teca), REA (teca), LCoR y SMRT (granulosa y teca) se utilizó una función de enlace Gamma.



**Figura 14.** Imágenes representativas de inmunomarcación en folículos preovulatorios. A) RIP-140 (*Receptor interacting protein 140*; correpresor); B) LCoR (*Ligand dependent corepressor*; correpresor); C) REA (*Repressor of estrogen receptor activity*; correpresor); D) SMRT (*Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor*; correpresor); G (granulosa), T (teca). Barra=25um.

En las **tablas 14 y 15** se muestra la asociación entre las variables de estrés calórico y la expresión de los diferentes correpresores, en distintos momentos de la vida intrauterina.

**Tabla 14.** Asociación entre la exposición a estrés por calor en distintas etapas de la gestación y la expresión proteica de RIP-140 y LCoR en células de la granulosa (G) y de la teca interna (TI). Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).

Variable de salida	RIP-140 - G		RIP-140 - TI		LCoR - G		LCoR - TI	
Variable de entrada	$p$	$\beta$	$p$	$\beta$	$p$	$p$	$\beta$	$\beta$
Promedio ITH Gestación	0,642		0,781		0,813	0,346		
% Días ITH Alto Gestación	0,272		0,563		0,703	0,1	0,058	
Promedio ITH P1	0,046	-0,433	0,001	-0,039	0,493	0,08	-0,088	
% Días Totales ITH Alto P1	0,012	-0,136	0,001	-0,034	0,784	0,148		
Índice exposición P1	0,07	-0,906	0,003	-0,255	0,712	0,776		
Promedio ITH P2	0,274		<0,001	0,137	0,694	0,026	0,087	
% Días Totales ITH Alto P2	0,414		0,003	0,028	0,666	0,019	0,023	
Índice exposición P2	0,09	0,539	<0,001	0,335	0,375	0,005	0,203	
Promedio ITH T1	0,138		<0,001	-0,13	0,526	0,022	-0,086	
% Días Totales ITH Alto T1	0,013	-0,096	<0,001	-0,037	0,825	0,034	-0,019	
Índice exposición T1	0,004	-0,904	<0,001	-0,234	0,343	0,008	-0,178	
Promedio ITH T2	0,49		0,588		0,943	0,453		
% Días Totales ITH Alto T2	0,946		0,86		0,933	0,407		
Índice exposición T2	0,637		0,604		0,624	0,535		
Promedio ITH T3	0,186		<0,001	0,132	0,754	0,048	0,073	
% Días Totales ITH Alto T3	0,446		0,004	0,023	0,586	0,041	0,018	
Índice exposición T3	0,37		0,001	0,021	0,77	0,131		

En lo referente a RIP140, se observó una asociación negativa entre su expresión en células de la granulosa y el promedio de valores de ITH como también con el porcentaje de días con ITH elevado durante el P1 de vida fetal ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta < 0$ ). Además, se observó una tendencia de asociación negativa con el índice de exposición a estrés térmico en la misma etapa ( $p = 0,07$ ). Esto indicaría que una mayor exposición a altos ITH en el primer periodo gestación afectaría de manera negativa la expresión de este correpresor en las células de la granulosa en la vida adulta. También se determinó una tendencia de asociación positiva respecto al índice de exposición a valores elevados de ITH en P2 ( $p = 0,09$ ;  $\beta > 0$ ).

Al analizar por trimestres, pudimos observar una asociación negativa entre la expresión de RIP140 y el porcentaje de días con ITH elevado y también con el índice de exposición a estrés por calor durante el primer trimestre de gestación ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta < 0$ ). Con respecto a lo que sucede en células de la teca, los resultados indicaron que existe una asociación negativa tanto entre la expresión de RIP140 y las variables de entrada correspondientes al primer periodo (0-150 días) como con las variables relativas al primer trimestre de gestación ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta < 0$ ). De manera similar, se determinó una asociación positiva ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta > 0$ ) entre la expresión del corregulador y todas las variables pertenecientes tanto al segundo periodo (151 días-nacimiento). De lo anteriormente expuesto podemos decir que en la medida en que las madres estuvieron expuestas a estrés por calor durante la gestación en el transcurso del primer periodo (0-150 días) y, particularmente en el primer trimestre, sus hijas presentaron una menor expresión proteica de RIP140 en el folículo preovulatorio en su vida adulta, tanto en células de la granulosa como de la teca. Sin embargo, si la exposición fue durante el segundo período de la gestación y particularmente en el tercer trimestre la asociación fue positiva, es decir que el corregulador aumentó la expresión en las hijas en la etapa adulta (**tabla 14**).

En relación con LCoR, no se observaron asociaciones significativas entre su expresión en células de la granulosa y las variables referentes a estrés calórico durante la gestación de las madres. En células de la teca se pudo detectar una tendencia de asociación positiva entre la expresión proteica de LCoR en la vida adulta y el porcentaje de días con valores de ITH elevados durante toda la gestación ( $p = 0,1$ ;  $\beta > 0$ ). Se observó una tendencia de asociación negativa entre la expresión del corregulador y el promedio de valores de ITH durante el primer periodo de gestación (0-150 días) ( $p = 0,08$ ;  $\beta < 0$ ). Se detectó además una asociación negativa entre la expresión de LCoR y todas las variables relativas al estrés pertenecientes al primer trimestre de gestación ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta < 0$ ). Esto indicaría que una mayor exposición a estrés por calor en el primer trimestre de gestación, podría disminuir la expresión proteica de LCoR en células de la teca del folículo preovulatorio en la edad adulta del individuo. Se determinó una asociación positiva entre la expresión proteica de este corregulador en la vida adulta, con todas las variables relativas al estrés por calor correspondientes al segundo

período de gestación ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta > 0$ ). Esto indicaría que la mayor exposición a estrés calórico durante el segundo periodo gestacional, resultaría en un aumento en la expresión de LCoR en las células de la teca de los folículos preovulatorios de las hijas en la adultez. Asimismo, observamos una asociación positiva entre la expresión proteica de este corregulador en células de la teca del folículo preovulatorio en la vida adulta y el promedio de valores de ITH en el tercer trimestre de gestación ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta > 0$ ). De la misma forma ocurre con el porcentaje de días con ITH elevado, en la misma fase. Por lo que podemos inferir que aquellas hijas de vacas que durante el tercer trimestre de gestación sufrieron mayor exposición a estrés por calor, presentaron un aumento en la expresión proteica de LCoR en células de la teca del folículo preovulatorio en su adultez (**tabla 14**).

El análisis de REA en células de la granulosa pudo evidenciar solo una tendencia de asociación positiva entre su expresión proteica y el porcentaje de días con elevados valores de ITH en el tercer trimestre de gestación ( $p = 0,06$ ;  $\beta > 0$ ). En cambio, en células de la teca, se determinó una asociación positiva entre la expresión de REA y las variables referentes a estrés por calor correspondientes tanto al segundo periodo (151 días-nacimiento) como al tercer trimestre gestacional ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta > 0$ ). Esto podría indicar que aquellas hembras cuyas madres sufrieron mayor exposición a estrés térmico en estas etapas, al llegar a la vida adulta presentaron una mayor expresión proteica de REA en células de la teca del folículo preovulatorio. Por otra parte, también se observó una tendencia de asociación negativa ( $\beta < 0$ ) entre la expresión de la proteína correguladora y el promedio de valores de ITH ( $p = 0,07$ ) y con el porcentaje de días con ITH elevado ( $p = 0,08$ ) durante el primer trimestre de gestación (**tabla 15**).

**Tabla 15.** Asociación entre la exposición a estrés por calor en distintas etapas de vida intrauterina y la expresión proteica de REA y SMRT en células de la granulosa (G) y de la teca interna (TI). Se detalla la significancia ( $p$ ) y coeficiente de asociación ( $\beta$ , en rojo cuando es negativa). Para asociaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ; celda verde) y tendencias ( $0,05 < p \leq 0,10$ ; celda amarilla).

Variable de salida	REA - G		REA - TI		SMRT - G		SMRT - TI	
	$p$	$\beta$	$p$	$\beta$	$p$	$\beta$	$p$	$\beta$
Promedio ITH Gestación	0,826		0,421		0,324		0,494	
% Días ITH Alto Gestación	0,453		0,295		0,41		0,685	
Promedio ITH P1	0,152		0,16		0,648		0,505	
% Días Totales ITH Alto P1	0,231		0,23		0,816		0,457	
Índice exposición P1	0,855		0,259		0,07	0,169	0,042	0,173
Promedio ITH P2	0,178		0,027	0,052	0,285		0,394	
% Días Totales ITH Alto P2	0,13		0,038	0,013	0,362		0,567	
Índice exposición P2	0,453		0,054	0,098	0,436		0,364	
Promedio ITH T1	0,209		0,07	-0,041	0,359		0,498	
% Días Totales ITH Alto T1	0,387		0,08	-0,01	0,705		0,436	
Índice exposición T1	0,277		0,276		0,664		0,946	
Promedio ITH T2	0,77		0,707		0,511		0,865	
% Días Totales ITH Alto T2	0,652		0,595		0,47		0,62	
Índice exposición T2	0,988		0,839		0,029	0,166	0,037	0,159
Promedio ITH T3	0,138		0,03	0,046	0,351		0,411	
% Días Totales ITH Alto T3	0,06	0,012	0,051	0,011	0,592		0,869	
Índice exposición T3	0,122		0,014	0,102	0,029	-0,153	0,100	-0,108

En relación a SMRT se observó una tendencia de asociación positiva entre la expresión de este corregulador en células de la granulosa y el índice de exposición a estrés por calor durante el P1 de gestación ( $p=0,07$ ;  $\beta>0$ ). De manera similar se observó una asociación positiva en las células de la teca ( $p \leq 0,05$ ). Esto significa que cuando el índice de exposición a estrés por calor en el primer período de la gestación fue mayor, la expresión de SMRT en células de la teca en los folículos preovulatorios en la hija fue mayor. También se detectó una asociación positiva entre la expresión de SMRT y el índice de exposición a estrés calórico durante el segundo trimestre de gestación, en ambas poblaciones celulares (granulosa y teca) ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta>0$ ). Esto podría indicar que a mayor índice de exposición a elevados valores de ITH durante esta etapa, la expresión proteica del corregulador en el folículo preovulatorio en la adultez se vería incrementado. Además, se pudo determinar una asociación positiva entre la expresión

de SMRT en células de la granulosa y el índice de exposición a estrés por calor durante el tercer trimestre gestacional ( $p \leq 0,05$ ;  $\beta > 0$ ). Esto significaría que en la medida que la exposición a elevados ITH en dicha fase fue mayor la expresión proteica de SMRT en la vida adulta se vio incrementada. En células de la teca en cambio solo se observó una tendencia de asociación ( $p=0,1$ ).

## 5. DISCUSIÓN

El estrés por calor es una condición que afecta al ganado bovino produciendo un impacto negativo en la productividad y reproducción, lo que se traduce directamente en pérdidas económicas (St-Pierre y col., 2003; Ferreira y col., 2016; Tao y col., 2019). En lo referente a la producción, en vacas lecheras, el estrés calórico genera una disminución en la ingestión de materia seca por parte del animal que causa una reducción de la disponibilidad de nutrientes necesarios para la síntesis láctea y la gestación (West, 2003; Rhoads y col., 2009). En cuanto a la reproducción, se sabe que el estrés térmico reduce tanto la duración como la manifestación del estro (Orihuela, 2000), disminuye las tasas de concepción (De Rensis y Scaramuzzi, 2003), la calidad del ovocito (Roth y col., 2001) y aumenta las pérdidas embrionarias (Silanikove, 2000). En esta tesis, evaluamos si el estrés calórico durante la preñez podría afectar parámetros reproductivos tales como el RFA y niveles hormonales, así como la expresión y regulación de receptores de hormonas esteroideas en la vida adulta de la progenie.

El ganado bovino de la cuenca lechera santafesina se encuentra expuesto a altas temperaturas combinadas con elevada humedad no solo en los meses estivales, sino a fines de primavera y principios de otoño. Es así que cuando se evaluó la exposición a elevados ITH durante la gestación en este trabajo, se pudo observar que todas las madres estuvieron expuestas en algún periodo de la gestación a valores elevados de ITH.

Existen estudios en humanos y en otras especies que indican que el estrés prenatal puede tener un impacto en la salud durante la vida adulta (Bruin y col., 2010; Evans y col., 2012; Mossa y col., 2013; Govindaraj y col., 2017). Además, ha sido previamente analizada la repercusión negativa del estrés calórico sobre la reproducción en bovinos (Akbarinejad y col., 2017; Tao y col., 2019). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis buscan contribuir al conocimiento de la influencia del estrés por calor durante el desarrollo de bovinos en los parámetros reproductivos.

### **5.1 INFLUENCIA DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE LA PROGRAMACIÓN FETAL DE PARÁMETROS DE FERTILIDAD**

Durante el periodo prenatal, el genoma de un individuo se programa para expresar un conjunto apropiado de genes en tejidos particulares en momentos específicos de su vida. Sin embargo, en respuesta a estímulos o señales del ambiente, dicha expresión puede verse alterada ocasionando cambios que pueden generar un impacto a largo plazo en la adultez. Como se ha mencionado, el estrés por calor es uno de los factores que podría inducir la programación fetal debido a la exposición a elevadas temperaturas que sufren las vacas lecheras durante la preñez (Hansen 2009; Wolfenson y col., 2000; Dahl y col., 2019; Huber y col., 2020; Ouellet y col., 2020; Sammad y col., 2020; Liu y col., 2020).

