



Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Ciencias Veterinarias

Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL)/Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

“Rol de las citoquinas en la falla en la ovulación relacionada con la patogenia de la enfermedad quística ovárica bovina”

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

Autora: M.V. Antonela Florencia Stassi

Director: Dr. Hugo Héctor Ortega

Codirectora: Dra. Natalia Raquel Salvetti

~2018~

“La alegría de ver y entender es el más perfecto don de la naturaleza”

Albert Einstein

Dedicada...

A mis padres, porque han sido ejemplo de perseverancia incansable...

A mis hermanos, por acompañarme en todo momento...

A Alejandro, por su incondicionalidad, amor y comprensión...

A Catarina, la luz de mi vida...

Agradecimientos...

Al Dr. Hugo Ortega, por confiar en mí, por su predisposición, por el esfuerzo para que todo este grupo de trabajo prospere.

A la Dra. Natalia Salvetti, por ser una guía y consejera constante en el desarrollo de este trabajo. Por su simpleza en la manera de resolver las cosas, por aplacar todas mis dudas e inquietudes y por darme seguridad y confianza, simplemente gracias.

A la Dra. Florencia Rey, por brindarse siempre con predisposición, y por su dedicación y amor a la enseñanza.

A mi amigo Matías Belotti, compañero de camino, por todos los momentos vividos y compartidos.

A Ma. Eugenia Baravalle, por su aporte en esta tesis, pero sobre todo, por enseñarme sin recelos sus conocimientos y la simpleza de la vida.

A Natalia Gareis y Pablo Díaz, que por su amistad y trabajo compartido en estos años, han aportado una parte importante a esta tesis.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio, personas desde sus disciplinas, han dejado su impronta en esta tesis.

A mis amigos de la vida, porque con ustedes terminé de crecer, por tantos momentos lindos compartidos y porque son parte de la persona que soy.

A Fabián Barberis, Ernesto Quercia y José Bertoli que aportaron desinteresadamente recursos humanos y materiales para llevar a cabo partes fundamentales de este trabajo.

A Marcelo Ruiz y Rossana Zimmermann de la cátedra de Análisis Clínicos, por darme el espacio para conocer y enamorarme del laboratorio.

A mi Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, por brindarme el lugar para aprender mi profesión y desarrollar mi vocación por la ciencia.

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

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

Índice general

Abreviaturas utilizadas.....	i
Índice de tablas.....	iii
Índice de figuras.....	iv
Resumen.....	xxii
Abstract.....	xxiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL OVARIO	2
1.2. FISIOLOGÍA DEL CICLO ESTRAL BOVINO	7
1.2.1. Desarrollo folicular: Regulación endocrina.....	8
1.2.2. Factores reguladores autocrinos y paracrinos.....	14
1.2.3. Dinámica folicular: Patrón de ondas.....	17
1.2.4. Maduración, función del cuerpo lúteo y ovulación	21
1.2.5. La ovulación: proceso inflamatorio	23
1.3. CITOQUINAS.....	27
1.3.1. Conceptos generales	27
1.3.2. Ligandos y receptores	29
1.3.2.1. Sistema de IL-1	29
1.3.2.2. IL-4.....	34
1.3.2.3. IL-6.....	35
1.3.2.4. IL-8.....	37
1.3.2.5. TNF- α	39
1.4. ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA	41
1.4.1. Definición, clasificación y epidemiología	41
1.4.2. Etiología, patogenia y factores predisponentes.....	42
1.4.2.1. Disfunción hipotálamo-hipofisaria.....	43
1.4.2.2. Disfunción ovárica/folicular.....	45
1.5. PERSISTENCIA FOLICULAR.....	49
2. OBJETIVOS	53
2.1. HIPÓTESIS GENERAL	54
2.2. OBJETIVO GENERAL	54
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54

3. MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES EFECTUADOS CON ANIMALES.....	56
3.1.1. COD espontánea	56
3.1.1.1. Diagnóstico de COD espontánea	56
3.1.1.2. Obtención de muestras	57
3.1.1.2.1. Aspiración de líquido folicular guiada por ecografía.....	57
3.1.1.2.2. Ovariectomía: Técnica de laparotomía por flanco izquierdo	58
3.1.1.2.3. Toma de muestras de sangre	59
3.1.2. Modelo de persistencia folicular.....	60
3.1.2.1. Animales	60
3.1.2.2. Modelo experimental	60
3.1.2.3. Monitoreo de los cambios ováricos.....	62
3.1.2.4. Obtención de muestras	63
3.1.2.4.1. Aspiración de líquido folicular guiada por ecografía.....	63
3.1.2.4.2. Ovariectomía: Técnica por colpotomía	63
3.1.2.4.3. Toma de muestras de sangre	65
3.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	66
3.2.1. Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas.....	67
3.2.2. Procesamiento de las muestras para western blot.....	67
3.2.3. Procesamiento del líquido folicular	68
3.2.4. Procesamiento de las muestras para RT-PCR.....	68
3.2.4.1. Extracción de ARN total	68
3.2.4.2. Transcripción reversa	69
3.3. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS EN SUERO Y LÍQUIDO FOLICULAR	70
3.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS.....	71
3.4.1. Inmunohistoquímica indirecta	71
3.4.2. Western blot.....	74
3.4.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	77
3.4.4. Análisis digital de imágenes	78
3.4.5. Evaluación semicuantitativa de la expresión génica de IL-1 α , IL-6 y TNF- α	78
3.4.5.1. Cebadores	79
3.4.5.2. Procesamiento de ADN copia (ADNc)	79
3.4.5.3. Análisis de las poblaciones foliculares	79
3.4.5.4. Amplificación mediante PCR en tiempo real.....	80

3.4.5.5. Análisis de la secuencia nucleotídica	82
3.5. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA	83
4. RESULTADOS	84
4.1. RESULTADOS DE PROCEDIMIENTOS EFECTUADOS CON ANIMALES.....	85
4.1.1. Diagnóstico y obtención de muestras provenientes de casos de COD espontánea	85
4.1.2. Inducción de folículos persistentes mediante dispositivos de progesterona.....	86
4.1.2.1. Concentración de hormonas esteroides en suero y líquido folicular en animales con folículos persistentes.....	89
4.2. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE CITOQUINAS EN OVARIOS DE ANIMALES COD ESPONTÁNEA	91
4.2.1. IL-1 α	91
4.2.1.1. Expresión génica	91
4.2.1.2. Expresión proteica y localización	92
4.2.2. IL-1 β	95
4.2.2.1. Expresión proteica y localización	95
4.2.2.2. Concentración de IL-1 β en líquido folicular y suero	97
4.2.3. IL-1RA: Expresión proteica y localización	98
4.2.4. IL-1RI: Expresión proteica y localización.....	101
4.2.5. IL-1RII: Expresión proteica y localización	104
4.2.6. IL-4	107
4.2.6.1. Expresión proteica y localización	107
4.2.6.2. Concentración de IL-4 en líquido folicular y suero	110
4.2.7. IL-6	111
4.2.7.1. Expresión génica	111
4.2.7.2. Expresión proteica y localización	112
4.2.7.3. Concentración de IL-6 en líquido folicular y suero	115
4.2.8. IL-8	115
4.2.8.1. Expresión proteica y localización	115
4.2.8.2. Concentración de IL-8 en líquido folicular y suero	118
4.2.9. TNF- α	119
4.2.9.1. Expresión génica	119
4.2.9.2. Expresión proteica y localización	120
4.3. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE CITOQUINAS EN ANIMALES CON PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA MEDIANTE PROGESTERONA	123
4.3.1. IL-1 α : Expresión proteica y localización.....	123

4.3.2. IL-1 β	127
4.3.2.1. Expresión proteica y localización	127
4.3.2.2. Concentración de IL-1 β en líquido folicular y suero	131
4.3.3. IL-1RA: Expresión proteica y localización	132
4.3.4. IL-1RI: Expresión proteica y localización	136
4.3.5. IL-1RII: Expresión proteica y localización	140
4.3.6. IL-4	144
4.3.6.1. Expresión proteica y localización	144
4.3.6.2. Concentración de IL-4 en líquido folicular y suero	149
4.3.7. IL-6	149
4.3.7.1. Expresión proteica y localización	149
4.3.7.2. Concentración de IL-6 en líquido folicular y suero	153
4.3.8. IL-8	154
4.3.8.1. Expresión proteica y localización	154
4.3.8.2. Concentración de IL-8 en líquido folicular y suero	158
4.3.9. TNF- α : Expresión proteica y localización	159
5. DISCUSIÓN	164
5.1. PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA: UN MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE QUISTES FOLICULARES OVÁRICOS.....	165
5.2. EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN OVARIOS DE ANIMALES NORMALES, CON COD ESPONTÁNEA Y PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA	169
5.2.1. Sistema de la IL-1	170
5.2.2. Expresión de IL-4	177
5.2.3. Expresión de IL-6	179
5.2.4. Expresión de IL-8	182
5.2.5. Expresión de TNF- α	183
6. CONCLUSIONES.....	189
7. BIBLIOGRAFÍA.....	194