Los resultados de esta tesis mostraron una tendencia de asociación negativa entre las variables relativas al estrés por calor y el RFA de las hijas durante los primeros 150 días de gestación de las madres. Esto indicaría que existe una tendencia a tener un menor recuento de folículos antrales en aquellos animales con una mayor exposición en los primeros 150 días de gestación. En rumiantes, así como en humanos y otros mamíferos, la reserva folicular ovárica se establece durante la vida fetal y determina la cantidad de folículos antrales presentes en el ovario (Fortune y col., 2013; Monniaux y col., 2014). La exposición de una hembra gestante a condiciones adversas como el estrés por calor, podría tener un impacto a nivel del desarrollo ovárico fetal durante la proliferación de ovogonias y consecuentemente sobre la reserva folicular en el animal adulto. En un trabajo realizado de manera paralela a esta tesis por nuestro grupo de trabajo, se analizó una base de datos con alrededor de 11000 vacas, de 43 tambos de la zona, y se pudo observar que el estrés calórico durante los primeros meses de gestación de las madres está asociado negativamente a parámetros reproductivos como intervalo parto-concepción e intervalo parto-primer servicio en las hijas (Recce y col., *enviado a evaluación*).

Se ha postulado que el RFA es un buen indicador de fertilidad en vacas lecheras en relación con distintos parámetros relativos a la funcionalidad ovárica y la eficiencia reproductiva (Mossa y col., 2012; Ribeiro y col., 2014; Ireland y col., 2011), siendo utilizado para clasificar a las hembras bovinas según la cantidad de folículos antrales

iguales o mayores a 3 mm de diámetro presentes en los ovarios durante la etapa de reclutamiento folicular, existiendo una asociación positiva entre el número de folículos y diferentes parámetros reproductivos (Ireland y col., 2011). Sin embargo, trabajos realizados posteriormente determinaron que vacas con recuentos moderados-altos de folículos antrales presentaron una fertilidad subóptima y menor tiempo de vida productiva dentro del rodeo en comparación con hembras que tenían menor recuento (Jimenez-Krassel y col., 2017). Estas discrepancias podrían deberse a diferencias en la metodología del recuento, ya que Jimenez-Krassel y col., (2017) usaron un método diferente, similar al usado en el presente trabajo. Considerando el periodo donde se establece la reserva folicular en bovinos, la exposición a niveles elevados de ITH durante el desarrollo temprano de las hembras podría repercutir negativamente sobre el RFA y por ende en la fertilidad.

Por su parte, la AMH ha sido eficaz como herramienta para determinar de manera indirecta la reserva folicular en bovinos (Ireland y col., 2008; Rico y col., 2009; Lahoz, 2014; Monniaux, 2011). Algunos trabajos han demostrado que existe una asociación positiva entre el RFA y la concentración plasmática de AMH en bovinos y otras especies (Ireland y col., 2011; Evans y col., 2012). Ambos parámetros (concentración de AMH y RFA) son constantes y altamente repetibles dentro de un mismo individuo y muy variable entre individuos (Ireland y col., 2008; Rico y col., 2009, 2011). En la presente tesis no encontramos asociaciones entre la concentración de AMH en líquido folicular de folículos preovulatorios con los indicadores de estrés calórico durante el desarrollo fetal. Con respecto a la determinación de AMH en plasma no fue posible su análisis debido a que las concentraciones presentes fueron menores al límite de detección de la técnica utilizada.

El crecimiento, desarrollo y maduración de los folículos ováricos es un proceso fundamental para lograr una alta eficiencia reproductiva en bovinos. Para ello, es esencial la formación de un folículo preovulatorio en la etapa de proestro con capacidad para ovular y posteriormente desarrollar un cuerpo lúteo, proceso que dependerá de un equilibrado ambiente hormonal (Wiltbank y col., 2011)

Zachos y col. (2002) han demostrado que la reducción de los niveles de estradiol sérico materno y fetal en babuinos por un inhibidor de la aromatasa reduce

significativamente el número de folículos primordiales y primarios en los ovarios fetales, aunque la pérdida se puede revertir, proporcionando la evidencia para la hipótesis de que la RE juega un papel importante durante la foliculogénesis temprana. Britt y col. (2004) han informado hallazgos similares en ratones con la excepción de que el tratamiento con estradiol no puede restaurar la foliculogénesis temprana (Yang y col. 2004).

En la presente tesis encontramos asociaciones entre la concentración plasmática e intrafolicular de las hormonas esteroideas, E2 y P4, en las hijas y los indicadores de estrés calórico en las madres. En relación con la concentración plasmática de P4 no se encontró asociación con la exposición a ITH elevado durante la gestación. Sin embargo, aquellos animales que tuvieron un índice de exposición a valores elevados de ITH durante el segundo trimestre de gestación, presentaron una mayor concentración intrafolicular de progesterona en la etapa de proestro. En cuanto a los niveles de E2, encontramos asociaciones entre el estrés calórico durante la gestación y los niveles sistémicos e intraováricos en la hija durante la adultez. A nivel sistémico pudo determinarse que una mayor cantidad de días de exposición a  $ITH \geq 72$  durante el primer trimestre de gestación se asociaron con mayores niveles de E2 en el proestro. Por otra parte, se determinó una tendencia a la disminución en las concentraciones circulantes conforme aumenta el promedio de exposición a elevados ITH durante el último periodo gestacional (151 días al nacimiento). En relación a la concentración en LF de folículos preovulatorios, los niveles de E2 fueron menores en aquellas hijas de hembras que sufrieron exposición a un alto porcentaje de días de estrés por calor durante la gestación, sumado a que mayores valores de ITH en el mismo periodo tuvieron una tendencia a causar el mismo cambio. En relación a la concentración de testosterona folicular, encontramos que el estrés calórico tuvo un efecto negativo durante las últimas etapas de la gestación sobre los niveles de dicha hormona.

Ha sido estudiado que el estrés por calor ocasiona celos silentes y alteraciones en la secreción hormonal en vacas (De Rensis y col., 2003; Collier y col., 2017; Tao y col., 2019). Además, tiene efectos directos sobre la secreción de gonadotrofinas que influye en la síntesis hormonal en el folículo (De Rensis y col., 2003). Ha sido propuesto que el estrés por calor reduce la capacidad esteroideogénica de las células de la teca y la

granulosa, lo que conduce a una disminución de las concentraciones de estradiol en sangre (De Rensis y col., 2015).

Bajo condiciones de estrés calórico, los folículos presentan una capacidad esteroidogénica reducida caracterizada por una disminución en la actividad aromatasa por parte de las células de la granulosa y una disminución en la concentración de estradiol en el folículo dominante (Wolfenson y col., 1997; Bridges y col., 2005). Roth y colaboradores (2001) reportaron un efecto retardado del estrés por calor sobre la producción de esteroides en folículos preovulatorios bovinos una vez que el efecto estresante había cesado. Los efectos potencialmente adversos de la disminución en la producción de E2 implican un impacto en la duración e intensidad del estro, así como la supresión de la secreción de LH, lo que sucesivamente puede alterar los eventos involucrados en el proceso de ovulación afectando la fertilidad (Wolfenson y col., 2000; Roth y col., 2001; Roth y Wolfenson, 2016). Cerca del momento en que ocurre la ovulación el pico de LH induce un cambio de predominio de E2 a P4 en el LF de folículos preovulatorios (Dielman y col., 1983). Asimismo, podrían producirse alteraciones en la retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario traduciéndose en un impacto sobre la capacidad ovulatoria del folículo preovulatorio, al igual que sobre el pool de folículos antrales del cual aquellos que llegan a estadios ovulatorios son seleccionados (Hunter y col., 2004). En este sentido varios autores reportaron que vacas con mastitis (Lavon y col., 2010, 2011) o con restricción nutricional (Bossis y col., 1999, 2000; Mackey y col., 2000; Wolfenson y col., 2004; Walsh y col., 2012) presentan una disminución tanto en el pico preovulatorio de LH como en la capacidad esteroidogénica folicular.

A estos efectos directos que ocurren en las hembras expuestas a un estresor, debemos sumar los efectos indirectos sobre las crías, cuando las madres estuvieron expuestas a esos estresores durante la gestación. En este sentido, muchos estudios han reportado efectos de la subnutrición o sobrenutrición de las madres sobre la fertilidad de las hijas (Evans y col., 2012; Mossa y col., 2013). Se han observado cambios en el desarrollo gonadal y la expresión génica pituitario-gonadal en fetos bovinos de madres que fueron restringidas nutricionalmente a en el segundo y tercer tercio de la gestación (Weller y col., 2016). Se determinó además una menor expresión del gen FSHB en la

pituitaria fetal en las hijas de vacas con aportes nutricionales restringidos que en la de vacas con ingesta ad libitum, a los 199 y 268 días de gestación (Weller y col., 2016). Estos autores también demostraron que los ovarios de fetos de vacas con ingesta ad libitum tenían mayor expresión de P450arom, StAR, BMPR2, TGFBR1, GDF9, FSHR, Bax y CASP3 que los de vacas con ingesta moderada, a los 199 y 268 días de gestación (Weller y col., 2016). Ha sido demostrado que, en las ovejas, la desnutrición materna retrasa el desarrollo folicular (Rae y col., 2001) y aumenta la expresión de genes apoptóticos en el ovario fetal (Lea y col., 2006). Muchos estudios se han centrado en las consecuencias de la desnutrición durante la preñez de las madres, en sus hijos (Mossa y col., 2013). Estos estudios han enfatizado que las mayores consecuencias se dan en las últimas etapas de la gestación, durante las cuales aumentan los requerimientos nutricionales del feto. En este sentido, los requerimientos de crecimiento de las crías se ven incrementados al final de la gestación cuando se produce el mayor crecimiento del feto. Sin embargo, se debe considerar que, en el ganado bovino, tanto las gónadas (ovarios y testículos) como el eje hipotalámico-pituitario se desarrollan precozmente, en el primer y segundo trimestre de gestación, y que cualquier alteración en este período lábil puede tener consecuencias en la reproducción durante la vida adulta (Rhind y col., 2001; Monniaux y col., 2014). En fetos de ambos sexos, el desarrollo del eje hipotalámico-hipofisario y la síntesis asociada de gonadotropinas son potencialmente sensibles a influencias nutricionales y de otro tipo (Rhind y col., 2001). En este sentido debe considerarse que tanto las gonadotropinas como los esteroides intervienen en la regulación de la esteroidogénesis y el desarrollo ovárico y folicular fetal (Burkhart y col., 2010; Fortune y col., 2013). Los cambios en la programación fetal reportados podrían estar involucrados en las alteraciones a nivel endócrino de la prole encontradas en este trabajo.

## **5.2 INFLUENCIA DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE LA PROGRAMACIÓN FETAL: EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES EN LOS FOLÍCULOS PREEVULATORIOS Y SU REGULACIÓN EPIGENÉTICA**

En los mamíferos, los ovarios son órganos muy dinámicos que presentan cambios cíclicos para cumplir con los procesos de maduración folicular, ovulación, formación

del cuerpo lúteo y, en ausencia de preñez, la regresión del cuerpo lúteo (Van Den Broeck y col., 2002). Como se mencionó anteriormente, los esteroides están involucrados en distintos procesos relacionados a la fertilidad en la hembra, en distintos tejidos, inclusive los folículos ováricos (Drummond y col., 2002; Brosens y col., 2004; Fuentes y Silveyra 2019). La regulación de la expresión de los receptores de hormonas esteroideas está a cargo de las gonadotrofinas, así como de otras hormonas y factores de crecimiento (Byers y col., 1997). Además, las mismas hormonas esteroideas pueden regular positiva o negativamente sus propios receptores (Drummond y col., 1999; Beato y Klug, 2000; Brosens y col., 2004). La ubicación de los receptores de hormonas esteroides dentro de los folículos ováricos ha sido demostrada previamente en varias especies incluyendo a los bovinos (D'haeseleer y col., 2005). Algunos autores mencionan que, en los folículos ováricos bovinos, la expresión de ARNm del RE $\beta$  en células de la granulosa decrece a medida que se incrementa el tamaño folicular (Manikkam y col., 2001), mientras que otros indican que dicha expresión aumenta en folículos completamente diferenciados en comparación con folículos subordinados entre los días 2 y 3,5 del ciclo estral (Evans y col., 2004). Un estudio previo en nuestro laboratorio, ha evidenciado que la expresión génica de RE $\beta$  en células de la granulosa aumentó en folículos antrales grandes respecto a folículos de menor desarrollo, mientras que en células de la teca se evidenciaron niveles similares en folículos sanos (Alfaro y col., 2012). En este sentido, en esta tesis se ha logrado identificar expresión génica de RE $\beta$  en todos los folículos preovulatorios evaluados de hembras gestadas bajo estrés térmico. Por su parte, algunos autores observaron que la expresión de ARNm del RE $\alpha$  se vio incrementada en la teca interna durante las etapas finales de crecimiento folicular sin observarse un incremento en las células de la granulosa (Schams y Berisha, 2002; Özdemir y Çomakli, 2018), mientras que sus niveles disminuyen en el cuerpo lúteo (Van Den Broeck y col., 2002; Özdemir y Çomakli, 2018). Sin embargo, otros estudios indicaron niveles similares de este receptor en células de la teca de folículos sanos, mientras que se evidenció un aumento en la expresión génica en células de la granulosa de folículos antrales grandes respecto a los de menor tamaño (Alfaro y col., 2012). Peruffo y col. (2011) caracterizaron la expresión y localización de los RE en la corteza frontal de fetos bovinos. Más recientemente, Panin y col. (2014) describieron la expresión de ARNm de

ambos subtipos de receptores y su correlación a lo largo del periodo gestacional, observando que sus niveles se incrementan de manera significativa hacia las etapas finales de la gestación en el hipotálamo bovino, lo cual sugiere que el estradiol participa directamente en la regulación de la diferenciación cerebral sexual de la hembra (Bakker y Brock, 2010; Brock y col., 2011; Peruffo y col., 2008b) y el control central del comportamiento reproductivo a nivel del hipotálamo (Pfaff y col., 2000). Algunos estudios en ratones sometidos a contaminantes ambientales, han demostrado expresión diferencial de RE $\alpha$  y la metilación del promotor *Esr1* (Bhandari y col., 2019). Estos resultados indicarían que exposiciones a contaminantes ambientales causan alteraciones transcripcionales y epigenéticas en la expresión de los receptores de estrógenos en el desarrollo de la próstata y la espermatogénesis (Bhandari y col., 2019, Liu y col., 2019). En humanos, algunos estudios sugieren que RE $\beta$  se inactiva principalmente a través de la metilación aberrante del ADN desempeñando un papel importante en la patogénia del cáncer de ovario (Suzuki y col., 2008). Por otro lado, otros estudios sugieren que la exposición transitoria a sustancias químicas que alteran el sistema endocrino durante el desarrollo fetal y neonatal afecta la función ovárica adulta a través de patrones de metilación alterados (Zama y Uzumcu, 2009). En este trabajo no se hallaron asociaciones entre las variables de estrés por calor y la expresión génica de los RE $\alpha$  y RE $\beta$ . Sin embargo, se observaron asociaciones entre el estrés por calor y el porcentaje de metilación de sitios CpG ubicados en la región promotora de dichos receptores. Esto indicaría que la expresión génica de estos podría estar alterada debido a la variación en los patrones de metilación en su región promotora o a la asociación entre el ADN y las diferentes proteínas correguladoras. Durante el primer periodo de gestación (primeros 150 días) se evidenció una asociación positiva entre las variables de estrés por calor y el grado de metilación de algunos sitios CpG (CpG2, CpG6 y CpG9) de la región 5'UTR del RE $\alpha$ , indicando que, a mayor exposición a ITH $\geq$ 72, mayor es el porcentaje de metilación en esa área. Por otro lado, se evidenció una asociación negativa en el tercer trimestre de gestación, en donde a mayor exposición a estrés por calor, el grado de metilación de ciertas CpG (CpG2, CpG3 y CpG5) dentro de la región 5'UTR fue menor. Sin embargo, se destaca una asociación negativa entre el índice de exposición a estrés calórico durante el primer periodo de gestación y un sitio CpG ubicado a 511pb corriente arriba (CpG 15).