Abreviaturas utilizadas

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Control
CG	Células de la granulosa
CL	Cuerpo lúteo
COD	Enfermedad quística ovárica
CSFs	Factor estimulante de colonias
Ct	Ciclo umbral
CYP17A1	Citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa
CYP19A1	Citocromo P450 aromatasa 19A1
DAB	Diaminobencidina
DE	Desvío standard
E2	17 β -estradiol
ECLIA	Electroquimioluminiscencia inmunoensayo
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FSH	Hormona foliculoestimulante
FSHR	Receptor de hormona foliculoestimulante
G	Granulosa
GC	Glucocorticoide
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
IGF	Factor de crecimiento análogo a insulina
IL	Interleuquina
IL-1RA	Antagonista del receptor de la interleuquina-1
IL-1RAcP	Cadena accesoria del receptor de interleuquina-1
IL-1RI	Receptor I de la interleuquina-1
IL-1RII	Receptor II de la interleuquina-1
IL-1RIIs	Receptor II de interleuquina-1 forma soluble
IL-1 α	Interleuquina-1 alfa
IL-1 β	Interleuquina-1 beta
IL-4	Interleuquina-4
IL-6	Interleuquina-6
IL-8	Interleuquina-8
IM	Intramuscular
kDa	Kilo Dalton
KGF	Factor de crecimiento del queratinocitos
KL	Kit ligando
LF	Líquido folicular
LH	Hormona luteinizante
LHR	Receptor de hormona luteinizante
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
MEC	Matríz extracelular
MMLV	Virus de la leucemia murina Moloney

MMPs	Metaloproteinasas de la matriz
NGF	Factores de crecimiento neuronales
NO	Óxido nítrico
Nº	Número
NOS2	Óxido nítrico sintasa 2
NTs	Neutropinas
P0	Día de persistencia 0
P10	Día de persistencia 10
P15	Día de persistencia 15
P5	Día de persistencia 5
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PB	Pares de base
PBS	buffer fosfato salino
PCOS	Síndrome Poliquístico Ovárico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG	Prostaglandina
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PM	Peso molecular
RIA	Radioinmunoensayo
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa
SDS	Sodio Dodecil Sulfato
SNC	Sistema nervioso central
TBS-T	Buffer Tris Salino-Tween
TGF	Factor de crecimiento transformante
TI	Teca interna
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
USA	Estados Unidos de América
VEGF	Factor de crecimiento de endotelios vasculares
WB	Western blot
ZP	Zona pelúcida

Índice de tablas

Tabla 1: Clasificación morfológica de folículos ováricos más empleada para bovinos (Adaptado de Braw-Tal y Yossefi, 1997; Aerts y Bols, 2010).	6
Tabla 2: Anticuerpos primarios, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.	71
Tabla 3: Detalle de los anticuerpos secundarios utilizados y las condiciones de uso en la técnica de inmunohistoquímica.	73
Tabla 4: Detalle de los anticuerpos utilizados en la técnica de western blot.....	76
Tabla 5: Peso molecular (PM) de las citoquinas evaluadas.....	77
Tabla 6: Pares de cebadores (secuencia de cebadores <i>forward/reverse</i> , 5'→3') usados para PCR en tiempo real.....	82