Esto podría indicar que el estado de metilación podría ser reversible y las posibles variaciones en la expresión proteica del RE $\alpha$  podrían deberse a estos cambios en los patrones de metilación. Por el contrario, en la región 5'UTR del RE $\beta$  se encontró una asociación negativa entre las variables relativas a estrés por calor durante el segundo periodo de gestación y el porcentaje de metilación de la CpG10 en la región 5'UTR. Sin embargo, específicamente en el segundo trimestre pudo determinarse una asociación negativa con el porcentaje de metilación de la CpG5 y una asociación positiva para la CpG11. Dichos resultados sugerirían que estos sitios CpG podrían tener funciones diferenciales dentro de esta región, funcionando como activadores o represores de la expresión de dichos receptores.

Con respecto a la progesterona, en este trabajo, se halló una asociación positiva entre el índice de exposición a estrés por calor durante el segundo trimestre gestacional y los niveles relativos de ARNm del RP, indicando una mayor expresión génica en relación a una mayor exposición en esa etapa. Como se mencionó con anterioridad, la P4 ejerce sus efectos fisiológicos a través de mecanismos tanto genómicos como no genómicos y es mediante los primeros que la hormona actúa sobre las células diana, influyendo en procesos tales como la ovulación, la implantación embrionaria y el mantenimiento de la preñez (Graham y Clark, 1997; Ogle y col., 1998; Rekawiecki y col., 2018). También se ha mencionado que el RP se presenta en dos isoformas principales (RP-A y RP-B) denotando la complejidad de los procesos intracelulares en los que participan, dependiendo del contexto promotor y tipo celular (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000; Jo y col., 2002; Fang y col., 2002; Brosens, 2004). En bovinos, los mayores niveles de ARNm de RP-A y RP-B se han observado al inicio del ciclo estral (Rekawiecki y col., 2018). Por su parte, en células de la granulosa bovina se evidenciaron niveles similares de RP total y RP-B en folículos sanos de diferentes tamaños (Alfaro y col., 2012). Aunque es evidente una asociación entre la expresión génica del RP en la pared de folículos preovulatorios en animales adultos y el índice de exposición a estrés por calor en el segundo trimestre de gestación, no se detectó asociación entre las variables relativas a estrés calórico y la expresión proteica del RP en células de la granulosa. Por el contrario, en células de la teca se encontró una asociación entre la expresión de este receptor y el índice de exposición a estrés térmico en el segundo periodo (151 días

hasta el parto) de vida intrauterina. Es posible que estas diferencias sean debidas al tipo de muestra usada en cada evaluación (pared completa vs poblaciones separadas) o a cambios postranscripcionales. El proceso de metilación podría representar un mecanismo regulatorio adicional por el cual podrían existir diferencias celulares en el nivel de expresión de ambas isoformas del RP (Rekawiecki y col., 2018). Así, en trabajos realizados en bovinos por estos Rekawiecki y col. (2018), se observó que un elevado porcentaje de metilación en la región promotora de la isoforma RP-A intervendría en la actividad inhibitoria del RP-A sobre el RP-B y, de esta manera, el proceso de metilación influiría en la regulación de la acción de la P4 en el cuerpo lúteo y el endometrio (Rekawiecki y col., 2018).

### **5.3 INFLUENCIA DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE LA PROGRAMACIÓN FETAL: EXPRESIÓN PROTEICA DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES EN LOS FOLÍCULOS PREEVULATORIOS**

En la evaluación de la expresión proteica de los receptores de esteroides (estrógenos y progesterona) se determinó la presencia de los mismos en ambas poblaciones celulares (granulosa y teca) de la pared de los folículos preovulatorios de los animales estudiados. En este sentido, en estudios previos se reportó la presencia y expresión de estas moléculas en células de la granulosa y de la teca en diferentes estructuras del ovario bovino y de otras especies (Schams y Berisha, 2002; Van Den Broeck y col., 2002; Amrozi y col., 2004; D'Haeseleer y col., 2006; Salvetti y col., 2007, 2009, 2012; Ortega y col., 2009; Zurvarra y col., 2009; Alfaro y col., 2012).

Los esteroides sexuales juegan un rol importante en el crecimiento y diferenciación de los tejidos reproductivos y en el mantenimiento de la fertilidad (Drummond, 2006). No sólo actúan de manera endócrina en tejidos distantes al ovario, sino que, además lo hacen de forma paracrina/autocrina dentro de los folículos o el cuerpo lúteo (Berisha y col., 2002; Quirk y col., 2006). Los efectos biológicos del 17 $\beta$ -estradiol están mediados por los receptores de estrógenos (RE)  $\alpha$  y  $\beta$  a los cuales se une con alta afinidad (Nilsson y Skinner, 2001; Björnström y Sjöberg, 2005). Si bien ambos receptores comparten características funcionales, los mecanismos moleculares que regulan su

actividad transcripcional y su localización tisular difieren entre sí (Kuiper y col., 1996; Wang y col., 2000). Inicialmente se determinó, en muchas especies, que el RE $\alpha$  se expresa mayormente en células de la teca, mientras que el RE $\beta$  lo hace principalmente en células de la granulosa (Amrozi y col., 2004; Berisha y col., 2002; D'Haeseleer y col., 2006; Van Den Broeck y col., 2002). Sin embargo, estudios posteriores demostraron una coexpresión de ambos subtipos en las células de los folículos ováricos bovinos (Salveti y col., 2012). La coexpresión es necesaria para el correcto funcionamiento ovárico (Yang y col., 2002) y el normal desarrollo del folículo dominante en bovinos (Rovani y col., 2014).

La influencia del estrés por calor durante la gestación tuvo un impacto positivo sobre la expresión proteica del RE $\alpha$  en células de la teca de los animales en estudio, destacándose este efecto en las hembras que estuvieron expuestas durante el primer periodo de gestación (0-150 días), y una tendencia de asociación positiva sobre la expresión del RE $\alpha$  en células de la granulosa en el mismo período. Para el RE $\beta$ , la asociación con las variables de estrés por calor fue negativa, observándose una disminución en su expresión, tanto en células de la granulosa como de la teca de ovarios de hembras adultas que tuvieron cuyas madres estuvieron expuestas a ITH elevado durante la primera etapa de gestación. Del mismo modo, se observó una asociación positiva entre la expresión del RE $\beta$  en ambas poblaciones celulares (granulosa y teca) y la exposición a altas temperaturas en el segundo periodo de gestación (151 días hasta el nacimiento). Durante los procesos fisiológicos, la expresión y los mecanismos de señalización de ambos receptores son complejos y posiblemente manifiestan acciones redundantes, independientes, sinérgicas y/o antagonistas (Prossnitz y Barton, 2011). Como resultado, alteraciones en el complejo estrógenos-receptores-enzimas relacionadas pueden producir modificaciones a nivel reproductivo y endócrino, como pudo observarse en trabajos previos en ovarios de diferentes especies en modelos experimentales y en vacas con Enfermedad Quística Ovárica (Salveti y col., 2007, 2009; Ortega y col., 2009; Zurvarra y col., 2009; Alfaro y col., 2012; Salvetti col., 2012). Un estudio en cabras demostró que el estrés por calor altera la expresión de genes relacionados con la actividad reproductiva a nivel uterino, entre estos el ER $\alpha$ , lo que podría ser un indicio de una reducción de la eficiencia reproductiva

(Amitha y col., 2019). Estos resultados coinciden con lo evaluado en esta tesis, donde se pudo evidenciar la modificación en la expresión proteica de los receptores de hormonas esteroideas por influencia de factores ambientales durante la gestación.

Se ha demostrado que el RE $\beta$  juega un papel fundamental en la fertilidad en ratas (Rumi y col., 2017; Vincentaben Khristi y col., 2018) y ratones mutantes hembras, donde la depleción del RE $\beta$  resulta en una menor respuesta de células de la granulosa a las gonadotropinas (Deroo y col., 2009; Rodriguez y col., 2010), menor producción de estrógenos (Emmen y col., 2005; Couse y col., 2005), una asociación con perjuicio sobre la maduración folicular (Hegele-Hartung y col., 2004; Woodruff y Mayo, 2005) y una falla en la ovulación (Vanderhyden, 2002; Couse y col., 2005; Binder y col., 2013; Maneix y col., 2015). A su vez, se ha demostrado que el RE $\beta$  es regulado de manera negativa por las gonadotropinas en células de la granulosa de folículos preovulatorios (Byers y col., 1997). Así, la disminución de la expresión de cofactores transcripcionales específicos puede ser desencadenada por el pico de LH, siendo este un proceso necesario para la diferenciación de células de la granulosa en células luteales (Hlaing y col., 2001). Teniendo en cuenta que la expresión de RE $\beta$  se detecta principalmente en células de la granulosa, se podría inferir que la interacción entre cofactores y el RE $\beta$  podrían mediar efectos estrogénicos en dichas células (Hlaing y col., 2001). Si bien la expresión del RE $\alpha$  en ovario de muchas especies de mamíferos se ha detectado en las células de la teca interna es importante resaltar que en el bovino ha sido detectada con una expresión moderada e incluso elevada en las células de la granulosa (Rosenfeld y col., 2001; Van Den Broeck y col., 2002b; Salvetti y col., 2012). En este trabajo se ha detectado su expresión en células de la granulosa y de la teca interna de manera similar. En este sentido, existe evidencia que indica que en algunas especies el gen de RE $\alpha$  se expresa en células de la granulosa cuando se aplica sobre ellas un estímulo inductor de diferenciación (Yang y col., 2002). Incluso se ha reportado que el RE $\alpha$  se expresa en células de la granulosa y precursores de ovarios fetales bovinos, así como en células de la teca y estroma (Burkhart y col., 2010). Burkhart y col. (2010) identificaron la presencia del RE $\beta$  y la enzima aromatasa citocromo P450 en ovarios fetales bovinos de diferentes etapas, mostrando evidencia de la capacidad de síntesis de E2 y la presencia de RE $\alpha$  y RE $\beta$  para permitir la respuesta estrogénica en función del

desarrollo ovárico y folicular durante el desarrollo intrauterino. Además, se ha demostrado en hembras ovinas tratadas prenatalmente con testosterona, un incremento en la expresión proteica de RE $\alpha$  y RE $\beta$ , así como del receptor de andrógenos en células de la granulosa de folículos antrales de las hijas a los 10 y 21 meses de edad, aportando evidencia de la programación fetal de manera temprana mediante cambios en la expresión de estos receptores (Ortega y col., 2009). En este sentido, nuestros resultados podrían ser indicativos de que condiciones ambientales adversas durante el desarrollo gestacional afectaría la expresión de ambos receptores en la vida adulta con las consecuentes alteraciones en la fertilidad de las hembras en el largo plazo.

Los RE $\alpha$  y RE $\beta$  pueden formar homodímeros (RE $\alpha$ -RE $\alpha$ ; RE $\beta$ -RE $\beta$ ) o heterodímeros (RE $\alpha$ -RE $\beta$ ) en las células blanco, mostrando una actividad transcripcional diferencial dependiendo del contexto celular y del promotor (McInerney y col., 1998; Pettersson y col., 2000). Se ha descrito que el RE $\beta$ , cuando está presente como heterodímero, reprime la actividad del RE $\alpha$  disminuyendo la sensibilidad a E2 (Hall y McDonnell, 1999). También se ha sugerido que la actividad transcripcional del RE no está determinada por su capacidad de unión al ligando, sino más bien por la concentración individual de los subtipos RE $\alpha$  y RE $\beta$  en las células blanco y la estructura que presenta el ligando (Gougelet y col., 2007; Bhavnani y col., 2008). Como resultado, un mismo ligando puede ejercer actividades opuestas en relación al tipo de RE expresado. Otro factor que influiría sobre la expresión de ambos subtipos de RE es la progesterona. Así, puede observarse un efecto inhibitorio hacia ambos receptores al momento en que la progesterona aumenta significativamente sus niveles. Ha sido previamente demostrado que las gonadotrofinas (Byers y col., 1997) y los estrógenos (Sharma y col., 1999) regulan negativamente la expresión del RE $\beta$  en las células de la granulosa y ambos receptores de estrógenos muestran una tendencia hacia la regulación positiva en paralelo al aumento de los niveles de estrógenos en el líquido folicular hecho que se correlaciona con la regulación positiva de los receptores de LH y de FSH (Berisha y col., 2000, 2002).

En este sentido, el gen que codifica para RE $\alpha$  no comienza a expresarse en tanto los niveles de progesterona no descienden hasta valores basales (Roy y Kole, 1995). Por el

contrario, el gen del RE $\alpha$  puede ser menos sensible a los efectos estimulantes de los estrógenos, ya que la transcripción no se inicia hasta que los niveles de esta hormona se encuentran elevados. Por otro lado, el gen que codifica para el RE $\beta$  es más sensible a los efectos de los estrógenos debido a que, al aumentar estos últimos, los efectos de la progesterona son revertidos (Roy y Kole, 1995).

En este sentido, los resultados de estas tesis indican que la exposición a estrés por calor durante el primer período de gestación y particularmente en el primer trimestre se asociaron con un aumento en la concentración plasmática de E2 previo a la ovulación en las hijas durante la adultez, lo que pudo influir en la proporción de subtipos de RE que se expresa y por ende en las acciones de estos E2 sobre las células blanco.

La progesterona, a través de su receptor (RP), juega un papel fundamental en la funcionalidad de los órganos reproductivos de la hembra ya que media el control de los procesos de desarrollo, proliferación y diferenciación durante el ciclo reproductivo y la preñez (Grimm y col., 2016), influyendo en la ovulación, implantación embrionaria y mantenimiento de la preñez (Graham y Clark, 1997; Ogle y col., 1998; Rekawiecki y col., 2018). Los efectos fisiológicos de la P4 son realizados a través de mecanismos genómicos por la vía de los receptores nucleares específicos de progesterona y mediante mecanismos no genómicos relacionados a un receptor específico de membrana (Rekawiecki y col., 2018). El RP se presenta en dos isoformas principales en mamíferos, RP-A y RP-B, y una menos abundante que es la RP-C. La isoforma RP-A, que corresponde a una forma truncada del RP-B, actúa como un inhibidor de esta, reduciendo así los efectos de P4 (Pieber y col., 2001) e incluso ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la actividad de otros receptores nucleares (Mulac-Jericevic y Conneely, 2004). La presencia de estas isoformas en la célula blanco puede explicar parcialmente la complejidad de los procesos intracelulares que participan en respuesta a la progesterona (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000; Jo y col., 2002), demostrando que sus funciones transcripcionales dependen del contexto del promotor y del tipo celular (Fang y col., 2002; Brosens, 2004). Dichas isoformas se han encontrado en células del oviducto (Ulbrich y col., 2003) y endometrio bovino (Kowalik y col., 2013), glándula mamaria (Schams y col., 2003) y cuerpo lúteo (Kotwica y col., 2004). En

bovinos hemos descrito previamente la expresión de RP en los distintos componentes del folículo ovárico (Salvetti y col., 2012). En este trabajo nos hemos centrado en analizar la expresión del PR total a nivel ovárico siendo uno de los primeros trabajos, en demostrar una asociación de dicho receptor con el estrés por calor. La expresión del RP a nivel folicular indica que la P4 desempeña un papel fundamental en la regulación en las funciones y crecimiento folicular (Van Den Broeck y col., 2002). Si bien algunos autores describen una expresión del RP más prominente en células de la teca interna de folículos terciarios en comparación con las células de la granulosa, las diferentes isoformas del RP son inducidas específicamente en las células de la granulosa de folículos preovulatorios en respuesta a la estimulación de LH y E2 ejerciendo una regulación hormonal en el ovario (Natraj y Richards, 1993; Brosens, 2004). De este modo, la P4 unida al RP, en asociación con la prostaglandina F2 $\alpha$ , la prostaglandina E2 y un grupo de proteasas conforman un conjunto equilibrado que interviene durante el periodo periovulatorio, involucrado en el proceso de ovulación, dependiente de las gonadotropinas (Fortune y col., 2009). En ovejas, durante el desarrollo fetal, la expresión del RP, así como del RA, RE $\alpha$  y RE $\beta$ , es sometida a cambios específicos de tipo folicular, celular y temporal (Juengel y col., 2006). También se ha identificado la presencia del RP en núcleos de células estromales de las carúnculas bovinas durante el segundo y último tercio de la gestación, sugiriendo a la P4 como un factor parácrino en la regulación del crecimiento, diferenciación y funciones de la placenta (Schuler y col., 1999). En este trabajo observamos una asociación positiva entre la expresión proteica del RP en células de la teca interna y el índice de exposición a valores de ITH mayores a 72 durante el segundo periodo de gestación (151 días hasta el nacimiento) aunque no hubo asociaciones en células de la granulosa. Esto indicaría que la exposición a estrés térmico en el último periodo de gestación podría alterar los patrones de expresión del RP en la hembra adulta.

#### **5.4 INFLUENCIA DEL ESTRÉS CALÓRICO SOBRE LA PROGRAMACIÓN FETAL:**

##### **EXPRESIÓN DE LOS CORREGULADORES EN LOS FOLÍCULOS PEOVULATORIOS**

Las acciones de los receptores nucleares sobre el ADN dependen críticamente del reclutamiento de proteínas correguladoras que conforman el complejo de

transcripción, y que puede estimular (coactivadores) o reprimir (correpresores) la transcripción de un determinado gen (Smith y O'Malley, 2004; Auger y Jessen, 2009; Jia y col., 2015). En este trabajo, la expresión de los correguladores SRC1, RIP140, LCor, REA y SMRT fue detectada en ambas poblaciones celulares del folículo preovulatorio. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se han identificado variaciones en la expresión de algunas de estas moléculas correguladoras en ovarios bovinos con enfermedad quística ovárica (Salveti y col., 2012) y persistencia folicular ovárica (Notaro y col., 2016). En este estudio se observan diferencias en la expresión de estos correguladores en ovarios de hembras bovinas gestadas bajo condiciones de estrés en diferentes estadios de gestación.

Los coactivadores, por definición, no interactúan directamente con el ADN, sino que lo hacen de forma indirecta a través de la asociación con factores de transcripción, entre los cuales se encuentran los receptores de hormonas esteroides (Noriega Reyes y Langley McCarron, 2008). Los coactivadores, generalmente, se agrupan en complejos multiproteicos que modifican la cromatina mediante mecanismos de acetilación y metilación de las histonas para facilitar la transcripción al interactuar con factores involucrados en este proceso. Asimismo, permiten el reclutamiento de la maquinaria para la transcripción en general y participan de la activación de la polimerasa II (Klinge, 2000; McKenna y O'Malley, 2002). Estudios en ratones con el gen de SRC-1 silenciado han demostrado que este coactivador está implicado en la regulación tanto positiva como negativa del gen de la hormona liberadora de corticotropina y es un factor importante para la adaptación al estrés (Lachize y col., 2009). La disrupción del gen de SRC-1 en ratones resulta en una disminución del crecimiento y desarrollo de los órganos reproductivos sin modificar su viabilidad y su fertilidad (Xu y col., 1998; Dasgupta y col., 2014). Muchos coactivadores parecen facilitar el acceso de factores de transcripción al sitio promotor del ADN a través de su actividad intrínseca histona acetil transferasa (HAT) o por medio de la asociación con elementos que posean dicha actividad. Estos cambios en la estructura de la cromatina permiten el reclutamiento de factores de transcripción adicionales y subsecuentemente conducen a incrementar la transcripción (McKenna y col., 1999a; Rosenfeld y Glass, 2001; Auger y Jessen, 2009). En este trabajo no se hallaron asociaciones estadísticamente significativas entre las

variables relativas a estrés por calor y la expresión proteica de SRC-1 en células de la granulosa y de la teca. Sin embargo, sí se encontraron asociaciones con la expresión proteica de algunos correpresores que se discutirán a continuación.

A diferencia de los coactivadores, los correpresores están involucrados en suprimir o silenciar la transcripción génica, mediante función intrínseca o reclutamiento de desacetilasas de histonas, incrementando la condensación de la cromatina e inhibiendo, así, la transcripción génica (Lazar, 2003; Auger y Jessen, 2009). Es así que los correpresores forman parte de complejos multiproteicos que impiden el acceso de factores de la transcripción durante el proceso de templado, por lo que la transcripción es inhibida (Noriega Reyes y Langley McCarron, 2008). Muchas moléculas correguladoras han sido detectadas en el ovario normal en relación a los distintos receptores de hormonas esteroideas (Hlaing y col., 2001; Hussein-Fikret, 2005; Chang y col., 2005), indicando que la regulación espacio-temporal de la expresión génica mediada por los distintos receptores nucleares es crítica en la fertilidad (Leonardsson y col., 2002). En trabajos previos de nuestro laboratorio, se ha detectado la expresión de diferentes correguladores en el ovario bovino de animales sanos y con enfermedades reproductivas (Salveti y col., 2012; Notaro y col., 2016).

Las alteraciones en la ovulación son una de las causas más frecuentes de infertilidad en las hembras y varios autores han encontrado que RIP-140 es un correpresor que está íntimamente involucrado en el proceso de ovulación (White y col., 2000). Se ha demostrado que RIP-140 interactúa preferentemente con RE $\beta$  en comparación con RE $\alpha$  (Docquier y col., 2013) y que el número de sitios de unión de RIP-140 se incrementa significativamente sobre la expresión de RE $\beta$ , lo que sugiere una acción preferencial de RIP-140 con este subtipo (Madak-Erdogan y col., 2013). RIP-140 actúa mediante reclutamiento de desacetilasas de histonas hacia los receptores ligados al ADN y de esta forma revierte los efectos de las acetiltransferasas de histonas (Brosens y col., 2004). En el presente trabajo se pudo detectar la expresión proteica de RIP-140 en el folículo preovulatorio, tanto en células de la granulosa como de la teca. Se pudo detectar una asociación negativa entre la expresión de este correpresor y las variables de estrés por calor en el primer periodo (0 a 150 días) y en el primer trimestre de gestación; lo que podría indicar que a mayor exposición en los primeros meses

gestación, la expresión de este correpressor sería menor en la vida adulta. En este sentido, las mismas asociaciones se evidenciaron con respecto a las células de la teca, aunque, en el segundo periodo gestacional (151 días hasta el nacimiento) y en el tercer trimestre de la gestación, la asociación fue positiva lo que indicaría que a mayor exposición a altos ITH la expresión de este corre regulador en la adultez fue mayor. Estos resultados sugieren que hacia las etapas finales de vida intrauterina el patrón de expresión de RIP-140 se revertiría, modulando así, la expresión de los RE en el ovario bovino.

El LCoR representa una clase diferente de correpressor de receptores nucleares que actúa atenuando la señal mediante agonistas unidos a receptores. El LCoR comienza a expresarse desde el estadio de embrión de dos células, lo que sugiere que desempeña sus funciones ya en estadios tempranos de desarrollo embrionario. La función de LCoR como atenuante de la señal de receptores nucleares sugiere que podría ser un importante modulador de las señales de hormonas esteroides en sincitiotrofo blastos, ya que en sus capas se expresan receptores de estrógenos, progesterona y glucocorticoides (Fernandes y col., 2003). En estudios in vitro realizados previamente, de células de glándula mamaria humana se determinó que LCOR tiene funciones en la expresión genética y en la supervivencia de las células mamarias (Calderon y col., 2014). En este trabajo no se evidenciaron asociaciones entre las variables de estrés y la expresión de este corre regulador en células de la granulosa. Por su parte, en células de la teca se pudo observar una asociación positiva entre las variables de estrés en el segundo periodo y el tercer trimestre de vida intrauterina con la expresión de este correpressor en la vida adulta. Esto podría estar indicando que la exposición a condiciones ambientales extremas a finales de preñez podría afectar la expresión de este corre regulador en la vida adulta y así llevar a una regulación de las acciones de los receptores de hormonas esteroideas alterada. Por otro lado, logramos evidenciar una asociación entre las variables de estrés durante el primer trimestre de vida intrauterina y la expresión de LCoR en las células de la teca de folículos preovulatorios obtenidos en la vida adulta. Estas asociaciones inversas podrían estar indicando que este corre regulador tendría efectos antagónicos según el momento de la vida intrauterina en el que se está expuesto a las condiciones adversas.

Por su parte, el correpresor REA es clave en la regulación de las acciones del RE en glándula mamaria y tracto reproductivo de la hembra, así como también en células cancerígenas mamarias (Park y col., 2005, 2011 y 2012). Resultados previos han demostrado que REA se localiza en el núcleo celular y es capaz de modular la actividad transcripcional mediante interacción con varios factores de transcripción, ya sea directamente o a través de interacciones con proteínas remodeladoras de la cromatina (Matsuyama y col., 1997). Además, puede traslocarse desde el citoplasma al núcleo o viceversa en muchas células, incluidas las células de la granulosa de folículos que experimentan atresia y estas proteínas son marcadamente visibles en células de folículos antrales pequeños y grandes (Thompson y col., 2004). En este sentido, en esta tesis se pudo determinar expresión de REA en el citoplasma de células de la teca y de la granulosa. Las variables relativas al estrés por calor y la expresión de REA en células de la granulosa, no presentaron asociaciones significativas en este trabajo. Por el contrario, en las células de la teca la asociación fue positiva, durante el segundo periodo y el tercer trimestre de gestación, mostrando que una mayor exposición a valores de ITH elevados se acompañaría de una mayor expresión proteica de este correpresor en las células de la teca de los folículos preovulatorios dominantes.