Índice de figuras

- Figura 1:** Anatomía del Ovario. El ovario se compone de dos zonas: región medular (1) que abarca la región central del ovario y se forma de tejido conectivo, vasos y fibras nerviosas, y la región cortical (2) que contiene folículos (3) en diferentes estadios, cuerpos lúteos (4) y el estroma ovario. (Adaptado de Fernández Sánchez, 2008)..... 3
- Figura 2:** Esquema de un corte longitudinal de ovario donde se observan las distintas categorías foliculares en crecimiento, ovulación y formación de cuerpo lúteo. (Adaptado de Enciclopedia Británica, 2007).. 4
- Figura 3:** Principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento. En la parte superior, se esquematizan los folículos indicando sus componentes, en la parte inferior se muestran cortes histológicos de los mismos teñidos con hematoxilina-eosína (Adaptado de Ross y col., 2004).. 5
- Figura 4:** Diagrama del ciclo estral bovino mostrando los niveles hormonales en cada una de las etapas de las fases folicular y luteal (Adaptado de Gasque Gómez, R. (2008) Enciclopedia bovina. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. UNAM). 9
- Figura 5:** Progresión folicular a través de las sucesivas etapas de desarrollo y su respuesta a las gonadotrofinas hipofisarias. (Adaptado de Knight y Glister, 2006). 12
- Figura 6:** Dos gonadotrofinas, dos células, mecanismo de la biosíntesis de estrógenos (Adaptado de Baskind y Balen, 2016)..... 14
- Figura 7:** Esquema de los principales mecanismos de regulación endocrina del eje hipotálamo hipófisis gónadal. GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas. FSH: hormona foliculoestimulante. LH: hormona luteinizante (Adaptado de Baskind y Balen, 2016)..... 16
- Figura 8:** Reclutamiento, selección y dominancia en un patrón de tres ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. P: Folículo primordial, reserva ovárica. R: Reclutamiento. S: Selección. D: Dominancia. A: Apoptosis. Ov: Ovulación. (Adaptado de Aerts y Bols 2010b). 18
- Figura 9:** Esquema de las concentraciones hormonales y la dinámica de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. FSH: hormona foliculoestimulante. LH: hormona luteinizante. PGF₂ α : prostaglandina F₂ α . (Adaptado de Rippe, 2009)..... 21
- Figura 10:** Representación esquemática de las propiedades claves de las citoquinas y sus interacciones. El sinergismo describe la interacción de dos (o más) citoquinas para mediar un efecto común cuya magnitud es mayor que la alcanzada por ambas citoquinas aisladamente. El antagonismo refleja los efectos opuestos de dos citoquinas, donde uno puede potencialmente modular la magnitud de un efecto dado inducido por el otro. La redundancia funcional representa la observación de que muchas citoquinas tienen

funciones análogas (a veces operando a través del mismo sistema receptor) de tal manera que una función fisiológica dada puede ser alcanzada por cualquiera de un conjunto de mediadores. Finalmente, la pleiotropía se refiere a que cualquier citoquina puede tener un número de células diana, tanto cercanas como distantes. (Adaptado de Field y col., 2014)... 29

Figura 11: Representación esquemática de la implicación de citoquinas a lo largo de la foliculogénesis. Interacciones y localizaciones basadas en foliculogénesis humana, con inferencias a partir de modelos animales. Las capas celulares se separan y reducen para mayor claridad. *O*: ovocito; *PG*: células pre-granulosa; *G*: células de la granulosa; *PT*: células pre-teca; *T*: células de la teca. *MEC*: matriz extracelular. Las *flechas negras* indican sitios de producción de citoquinas; Las *flechas rojas* sólidas indican interacciones positivas mientras que las *flechas azules* interacciones negativas. Las *flechas punteadas* indican interacciones presumidas; aquellas alineadas indican sinergismo potencial. Las citoquinas modulan la foliculogénesis en todas las etapas, aumentando el número de citoquinas conocidas hacia la ovulación. Destacadas con *óvalos verdes* las estudiadas en este trabajo (Adaptado de Field y col., 2014)..... 30

Figura 12: Complejos de los receptores de la IL-1. La unión de las citoquinas agonistas IL-1 α e IL-1 β se produce a través del receptor de unión a ligando IL-1RI, que contacta al ligando con dos sitios, y sufre un cambio conformacional que permite reclutar la cadena accesoria IL-1RAcP. La aproximación de los dominios TIR intracelulares de las dos cadenas inicia la señalización. La unión del antagonista IL-1RA a IL-1RI ocurre en un solo sitio y no induce cambios conformacionales ni reclutamiento de IL-1RAcP; por lo tanto, la señalización no se produce. La unión de IL-1 β (y con IL-1 α e IL-1RA de afinidad más baja) a IL-1RII unido a la membrana da como resultado el secuestro de ligandos agonistas y la falta de señalización. La unión de IL-1 β (y con IL-1 α de afinidad más baja) a IL-1RII unida a membrana también induce cambios conformacionales y permite el reclutamiento de IL-1RAcP. Debido a la falta de dominio TIR en IL-1RII, no ocurre la señalización. Las formas solubles de las tres cadenas también están presentes en el espacio extracelular e interactúan con ligandos y entre sí, dando como resultado el secuestro del ligando. La forma soluble de IL-1RI (sIL-1RI) se describió como capaz de unirse a IL-1 α , IL-1 β e IL-1RA. La forma soluble de IL-1RII (sIL-1RII) puede unirse y secuestrar IL-1 β , IL-1 α y proIL-1 β . El complejo entre sIL-1RII y ligandos agonistas (IL-1 α e IL-1 β) también puede reclutar sIL-1RAcP dando como resultado una mayor afinidad de unión. Se ha informado que una forma intracelular de sIL-1RII (ic sIL-1RII) es capaz de unir proIL-1 α y protegerlo de la escisión proteolítica y la generación de la forma madura. (Adaptado de Borashi y Tagliabue, 2013)..... 31