El SMRT es un correpresor que forma parte de un complejo proteico que contiene deacetilasas de histonas que se une a antiestrógenos ligados a  $RE\alpha$  y contribuye a la regulación negativa de la expresión génica (Peterson y col., 2007). Este correpresor interactúa con  $RE\alpha$  en presencia de moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), como por ejemplo 4HT (4-hidroxitamoxifeno), y reprime la débil actividad agonista de este antiestrógeno (Jackson y col., 1997; Lavinsky y col., 1998; Smith y col., 1997; Zhang y col., 1998). La expresión de SMRT se detectó tanto en ovarios normales como en tumores ováricos de diferentes tipos (Hussein-Fikret y Fuller, 2005). En este trabajo logramos detectar este corregulador en folículos preovulatorios de hembras adultas cuyas madres sufrieron estrés por calor durante la gestación. Los resultados obtenidos con respecto a la expresión de esta proteína y la asociación con las variables relativas al estrés calórico no son del todo claros. Por un lado, se hallaron asociaciones positivas entre la expresión de SMRT únicamente con el índice de exposición del primer periodo de gestación denotando mayor expresión

proteica en células de la teca cuanto mayor fue la exposición a temperaturas elevadas. El mismo patrón se observó durante el segundo trimestre de gestación, incluso en células de la granulosa. Mientras que se evidenció una asociación negativa entre el índice de exposición a  $ITH \geq 72$  y la expresión de SMRT en células de la granulosa en el tercer trimestre gestacional. Estos datos evidencian la alteración en la expresión de este corregulador en la vida adulta de animales que han estado expuestos a condiciones adversas durante su vida intrauterina, participando luego, en la modulación de la expresión diferencial de los receptores hormonales aquí estudiados.

Teniendo en cuenta las acciones de los estrógenos a nivel ovárico que incluyen la estimulación de la proliferación y diferenciación celular durante la foliculogénesis, disminución de la apoptosis, estimulación de la secreción de factores de crecimiento, incremento de las uniones estrechas entre las células de la granulosa, aumento de la expresión de receptores para gonadotrofinas en el folículo, etc. (Rosenfeld y col., 2001); cualquier cambio en la expresión y concentración de los distintos subtipos de receptores de estrógenos, así como su regulación por parte de las proteínas correguladoras puede llevar a modificaciones en el modo de acción de los estrógenos sobre sus células blanco. Si bien las consecuencias de estos cambios no están claras todavía, hay que considerar que ambos subtipos tienen diferente afinidad por el  $17\text{-}\beta$ -estradiol y además es posible la formación de heterodímeros cruzados entre los dos tipos de RE. Bajo estas circunstancias sería de esperar que pequeños cambios en la relación  $RE\alpha/RE\beta$  interrumpieran la foliculogénesis normal llevando a alteraciones reproductivas en la vida productiva de los animales (Mosselman y col., 1996; Taft y col., 1996; Pettersson y col., 1997; Lingenfelter y col., 2007). Así, los efectos del estradiol en estas condiciones pueden llevar a cambios en el balance proliferación/apoptosis (Isobe y Yoshimura, 2000a y b), en las concentraciones de receptores para gonadotrofinas (Calder y col., 2001), en las acciones de las enzimas y en el metabolismo celular (Calder y col., 2001), etc. En el mismo sentido los cambios en la expresión de las diferentes isoformas de los RP en los mismos tejidos pueden contribuir con los desbalances a nivel ovárico o en los órganos reproductivos impidiendo la correcta ovulación, fertilización e implantación.

La regulación epigenética tiene como objetivo garantizar que los animales se encuentren en mejores condiciones y tengan ventajas adaptativas de algún tipo en su vida futura. Las modificaciones tempranas en términos epigenéticos permitirían la adaptación inmediata a un medio desfavorable modificando partes de la organización metabólica con efectos a largo plazo. Por otro lado, la adaptación epigenética se presenta como un proceso biológico complejo que permite ajustes a las perturbaciones ambientales, tales como el efecto materno, el cual puede condicionar cambios transgeneracionales adaptativos (Quintero 2011). En este contexto, los procesos de adaptación epigenética constituirían un intermedio entre los conceptos de adaptación fisiológica y de adaptación en términos darwinianos con consecuencias transgeneracionales. Es probable que, los cambios observados, respondan a esta premisa pudiendo las variaciones en las asociaciones entre las condiciones ambientales adversas y las variables evaluadas en la presente tesis, tener como fin un ajuste de los parámetros reproductivos a largo plazo.

## **6. CONCLUSIONES**

En este trabajo de tesis, se ha logrado evidenciar alteraciones en la concentración de hormonas esteroides a nivel sistémico y local como en la expresión de receptores para estas hormonas en los ovarios de vacas adultas cuyas madres fueron expuestas a estrés por calor durante la preñez. En este sentido, se pudo evidenciar asociaciones entre las variables de exposición a estrés térmico analizadas y la expresión proteica de receptores y sus correguladores, así como en los patrones de metilación en sitios CpGs de las 5'UTR de los receptores  $ER\alpha$  y  $ER\beta$ . Esto permite suponer que dichas variaciones en la expresión de los receptores hormonales, pueden deberse tanto a diferencias en los patrones de metilación de los sitios CpG ubicados en la región 5'UTR de los receptores como a la relación entre los diferentes subtipos, el ADN y las proteínas correguladoras. Se debe tener en cuenta que, además de la metilación del ADN, existen otras modificaciones epigenéticas que no fueron estudiadas en este trabajo pero que también podrían desempeñar un papel fundamental en la regulación de la expresión génica.

En estos resultados se exponen los primeros indicios de un eventual efecto del estrés por calor en la programación fetal en vacas lecheras. Así, es un punto de inicio para investigaciones futuras en este aspecto, que permitirá comprender los mecanismos implicados en la funcionalidad ovárica y la fertilidad.

En un sentido más amplio, los resultados obtenidos pueden ser usados como una herramienta de diagnóstico que permita la mejora en las condiciones ambientales en que se encuentran los animales durante el periodo estival, ampliando las condiciones de sombra en los potreros e instalaciones de ordeño, acceso a las aguadas, entre otras.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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 JM, Bols PE. 2010. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod Domest Anim.* 45: 171-179.

Akbarinejad V, Gharagozlou F, Vojgani M. 2017. Temporal effect of maternal heat stress during gestation on the fertility and anti-Müllerian hormone concentration of offspring in bovine. *Theriogenology.* 99: 69–78.

Akison LK, Robker RL. 2012. The critical roles of progesterone receptor (PGR) in ovulation, oocyte developmental competence and oviductal transport in mammalian reproduction. *Reprod Domest Anim.* 47: 288-296.

Alfaro NS, Salvetti NR, Velázquez MML, 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: 478-485.

Amrozi Kamimura S, Ando T, Hamana K. 2004. Distribution of estrogen receptor  $\alpha$  in the dominant follicles and corpus luteum at the three stages of estrous cycle in Japanese black cows. *J Vet Med Sci* 66: 1183-1188.

Arroyo-Jousse V, García-Díaz DF, Pérez-Bravo F. 2015. La metilación global del ADN y los niveles de homocisteína en plasma se encuentran disminuidos en pacientes con diabetes mellitus tipo 1. *Rev Med Chile.* 143:562-568.

Auger AP, Jessen HM. 2009. Corepressors, nuclear receptors, and epigenetic factors on DNA: A tail of repression. *Psychoneuroendocrinology*, 34: S39-S47.

Baddela VS, Baufeld A, Yenuganti VR, Vanselow J, Singh D. 2014. Suitable housekeeping genes for normalization of transcript abundance analysis by real time RT-PCR in cultured bovine granulosa cells during hypoxia and differential cell plating density. *Reprod Biol Endocrinol.* 12: 118.

Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, Grootegoed JA. 1995. Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology.* 136: 4951-4962.

Bae S, Xiao Y, Li G, Casiano CA, Zhang L. 2003. Effect of maternal chronic hypoxic exposure during gestation on apoptosis in fetal rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285:H983–H990.

Bakker J, Brock O. 2010. Early oestrogens in shaping reproductive networks: evidence for a potential organisational role of oestradiol in female brain development. *J Neuroendocrinol.* 22:728–735

Bannister A, Kouzarides T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21:381-395.

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.

Barlow D. 2011. Genomic Imprinting: A Mammalian Epigenetic Discovery Model. *Annu Rev Genet.* 45: 379-403.

Berisha B, Pfaffl M, Schams D. 2002. Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrous cycle and pregnancy. *Endocrine* 17: 207-214.

Bhandari RK, Taylor JA, Sommerfeld-Sager J, Tillit DE, Ricke WA, Vom Saal FS. 2019. Estrogen receptor 1 expression and methylation of *Esr1* promoter in mouse fetal prostate mesenchymal cells induced by gestational exposure to bisphenol A or ethinylestradiol. *Environ Epigenet*, 5:dvz012.

Bhavnani BR, Tam SP, Lu X. 2008. Structure activity relationships and differential interactions and functional activity of various equine estrogens mediated via estrogen receptors (ERs) ERalpha and ERbeta. *Endocrinology.* 149: 4857-4870.

Binder AK, Rodriguez KF, Hamilton KJ, Stockton PS, Reed CE, Korach KS. 2013. The absence of ER-b results in altered gene expression in ovarian granulosa cells isolated from in vivo preovulatory follicles. *Endocrinology.* 154: 2174-2187.

Björnström L, Sjöberg M. 2005. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Mol Endocrinol.* 19: 833-842.

Bollati V, Baccarelli A. 2010. Environmental epigenetics. *Heredity.* 105:105-112.

Borensztein M, Syx L, Ancelin K, Diabangouaya P, Picard C, Liu T, Liang JB, Bossis I, Wettemann RP, Welty SD, Vizcarra J, Spicer LJ. 2000. Nutritionally induced anovulation

in beef heifers: ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. *Biol Reprod* 62: 1436-1444.

Bossis I, Wettemann RP, Welty SD, Vizcarra JA, Spicer LJ, Diskin MG. 1999. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *J Anim Sci.* 77: 1536-1546.

Bourc'his D, Bestor TH. 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3 L. *Nature.* 431:96-99.

Bramley T. 2003. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction.* 125: 3-15.

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

Bridges PJ, Brusie MA, Fortune JE. 2005. Elevated temperatura (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. *Domest Anim Endocrinol.* 29: 508-522.

Britt KL, Saunders PK, McPherson SJ, Misso ML, Simpson ER, Findlay JK. 2004. Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biol Reprod.* 71:1712-1723.

Brock O, Baum MJ, Bakker J. 2011. The development of female sexual behavior requires prepubertal estradiol. *J Neurosci.* 31:5574–5578.

Brosens JJ. 2004. Steroid receptor action. *Best Pract Res Cl Ob* 18: 265-283.

Bruin JE, Gerstein HC, Holloway AC. 2010. Long-term consequences of fetal and neonatal nicotine exposure: a critical review. *Toxicol Sci.* 116:364–374.

Burkhart MN, Juengel JL, Smith PR, Heath DA, Perry GA, Smith M, Garverick HA. 2009. Morphological development and characterization of aromatase and estrogen receptors alpha and beta in fetal ovaries of cattle from days 110 to 250. *Anim Reprod Sci.* 117: 43-54.

Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Knight PG, Ireland JJ. 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod.* 73:54-62.

Burns KA, Korach KS. 2012. Estrogen receptors and human disease: an update. *Arch Toxicol.* 86: 1491-1504

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL. 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55:611–622.

Byers M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Park-Sarge OK. 1997. Estrogen receptor- $\beta$  mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotrofins. *Mol Endocrinol.* 11:172-182.

Cáceres R, Martínez-Aguayo JC, Arancibia M, Sepúlveda E. 2017. Efectos neurobiológicos del estrés prenatal sobre el nuevo ser. *Revista chilena de Neuropsiquiatría.* ISSN 0717-9227.

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.

Carroll JA, Forsberg NE. 2007. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 23:105-149.

Cedar H, Bergman Y. 2012. Programming of DNA methylation patterns. *Annu. Rev. Biochem.* 81:97-117.

Chang SY, Kang HY, Lan KC, Chang CY, Huang FJ, Tsai MY, Huang KE. 2005. Expression of steroid receptors, their cofactors, and aromatase in human luteinized granulosa cells after controlled ovarian hyperstimulation *Fertil Steril.* 83: 1241–1247.

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

Chavatte-Palmer P, Velazquez MA, Jammes H, Duranthon V. 2018. Review: Epigenetics, developmental programming and nutrition in herbivores. *Animal.* 1:9.

Chen M, Zhang L. 2011. Epigenetics mechanisms in developmental programming of adult disease. *Drug Discovery Today.* 16: 1007-1018.

Christophersen NS, Helin, K. 2010. Epigenetic control of embryonic stem cell fate, *J Exp Med* 207:2287-2295.

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.

Cline HB, Neville BW, Lardy GP, Caton JS. 2009. Influence of advanced season on dietary composition, intake, site of digestion, and microbial efficiency in beef steers grazing a native range in western North Dakota. *J Anim Sci.* 87:375-383.

Collier RJ, Renquist BJ, Xiao Y. 2017. A 100-Year Review: Stress physiology including heat stress. *J Dairy Sci.* 100:10367–10380

Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. 2002. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res.* 57: 339-355.

Conneely OM. 2001. Perspective: female steroid hormone action. *Endocrinology* 142: 2194-2199.

Costenbader KH, Gay S, Riquelme ME, Iaccarino L, Doria A. 2011. Genes, epigenetic regulation and environmental factors: which is the most relevant in developing autoimmune diseases? *Autoimmun Rev.* 11(8):604-9.

Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafson JA, Korach KS. 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor alpha (ERalpha) and estrogen receptor beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology.* 138:4613-4621.

Couse JF, Yates MM, Deroo BJ, Korach KS. 2005. Estrogen receptor beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology.* 146: 3247-3262.

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.

D'Haeseleer M, Cocquyt G, Van Cruchten S, Simoens P, Van Den Broeck W. 2006. Cell-specific localisation of apoptosis in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle. *Theriogenology* 65: 757-772.

- D'haeseleer M, Van PM, Van den Broeck W. 2005. Cell-specific localization of oestrogen receptor beta (ESR2) mRNA within various bovine ovarian cell types using in situ hybridization. *Anat Histol Embryol.* 34: 265–272.
- Dasgupta S, Lonard DM, O'Malley BW. 2014. Nuclear receptor coactivators: master regulators of human health and disease. *Annu Rev Med.* 65:279-292.
- Davies PC. 2012. The epigenome and top-down causation. *Interface Focus.* 2(1):42–48.
- De Rensis F, Garcia-Ispuerto I, López-Gatius F. 2015. Seasonal heat stress: Clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows. *Theriogenology.* 84:659–666.
- De Rensis F, Scaramuzzi RJ. 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow-A review. *Theriogenology.* 60:1139–1151.
- Dellmann HD. 1994. Sistema reproductor femenino. En: Dellmann HD, *Histología Veterinaria*. 2da edición. p 267-290. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Deroo BJ, Korach KS. 2006. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest.* 116:561-570.
- Deroo BJ, Rodriguez KF, Couse JF, Hamilton KJ, Collins JB, Grissom SF, Korach KS. 2009. Estrogen receptor beta is required for optimal cAMP production in mouse granulosa cells. *Mol Endocrinol.* 23: 955-965.
- Deuve JL, Avner P. 2011. The coupling of X-chromosome inactivation to pluripotency. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27:611-629.
- Díaz PU, Stangaferro ML, Gareis NC, Silvia WJ, 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.
- Díaz R, Barba F. 2016. Estrés prenatal y sus efectos sobre el neurodesarrollo. *Revista Médica Clínica Las Condes.* Vol 27, Issue 4. 441-446.
- Dieleman SJ, Kruip TA, Fontijne P, de Jong WH, van der Weyden GC. 1983. Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J Endocrinol.* 97:31-42.
- Dobson H, Smith RF. 1995. Stress and reproduction in farms animals. *J Reprod Fertil (Suppl)* 49: 451-461.

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.

Docquier A, Garcia A, Savatier J, Boulahtouf A, Bonnet S, Bellet V, Busson M, Margeat E, Jalaguier S, Royer C, Balaguer P, Cavailles V. 2013. Negative Regulation of Estrogen Signaling by ER $\beta$  and RIP140 in Ovarian Cancer Cells. *Mol Endocrinol.* 27: 1429-1441.

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

Drummond AE, Baillie AJ, Findlay JK. 1999. Ovarian estrogen receptor alpha and beta mRNA expression: impact of development and estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology* 149:153–161.

Drummond AE, Britt KL, Dyson M, Jones ME, Kerr JB, O'Donnell L, Simpson ER, Findlay JK. 2002. Ovarian steroid receptors and their role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 191: 27–33.

Drummond AE. 2006. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol* 4: 16.

Dupont C, Cordier AG, Junien C, Mandon-Pépin B, Levy R, Chavette-Palmer P. 2012. Maternal environment and the reproductive function of the offspring. *Theriogenology.* 78(7): 1405-1414.

Ehrich M, Nelson MR, Stanssens P, Zabeau M, Liloglou T, Xinarianos G, Cantor CR, Field JK, van den Boom D. 2005. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proceed Nat Acad Sci.* 102: 15785–15790.

Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, Gal M, Zylber-Haran E, Margalioth EJ. 2005. Dynamic assays of inhibin B, anti-Müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod.* 20: 3178-3183.

Elgindy EA, El-Haieg DO, El-Sebaey A. 2008. Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril.* 89: 1670-1676.

Emmen JM, Couse JF, Elmore SA, Yates MM, Kissling GE, Korach KS. 2005. In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER)  $\alpha$  and ER $\beta$  null mice indicate a role for ER $\beta$  in follicular maturation. *Endocrinology*. 146: 2817-2826.

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. 1997. Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal localization and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*. 82:4258-4265.

Ernst J, Kheradpour P, Mikkelsen TS, Shoresh N, Ward LD, Epstein CB, Zhang X, Wang L, Issner R, Coyne M, Ku M, Durham T, Kellis M, Bernstein BE. 2011. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*. 473:43-49.

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.

Evans ACO, Ireland JLH, Winn ME, Lonergan P, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ. 2004. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biol Reprod*. 70:1475–1484.

Evans ACO, Mossa F, Walsh SW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Ireland JJ. 2012. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod Dom Anim*. 47: 31-37.

Fan L, Lindsley SR, Comstock SM, Takahashi DL, Evans AE, He GW, y col. 2013. Maternal high-fat diet impacts endothelial function in nonhuman primate offspring. *Int J Obes (Lond)*. 37:254e62.

Fang X, Wong S, Mitchell BF. 2002. Messenger RNA for progesterone receptor isoforms in the late-gestation rat uterus. *Am J Physiol Endoc M*. 283: E1167-E1172.

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

Fernandes I, Bastien Y, Wai T, Nygard K, Lin R, Cormier O, Lee HS, Eng F, Bertos NR, Pelletier N, Mader S, Han VKM, Yang XJ, White JH. 2003. Ligand-Dependent Nuclear Receptor Corepressor LCoR Functions by Histone Deacetylase-Dependent and -Independent Mechanisms. *Molecular Cell*. 11: 139-150.

Ferreira FC, Gennan RS, Dahl GE, De Vries A. 2016. Economic feasibility of cooling dry cows across the United States. *J Dairy Sci*. 99:9931-9941.

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 factorbeta superfamily. *Mol Cell Endocrinol.* 191: 35-43.

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

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

Fortune JE, Willis EL, Bridges PJ, Yang CS. 2009. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADMTS proteases. *Animal Reproduction*; 6: 60-71.

Fortune JE, Yang MY, Allen JJ, Herrick SL. 2013. The ovarian follicular reserve in cattle: what regulates its formation and size? *J Anim Sci.* 91:3041-50.

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.

Gabory A, Attig L, Junien C. 2011. Developmental programming and epigenetics. *Am J Clin Nutr* 94, 1943S–1952S.

Gallardo MR, Valtorta SE, Leva PE, Gaggiotti MC, Conti GA, Gregoret RF. 2005. Diet and cooling interactions on physiological responses of grazing dairy cows, milk production and composition. *Int J Biometeorol.* 50: 90–95.

Gallardo M, Valtorta S. 2011. Estrés por calor en ganado lechero: impactos y mitigación. *Producción y bienestar animal. Hemisferio Sur.* 124 p.

García K, Gastaldi L, Ghiano J, Dominguez J, Sosa N, Massoni F, Walter E, Ferreira M, Taverna M. 2010. Manejo del estrés calórico en el tambo. INTA. Ficha técnica Nº 13.

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

- Gaub MP, Bellard M, Scheuer I, Chambon P, Sassone-Corsi P. 1990. Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell* 63:1267-1276.
- Gava N, Clarke CL, Byth K, Arnett-Mansfield RL, De Fazio A. 2004. Expression of progesterone receptors A and B in the mouse ovary during the estrous cycle. *Endocrinology* 145: 3487-3494.
- Geneser F. 2005. Órganos de la reproducción, órganos reproductores femeninos. En: Geneser F, *Histología*. 3ra edición. p 615-626. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Ghiano J, Taverna MA, Gastaldi L, Walter E. 2014. Manejo del estrés calórico. Jornada Nacional de Forrajes Conservados. INTA EEA Rafaela
- 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, Beg MA, Kot K. 2002. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. *Reproduction.* 124: 475-482.
- 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.
- Glass CK, Rosenfeld MG. 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14:121-41.
- Goll MG, Bestor TH. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem.* 74:481-514.
- Gougelet A, Mueller SO, Korach KS, Renoir JM. 2007 Oestrogen receptors pathways to oestrogen responsive elements: the transactivation function-1 acts as the keystone of oestrogen receptor (ER) beta-mediated transcriptional repression of ERalpha. *J Steroid Biochem.* 104: 110-122.
- 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.
- Govindaraj S, Shanmuganathan A, Rajan R. 2017. Maternal psychological stress-induced developmental disability, neonatal mortality and stillbirth in the offspring of Wistar albino rats. *PLoS One.* V. 12 (2).

Graham JD, Clarke CL. 1997. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocr Rev.* 18: 502-519.

Grandin T. 1997. Assessment of stress during handling and transport. *J Anim Sci.* 75: 249-257.

Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP. 2016. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol.* 428: 3831-3849.

Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I. 2000. Las isoformas del receptor de progesterona: función y regulación. *Rev Invest Clin.* 52: 686-691.

Gurevich I, Flores AM, Aneskievich BJ. 2007. Corepressors of Agonist-Bound Nuclear Receptors. *Toxicol Appl Pharmacol.* 223: 288-298.

Hafez ESE, Hafez B. 2002. Anatomía del aparato reproductor de la hembra. En: Hafez ESE, Hafez B, *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales.* p 13-29. Ed: McGraw-Hill Interamericana, México DF.

Hahn GL, Mader TL, Gaughan JB, Hu Q, Nienaber JA. 2000. Heat waves and their impacts on feedlot cattle. Geneva. pp 353-357

Hall JM, McDonnell DP. 1999. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology.* 140: 5566-5578.

Hamilton KJ, Hewitt SC, Arai Y, Korach KS. 2017. Estrogen hormone biology. *Nuclear Receptors in Development and Disease.* *Curr Top Dev Biol.* 125:109-146.

Han SJ, DeMayo FJ, Xu J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 2006. Steroid receptor coactivator (SRC)-1 and SRC-3 differentially modulate tissue-specific activation functions of the progesterone receptor. *Mol Endocrinol.* 20: 45-55.

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

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.

Hegele-Hartung C, Siebel P, Peters O, Kosemund D, Müller G, Hillisch A, Fritzscheier KH. 2004. Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:5129-5134.

Hevener AL, Clegg DJ, Mauvais-Jarvis F. 2015. Impaired estrogen receptor action in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 418:306-321.

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

Hirshfield AN. 1985. Comparison of granulosa cell proliferation in small follicles of hypophysectomized, prepubertal, and mature rats. *Biol Reprod.* 32: 979-987.

Hlaing M, Nam K, Lou J, Pope WF, Nephew KP. 2001. Evidence for expression of estrogen receptor cofactor messenger ribonucleic acid in the ovary and uterus of domesticated animals (sheep, cow and pig). *Life Sci.* 68: 1427-1438.

Hochedlinger, K. Plath, K. 2009. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development.* 136:509-523.

Hunter MG, Robinson RS, Mann GE, Webb R. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim Reprod Sci.* 82-83:461-77.

Hussein-Fikret S, Fuller PJ. 2005. Expression of nuclear receptor coregulators in ovarian stromal and epithelial tumours. *Mol Cell Endocrinol* 229: 149–160.

Illingworth, RS. Bird, AP. 2009. CpG islands-‘A rough guide’. *FEBS Lett.* 583:1713-1720.

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, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Mossa F, Lonergan P, Evans AC. 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod Fertil Dev.* 23:1-14.

Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO. 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod.* 22:1687–1695.

Ireland JJ, Zielak AE, Jimenez-Krassel F, Folger J, Bettgowda A, Scheetz D, Walsh S, Mossa F, Knight PG, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO. 2009. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian

biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biol Reprod* 80:954–964.

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

Ireland JL, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen AP, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans AC, Ireland JJ. 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod*. 79:1219-1225.

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.

Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB. 1997. The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol. Endocrinol*. 11:693–705.

Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science*. 293:1074-1080.

Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. 2015. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29, 557-568.

Jimenez-Krassel F, Folger J, Ireland JH, Smith GW, Hou X, Davis JS, Lonergan P, Evans AC, Ireland JJ. 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy Young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during reproductive cycles of single-ovulating species. *Biol Reprod*. 80:1272-1281.

Jimenez-Krassel F, Scheetz DM, Neuder LM, Pursley JR, Ireland JJ. 2017. A single ultrasound determination of  $\geq 25$  follicles  $\geq 3$  mm in diameter in dairy heifers is predictive of a reduced productive life. *J Dairy Sci*. 100:1-9.

Jimenez-Krassel F, Scheetz DM, Neuder LM, Ireland JLH, Pursley JR, Smith GW, Tempelman RJ, Ferris T, Roudebush WE, Mossa F, Lonergan P, Evans ACO, Ireland JJ. 2015. Concentration of Anti-Müllerian Hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *J Dairy Sci*. 98:3036-3045.

Jo M, Komar CM, Fortune JE. 2002. Gonadotropin surge induces two separate increases in messenger RNA for progesterone receptor in bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod*. 67: 1981-1988.

Johnson HD, Kibler HH, Ragsdale AC, Berry IL, Shanklin MD. 1961. Role of heat tolerance and production level in response of lactating Holstein to various temperature-humidity conditions. *J Dairy Sci.* 44:1191.

Jones PA. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 13:484-492.

Josso N, Cate RL, Picard JY, Vigier B, di Clemente N, Wilson C, Imbeaud S, Pepinsky RB, Guerrier D, Boussin L. 1993. Anti-müllerian hormone: the Jost factor. *Rec Prog Hormone Res* 48: 1–59

Josso N, di Clemente N, Gouedard L. 2001. Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 179: 25-32.

Josso N, Rey RA, Picard JY. 2013. Anti-müllerian hormone: a valuable addition to the toolbox of the pediatric endocrinologist. *Int J Endocrinol.* 674105.

Jost A. 1947. The age factor in the castration of male rabbit fetuses. *Proceed Soc Exp Biol Med* 66(2): 302-303.

Kaipia A, Hsueh AJ. 1997. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol.* 59: 349-363.

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.

Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. 2006. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol.* 572, 31-44.

Kelley, RL. Meller, VH. Gordadze, PR. Roman, G. Davis, RL. Kuroda, MI. 1999. Epigenetic spreading of the *Drosophila* dosage compensation complex from roX RNA genes into flanking chromatin. *Cell.* 98:513-522.

Kelly TL, Trasler JM. 2004. Reproductive epigenetics. *Clin Genet.* 65:247–260.

Klinge CM. 2000. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids.* 65(5): 227-251.

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

Kotwica J, Rekawiecki R, Duras M. 2004. Stimulatory influence of progesterone on its own synthesis in bovine corpus luteum. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 48 (2):139–45.

Kowalik MK, Slonina D, Rekawiecki R, Kotwica J. 2013. Expression of progesterone receptor membrane component (PGRMC) 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1 (SERBP1), and nuclear progesterone receptor (PGR) in the bovine endometrium during the estrous cycle and the first trimester of pregnancy. *Reprod Biology*. 13: 15-23.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:5925-5930.

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

Kunze S. 2018. Quantitative Region-Specific DNA Methylation Analysis by the EpiTYPER™ Technology. En *DNA Methylation Protocols, Methods in Molecular Biology*. Jörg Tost, pp 515–535. Piscataway, NJ, USA: Gorgias Press.

La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Carducci Artensio A, Stabile G, Volpe A. 2010. Anti-Müllerian Hormone (AMH) as a Predictive Marker in Assisted Reproductive Technology (ART). *Hum Reprod Update* 16: 113-130.

La Marca A, Volpe A. 2006. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool?. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 64:603-610.

Lachize S, Apostolakis EM, van der Laan S, Tijssen AMI, Xu J, de Kloet ER, Meijer OC. 2009. Steroid receptor coactivator-1 is necessary for regulation of corticotropin-releasing hormone by chronic stress and glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 8038–8042

Lahoz B, Alabart JL, Cocero MJ, Monniaux D, Echegoyen E, Sánchez P, Folch J. 2014. Anti-Müllerian Hormone concentration in sheep and its dependence of age and Independence of BMP15 genotype: an endocrine predictor to select the best donors for embryo biotechnologies. *Theriogenology* 81: 347-357

Lasalle JM, Powell WT, Yasui DH. 2013. Epigenetic layers and players underlying neurodevelopment. *Trends Neurosci*. 36: 460–470.

Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzl T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, Del-Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gemsch J, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Glass CK, Rosenfeld MG, Rose DW. 1998. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2920–2925.

Lavon Y, Leitner G, Klipper E, Moallem U, Meidan R, Wolfenson D. 2011. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. *Domest Anim Endocrinol.* 40:98–109.

Lavon Y, Leitner G, Voet H, Wolfenson D. 2010. Naturally occurring mastitis effects on timing of ovulation, steroid and gonadotrophic hormone concentrations, and follicular and luteal growth in cows. *J Dairy Sci.* 93:911–21.

Lazar MA. 2003. Nuclear Receptor Corepressors. *Nuclear Receptor Signaling.* 1(1), nrs. 01001.

Lea RG, Andrade LP, Rae MT, Hannah LT, Kyle CE, Murray JF, y col. 2006. Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary. *Reproduction.* 131:113–24.

Leonardsson G, Jacobs MA, White R, Jeffery R, Poulosom R, Milligan S, Parker M. 2002. Embryo Transfer Experiments and Ovarian Transplantation Identify the Ovary as the Only Site in Which Nuclear Receptor Interacting Protein 1/RIP140 Action Is Crucial for Female Fertility. *Endocrinology.* 143: 700–707

Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. 1992. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell.* 171:865-873.

Leva PE, Garcia MS, Rodriguez RO, Valtorta SE. 2008. Olas de calor y entregas diarias de leche en tambos de la cuenca lechera central argentina. *Revista FAVE, Ciencias Agrarias* 7 (1-2).

Lin PC, Bhatnagar KP, Nettleton GS, Nakajima ST. 2002. Female genital anomalies affecting reproduction. *Fertil Steril.* 78: 899-915.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25: 402–408.

Loh JS, Maheshwari A. 2011. Anti-Müllerian Hormone – Is it a cristal ball for predicting ovarian ageing? *Human reproduction* 26: 2925-2932.

Lonard DM, O'Malley BW. 2012. Nuclear Receptor Coregulators: Modulators of Pathology and Therapeutic Targets. *Nat Rev Endocrinol.* 8: 598-604

Lösel R, Wehling M. 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology,* 4: 46-56.

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

Lydon JP, Demayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery Jr. CA, Shyamala G, Conneely OM, O'malley BW. 1995. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9:2266-2278.

Mackey DR, Wylie AR, Sreenan JM, Roche JF, Diskin MG. 2000. The effect of acute nutritional change on follicle wave turnover, gonadotropin, and steroid concentration in beef heifers. *J Anim Sci* 78: 429–442.

Madak-Erdogan Z, Charn TH, Jiang Y, Liu ET, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. 2013. Integrative genomics of gene and metabolic regulation by estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and their coregulators. *Molecular System Biology*, 9: 676.

Mal R, Magner A, David J, Datta J, Vallabhaneni M, Kassem M, Manouchehri J, Willingham N, Stover D, Vandeusen J, Sardesai S, Williams N, Wesolowski R, Lustberg M, Ganju RK, Ramaswamy B, Cherian MA. 2020. Estrogen Receptor Beta (ER $\beta$ ): A Ligand Activated Tumor Suppressor. *Front Oncol.* 10:587386.

Maneix L, Antonson P, Humire P, Rochel-Maia S, Castañeda J, Omoto Y, Kim HJ, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta exon 3-deleted mouse: the importance of non-ERE pathways in ERbeta signaling. *Proc Natl Acad Sci Unit States Am.* 112:5135-5140.

Margueron R, Reinberg D. 2010. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet.* 11:285-296.

Matsuyama S, Kubo K, Ohashi F, Takamori Y. 1997. Partial cloning of prohibitin cDNA from canine, feline, bovine, equine, and rabbit liver mRNA by RT-PCR. *J Vet Med Sci.* 59:201–203.

McDowell, RE. 1972 *Improvement of livestock production in warm climates.* Freeman, San Francisco, pp 410–449.

McIlveen M, Skull JD, Ledger WL. 2007. Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a highrisk IVF population. *Hum Reprod.* 22: 778-785.

McInerney EM, Weis KE, Sun J, Mosselman S, Katzenellenbogen BS. 1998. Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. *Endocrinology.* 139: 4513-4522.

McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. 1999. Nuclear receptors: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 20:321–344.

McKenna NJ, O'Malley. 2002. Minireview: Nuclear Receptor Coactivators – An update. *Endocrinology*, 143: 2461-2465.

Meyer KD, Zhang H, Zhang L. 2009. Prenatal cocaine exposure abolished ischemic preconditioning-induced protection in adult male rat hearts: role of PKCepsilon. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 296:H1566–H1576

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.

Moenter SM, Brand RC, Karsch FJ. 1992. Dynamics of gonadotropinreleasing 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.

Monniaux D, Baril G, Laine AL, Jarrier P, Poulin N, Cognié J, Fabre S. 2011. Anti-Müllerian Hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. *Reproduction* 142: 845-854.

Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, Monget P. 2014. The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles: What Is the Link? *Biol Reprod*. 90(4):85

Monniaux D, di Clemente N, Touze' JL, Belville C, Rico C, Bontoux M, Picard JY, Fabre S. 2008. Intrafollicular steroids and anti-Mullerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol Reprod*. 79: 387-396.

Mossa F, Carter F, Walsh SW, Kenny DA, Smith GW, Ireland JL, Hildebrandt TB, Lonergan P, Ireland JJ, Evans AC. 2013. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biol Reprod*. 88: 92.

Mossa F, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Smith G, Lonergan P, Evans ACO, Ireland JJ. 2010. Evidence that high variation in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in cattle. *Reproduction* 140:713-720.

Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ, Evans AC. 2012. Low numbers of ovarian follicles  $\geq 3$  mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*. 95: 2355-2361.

- Möstl E, Palme R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol.* 23: 67-74.
- Mukherjee A, Amato P, Allred DC, DeMayo FJ, Lydon JP. 2007. Steroid receptor coactivator 2 is required for female fertility and mammary morphogenesis: insights from the mouse, relevance to the human. *Nucl Recep Signal.* 5:e011.
- Mulac-Jericevic B, Conneely OM. 2004. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction.* 128(2):139–46.
- Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. 2005. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG.* 112: 1384-1390.
- Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M. 2004. Inhibin B and anti-Müllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients?. *BJOG.* 111: 1248-1253.
- Natraj V, Richards JS. 1993. Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *Endocrinology.* 133: 761-769.
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 81:1535–1565.
- Niswender GD. 1981. Mechanisms controlling luteolysis. En: Schwartz NB, Hunzicker-Dunn M, Dynamics of ovarian function. p 153. Ed. Raven Press, New York.
- Noden DM, de Lahunta A. 1985. Derivates of the intermédiaire mesoderm: reproductive organs. En: Noden D, de Lahunta A, Embryology of Domestic Animals. p 322-327. Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, London.
- Nolte-’t Hoen EN, Van Rooij E, Bushell M, Zhang CY, Dashwood RH, James WP, Harris C and Baltimore D. 2015. The role of microRNA in nutritional control. *J Internal Med.* 278:99–109.
- Noriega-Reyes MY, Langley McCarron E. 2008. Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. *Cancerología* 3: 29-40
- Notaro US, Huber E, Salvetti NR, Ortega HH, Rey F, Rodríguez FM, Recce S, Barberis F. 2016. Altered expression of steroid hormones receptors coregulators during bovine cystic ovarian disease development. *Revista Medicina (B Aires).* ISSN: 0025-7680. 76 Supl I.

Notaro US, Huber E, Recce S, Stassi AF, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH, Rodríguez FM. 2017. Altered expression of estrogen receptors A and  $\beta$  in bovine ovarian follicular persistence. *Revista Medicina (B Aires)*. 77 Supl I.

Ogle TF, Dai D, George P, Mahesh VB. 1998. Regulation of the progesterone receptor and estrogen receptor in decidua basalis by progesterone and estradiol during pregnancy. *Biol Reprod*. 58:1188-1198.

Oktem O, Oktay K. 2008. Stem cells: a perspective on oocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 1127: 20-26.

Ooi SK, O'Donnell AH, Bestor TH. 2009. Mammalian cytosine methylation at a glance. *J. Cell Sci*. 122:2787-2791.

Orihuela A. 2000. Some factors affecting the behavioral manifestation of oestrus in cattle: A review. *Appl Anim Behav Sci*. 70:1-16.

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.

Ortega HH, Salvetti NR, Padmanabhan V. 2009. Developmental programming: prenatal androgen excess disrupts ovarian steroid receptor balance. *Reproduction* 137: 865-877.

Özdemir S, Çomaklı S. 2018. Investigation of the interaction between bta-miR-222 and the estrogen receptor alpha gene in the bovine ovarium. *Reproductive Biology*. 18(3):259-266.

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. 1997. Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. *Science*. 277:1508-1510.

Panin M, Corain L, Montelli S, Cozzi B, Peruffo A. 2014. Gene expression profiles of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the fetal bovine hypothalamus and immunohistochemical characterization during development. *Cell Tissue Res*. 359(2): 619-626.

Park S, Yoon S, Zhao Y, Park SE, Liao L, Xu J, Lydon JP, DeMayo FJ, O'Malley BW, Bagchi MK, Katzenellenbogen BS. 2012. Uterine Development and Fertility Are Dependent on Gene Dosage of the Nuclear Receptor Coregulator REA. *Endocrinology*. 153(8): 3982-3994.

Park S, Zhao Y, Yoon S, Xu J, Liao L, Lydon J, DeMayo F, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. 2011. Repressor of Estrogen Receptor Activity (REA) Is Essential for Mammary Gland Morphogenesis and Functional Activities: Studies in Conditional Knockout Mice. *Endocrinology*. 152(11): 4336-4349.

Park S, Xu J, Frolova A, Liao L, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. 2005. Genetic Deletion of the Repressor of Estrogen Receptor Activity (REA) Enhances the Response to Estrogen in Target Tissues In Vivo. *Mol Cell Biol*. 25(5): 1989-1999.

Pastor WA, Aravind L, Rao A. 2013. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14: 341–356.

Penarrubia J, Fabregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R, Carmona F, Vanrell JA, Balasch J. 2005. Basal and stimulation day 5 anti-Müllerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist: gonadotropin treatment. *Hum Reprod*. 20: 915-922.

Perissi V, Rosenfeld MG. 2005. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nature Rev*. 6: 542-554.

Peruffo A, Cozzi B, Ballarin C. 2008b. Ontogenesis of brain aromatase P450 expression in the bovine hypothalamus. *Brain Res Bull*. 75:60–65

Peruffo A, Giacomello M, Montelli S, Corain L, Cozzi B. 2011. Expression and localization of aromatase P450AROM, estrogen receptor- $\alpha$ , and estrogen receptor- $\beta$  in the developing fetal bovine frontal cortex. *Gen Comp Endocrinol*. 172:211–217

Peter AT, Levine H, Drost M, Bergfelt DR. 2009. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology*. 71:1343–1357.

Peterson TJ, Karmakar S, Pace MC, Gao T, Smith CL. 2007. The Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor (SMRT) Corepressor Is Required for Full Estrogen Receptor  $\alpha$  Transcriptional Activity. *Mol Cell Biol*. 27(17): 5933-5948.

Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA. 2000. Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene*. 19: 4970-4978.

Pfaff DW, Vasudevan N, Kia HK, Zhu YS, Chan J, Garey J, Morgan M, Ogawa S. 2000. Estrogens, brain and behavior: studies in fundamental neurobiology and observations related to women's health. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 74:365–373

- Phillips DJ, de Kretser DM. 1998. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol.* 19: 287:322.
- Pieber D, Allport VC, Bennett PR. 2001. Progesterone receptor isoform A inhibits isoform B-mediated transactivation in human amnion. *Eur J Pharmacol.* 427(1):7–11.
- Polsky L, von Keyserlingk M. 2017. Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of Dairy Science* 100 8645–8657.
- Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G. 2009. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10: 192–206.
- Prossnitz ER, Barton M. 2011. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 715–726.
- Quirk SM, Cowan RG, Harman RM. 2006. The susceptibility of granulosa cells to apoptosis is influenced by oestradiol and the cell cycle. *J Endocrinol.* 189:441–453
- Rae MT, Palassio S, Kyle CE, Brooks AN, Lea RG, Miller DW. 2001. Effect of maternal undernutrition during pregnancy on early ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. *Reproduction.* 122:915–22.
- 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.
- Rekawiecki R, Kisieleska K, Kowalik MK, Kotwica J. 2018. Methylation of progesterone receptor isoform A and B promoters in the reproductive system of cows. *Reprod Fertil Dev.* 30(12):1634-1642.
- Rhind SM, Rae MT, Brooks AN. 2001. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction.* 122:205–14.
- Rhoads ML, Rhoads RP, VanBaale MJ, Collier RJ, Sanders SR, Weber WJ, Crooker BA, Baumgard LH. 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J Dairy Sci.* 92:1986–1997
- Ribeiro ES, Bisinotto RS, Lima FS, Greco LF, Morrison A, Kumar A, Thatcher WW, Santos JEP. 2014. Plasma Anti-Müllerian Hormone in adult dairy cows and association with fertility. *J Dairy Sci.* 97:6888-6900.

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.

Rico C, Fabre S, Médigue C, di Clemente N, Clément F, Bontoux M, Touze' JL, Dupont M, Briant E, Rémy B, Beckers JF, Monniaux D. 2009. Antimüllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropinresponsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol Reprod.* 80: 50-59.

Rico C, Médigue C, Fabre S, Jarrier P, Bontoux M, Clément F, Monniaux D. 2011. Regulation of anti-Müllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Biol Reprod.* 84: 560-571.

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.

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

Rodriguez KF, Couse JF, Jayes FL, Hamilton KJ, Burns KA, Taniguchi F, Korach KS. 2010. Insufficient luteinizing hormone-induced intracellular signaling disrupts ovulation in preovulatory follicles lacking estrogen receptor-beta. *Endocrinology.* 151: 2826-2834.

Rome S. 2015. Use of miRNAs in biofluids as biomarkers in dietary and lifestyle intervention studies. *Genes & Nutrition* 10: 483.

Roseboom TJ, Painter RC, van Abeelen AF, Veenendaal MV, de Rooij SR. 2011. Hungry in the womb: what are the consequences? Lessons from the Dutch famine. *Maturitas* 70(2): 141-145.

Roseboom TJ, van Der Meulen JH, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, Blecker OP. 2001. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cel Endocrinol.* 185:93-98

Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. 2001. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction* 122:215-226.

Rosenfeld MG, Glass CK. 2001. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem.* 276(40): 36865-36868.

Roth Z, Arav A, Bor A, Zeron Y, Braw-Tal R, Wolfenson D. 2001. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* 122:737–744.

Roth Z, Wolfenson D. 2016. Comparing the effects of heat stress and mastitis on ovarian function in lactating cows: basic and applied aspects. *Dom Anim Endocrinol*. 56: S218-S227.

Rovani MT, Gasperin BG, Ilha GF, Ferreira R, Bohrer RC, Duggavathi R, Bordignon V, Gonçalves PBD. 2014. Expression and molecular consequences of inhibition of estrogen receptors in granulosa cells of bovine follicles. *J Ovarian Res*. 7: 96.

Roy SK, Kole AR. 1995. Transforming growth factor- $\beta$  receptor type II expression in the hamster ovary: cellular site(s), biochemical properties, and hormonal regulation. *Endocrinology*. 136: 4610-4620.

Rumi MA, Singh P, Roby KF, Zhao X, Iqbal K, Ratri A, Lei T, Cui W, Borosha S, Dhakal P, Kubota K, Chakraborty D, Vivian JL, Wolfe MW, Soares MJ. 2017. Defining the role of estrogen receptor  $\beta$  in the regulation of female fertility. *Endocrinology*. 158: 2330-2343.

Rüsse I, Sinowatz F. 1991. Gametogenese & harn- und geschlechtsorgane. En. Rüsse I, Sinowatz F, *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. p 51, 70 y 314. Ed. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.

Sabin LR, Delas MJ, Hannon GJ. 2013. Dogma derailed: the many influences of RNA on the genome. *Mol Cell*. 49: 783–794.

Salveti NR, Acosta JC, Gimeno EJ, Muller LA, Mazzini RA, Taboada AF, Ortega HH. 2007. Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and Progesterone Receptors in Ovarian Follicles of Cows with Cystic Ovarian Disease. *Vet Pathol*. 44: 373-378.

Salveti NR, Alfaro NS, Velázquez MML, Amweg AN, 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.

Salveti NR, Baravalle C, Mira GA, Gimeno EJ, Dallard BE, Rey F, Ortega HH. 2009. Heat shock protein 70 and sex steroid receptors in the follicular structures of induced ovarian cysts. *Reprod Domest Anim*. 44: 805-814.

Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M. 2008. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension and insuline resistance: a novel murine model of development programming. *Hypertension* 51:383-392.

Santos-Rosa H, Caldas C. 2005. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* 41:2381-2402.

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.

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. *Domestic Animal Endocrinology.* 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. *Journal of Endocrinology.* 177(2):305–17

Schuler G, Wirth C, Klisch K, Pfarrer C, Leiser R, Hoffmann B. 1999. Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biol Reprod.* 61(3): 797-801.

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

Sheetz D, Folger JK, Smith GW, Ireland JJ. 2012. Granulosa cells are refractory to FSH action in individuals with a low antral follicle count. *Reprod Fertil Dev.* 24:327-336.

Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yano T, Nishii O, Taketani Y. 2009. Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin beta subunits, and anti-Mullerian hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 92: 1794-1798.

Silanikove N. 2000. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 67:1–18.

Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW. 1997. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.* 11:657–666.

Smith CL, O'Malley BW. 2004. Coregulator function: A key to understanding tissue specificity of selectivereceptor modulators. *Endocr Rev.* 25: 45–71.

Smith ZD, Meissner A. 2013. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 14:204-220.

Smitz JE, Cortvrindt RG. 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction.* 123: 185-202.

St- Pierre NR, Cobanov B, Schnitkey G. 2003. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *J Dairy Sci.* 86:(E. Suppl.):E52-E77

Stalker AL, Adams DC, Klopfenstein TJ, Feuz DM, Funston RN. 2006. Effects of pre- and postweaning nutrition on reproduction in spring calving cows and calf feedlot performance. *J Anim Sci.* 84:2582-2589.

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 F, Akahira J, Miura I, Suzuki T, Ito K, Hayashi S, Sasano H, Yaegashi N. 2008. Loss of estrogen receptor beta isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Sci.* 99(12):2365-72.

Takahashi M, Hayashi M, Manganaro TF, Donahoe PK. 1986. The ontogeny of Mullerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod.* 35: 447-453.

Takai D, Jones PA. 2002. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:3740–3745.

Tang ZR, Zhang R, Lian ZX, Deng SL, Yu K. 2019. Estrogen receptor expression and function in female reproductive disease. *Cells,* 8(10):1123.

Tao S, Dahl GE, Laporta J, Bernard JK, Orellana Rivas RM, Marins TN. 2019. Physiology Symposium: Effects of heat stress during late gestation on the dam and its calf. *J. Anim. Sci.,* 97(5):2245-2257.

Thom EC. 1959. The discomfort index. *Weatherwise,* v.12, n.2, p.57-61.

Thompson WE, Asselin E, Branch A, Stiles JK, Sutovsky P, Lai L, ImG-S, Prather RS, Isom SC, Rucker EIII, Tsang B. 2004. Regulation of prohibitin expression during follicular development and atresia in the mammalian ovary. *Biol Reprod.* 71:282–290

Trojer, P. Reinberg, D. 2007. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell.* 12:1-13.

Tyler JK, Kadonaga JT. 1999. The “Dark Side” of chromatin remodeling: repressive effects. *Cell*. 99:443-446.

Ulbrich SE, Kettler A, Einspanier R. 2003. Expression and localization of estrogen receptor a, estrogen receptor b and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 84:279–89.

Valtorta SE, Gallardo MR. 1996. El estrés por calor en producción lechera. En: INTA. *Miscelánea* 81:173- 185.

Van Den Broeck W, Coryn M, Simoens P, Lauwers H. 2002a. Cell-specific distribution of oestrogen receptor-alpha in the bovine ovary. *Reprod Domest Anim*. 37: 291-293.

Van Den Broeck W, Coryn M, Simoens P, Lauwers H. 2002b. Cell-specific distribution of oestrogen receptor-alpha in the bovine Ovary. *Reprod Domest Anim*. 37: 291-293.

Van den Broeck W, D'haeseleer M, Coryn M, Simoens P. 2002b. Cell-specific distribution of progesterone receptors in the bovine ovary. *Reprod Domest Anim*. 37:314-320.

Van Den Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63(6):1717-51.

Vanderhyden B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Front Biosci*. 7: d2-006.

Vassilev I, Galupa R, Servant N, Barillot E, Surani A, Chen CJ, Heard E. 2017. Xist-dependent imprinted X inactivation and the early developmental consequences of its failure. *Nature Structural & Molecular Biology*. 24: 226–233.

Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. 1984. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology*. 114: 1315-1320.

Vincentaben Khristi V, Chakravarthi P, Singh P, Ghosh S, Pramanik A, Ratri A, Borosha S, Roby KF, Wolfe MW, Karim Rumi MA. 2018. ESR2 regulates granulosa cell genes essential for follicle maturation and ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 474: 214-226.

Voigt P, Tee WW, Reinberg D. 2013. A double take on bivalent promoters. *Genes Dev*; 27: 1318–1338.

Waddington CH. 1942. The epigenotype. *Int J Epidemiol* 2012; 41: 10–13.

Walsh SW, Mehta JP, McGettigan PA, Browne JA, Forde N, Alibrahim RM, Mulligan FJ, Loftus B, Crowe MA, Matthews D, Diskin M, Mihm M, Evans AC. 2012. Effect of the metabolic environment at key stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis. *Physiol Genomics*. 44: 504–517.

Wang H, Eriksson H, Sahlin L. 2000. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biol Reprod*. 63:1331-1340.

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.

Weinstock M. 2007. Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behavior. *Neurochemical Research*. 32(10): 1730-1740.

Weller M, Fortes MRS, Marcondes MI. 2016. Effect of maternal nutrition and days of gestation on pituitary gland and gonadal gene expression in cattle. *J Dairy Sci*. 99(4):3056–3071.

West JW. 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 86:2131–2144.

White R, Leonardsson G, Rosewell I, Ann JM, Milligan S, Parker M. 2000. The nuclear receptor co-repressor nr1p1 (RIP140) is essential for female fertility, *Nat. Méd.* 6: 1368–1374.

Wiersma F. 1990. THI for dairy cows. Department of Agricultural Engineer. The University of Arizona. Tucson, AZ.

Wilkinson, LS. Davies, W. Isles, AR. 2007. Genomic imprinting effects on brain development and function. *Nat Rev Neurosci*. 8:832-843.

Wiltbank MC, Sartori R, Herlihy MM, Vasconcelos JLM, Nascimento AB, Souza AH, Ayres H, Cunha AP, Keskin A, Guenther JN. 2011. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 76: 1568–1582.

Wolfenson D, Inbar G, Roth Z, Kaim M, Bloch A, Braw-Tal R. 2004. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology* 62: 1042–1055

Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y, Meidan R. 1997. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim Reprod Sci.* 47:9–19.

Wolfenson D, Roth Z, Meidan R. 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61: 535–547.

Wolfenson D, Sonogo H, Bloch A, Shaham-Albalancy A, Kaim M, Folman Y, Meidan R. 2002. Seasonal differences in progesterone production by luteinized bovine thecal and granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol.* 22:81–90.

Woodruff TK, Mayo KE. 2005. To  $\beta$  or not to  $\beta$ : estrogen receptors and ovarian function. *Endocrinology.* 146: 3244-3246.

Xu J, Qiu Y, DeMayo FJ, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 1998. Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science.* 279: 1922-1925

Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. 1999. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Current Opinion in Genetics and Development.* 9:140-147.

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.

Yamasaki Y, Kajimoto Y, Kamada T. 1994. Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J. Biol. Chem.* 269:16433-16442.

Yang MY, Fortune JE. 2008. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol Reprod.* 78: 1153-1161.

Yang P, Kriatchko A, Shyamal R. 2002. Expression of ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  in the Hamster Ovary: Differential Regulation by Gonadotropins and Ovarian Steroid Hormones. *Endocrinology.* 143: 2385-2398.

Yang P, Wang J, Shen Y, Roy SK. 2004. Developmental expression of estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta in the hamster ovary: regulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology;* 145(12):5757-66.

Young JB. 2002. Programming of sympathoadrenal function. *Trends Endocrinol Metab* 13: 381–385.

Zachos NC, Billiar RB, Albrecht ED, Pepe GJ. 2002. Developmental regulation of baboon fetal ovarian maturation by estrogen. *Biol Reprod* 67:1148–1156

Zama AM, Uzumcu M. 2009. Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes. *Endocrinology*; 150(10):4681-91.

Zhang J, Zhang F, Didelot X, Bruce KD, Cagampang FR, Vatish M, Hanson M, Lehnert H, Ceriello A, Byrne CD. 2009. Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring. *BMC Genom* 10: 478.

Zhang X, Jeyakumar M, Petukhov S, Bagchi MK. 1998. A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. *Mol Endocrinol.* 12:513–524.

Zurvarra FM, Salvetti NR, Ian Mason J, Velazquez MML, Alfaro NS, Ortega HH. 2009. Disruption in the Expression and Immunolocalization of Steroid Receptors and Steroidogenic Enzymes in Letrozole-induced Polycystic Ovaries in Rat. *Reproduction, Fertility and Development.* 21: 827-839.