Figura 13: Representación esquemática de la etiopatogenia multifactorial y posibles vías involucradas en la enfermedad quística ovárica bovina. En el esquema se indicaron factores que alteran los mecanismos de respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Estrés, concentraciones subletales de progesterona, modificación en el mecanismo de retroalimentación del estradiol y cambios importantes en el ovario (factores de crecimiento, gonadotrofinas y receptores de esteroides, señalización de la vía de la insulina, proliferación y mecanismo apoptótico) pueden modificar los patrones fisiológicos de liberación de hormonas en el hipotálamo (GnRH) y la hipófisis (FSH y

LH), conduciendo al fallo ovulatorio, persistencia folicular y formación de quistes. Signo más (+): efecto estimulante. Signo menos (-): efecto inhibitorio. Flechas azules hacia arriba: alta concentración. Flechas azules hacia abajo: baja concentración. Flechas rojas hacia abajo: expresión reducida. Flecha discontinuas: modificaciones inducidas. R +: retroalimentación positiva. GC: células de la granulosa. TI: células de la teca interna. TE: células de la teca externa. LF: líquido folicular. IR: receptor de insulina. PI3K: fosfatidilinositol - 3 - quinasa. TGF- β : factor de crecimiento transformante beta. IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina-1. P4: progesterona. E2: estradiol. LH: hormona luteinizante. FSH: hormona folículo estimulante. GnRH: hormona liberadora de gonadotropina. (Adaptado de Ortega y col., 2016). 47

Figura 14: Diagnóstico ecográfico de COD. A: ecógrafo portátil HS101V Honda. B: ovario con un quiste folicular. C: ovario contralateral con escaso desarrollo folicular. En ambos ovarios no se detecta la presencia de CL. 56

Figura 15: Procedimiento para la obtención de LF. Una vez realizado el diagnóstico, se procede a la aspiración folicular guiada por ecografía. 58

Figura 16: Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje por flanco izquierdo. 59

Figura 17: Técnica de extracción de sangre a través de punción de vasos coccígeos. 60

Figura 18: Diseño experimental de los diferentes grupos de estudio. Para inducir persistencia folicular, los ciclos estrales de las vacas fueron sincronizados y luego se aplicó un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona para inducir la persistencia folicular. La dinámica folicular fue monitoreada por ultrasonografía diariamente y los niveles en sangre de hormonas esteroides y gonadotróficas fueron evaluados a los tiempos indicados en los grupos control y tratados. La ovariectomía se realizó en proestro (controles) y después de 0, 5, 10 y 15 días de persistencia folicular. 62

Figura 19: Secuencia de imágenes ecográficas que muestran el seguimiento ultrasonográfico del ovario que desarrolló el folículo persistente de un animal tratado (P15) hasta los 15 días de persistencia. 63

Figura 20: Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje transvaginal (técnica por colpotomía). 65

Figura 21: Técnica de extracción de sangre a través de catéter endovenoso. 65

Figura 22: Esquema de la procedencia y destino de las muestras obtenidas. 66

Figura 23: Marcadores de PM para SDS-PAGE, amplio espectro (Rainbow™, RPN800E, GE Healthcare). 75

Figura 24: (A) Diámetro máximo de los folículos preovulatorios y persistentes en vacas del grupo control (●) y tratado (■) respectivamente. Media \pm EEM del diámetro folicular interno y diferencias con el correspondiente al folículo preovulatorio en el grupo control.

(B). Imágenes ecográficas representativas del folículo preovulatorio y persistentes de 0, 5, 10 y 15 días (Adaptado de Díaz y col., 2015). 87

Figura 25: Imágenes microscópicas representativas (A) y análisis histomorfométrico (B) de la pared folicular de los folículos preovulatorios de las vacas control (n=5) y folículos con 0, 5, 10 y 15 días de persistencia folicular de vacas tratadas (n=5 en cada día). Una disminución en el grosor de las células de la granulosa (G) y de la teca (T) fue observado a los 15 días de persistencia en relación con los folículos preovulatorios ($p < 0,05$). Los valores representan la media \pm EEM. Barras=50 μ m (Adaptado de Díaz y col., 2015). 88

Figura 26: Concentración de hormonas esteroides en suero y LF en animales con folículos persistentes. Las barras representan las medias \pm EEM para cada hormona en suero o LF. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 90

Figura 27: Expresión de ARNm de *IL-1 α* determinado por PCR en tiempo real en células foliculares de casos de COD espontánea en relación a ovarios controles. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 91

Figura 28: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de *IL-1 α* en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 92

Figura 29: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de *IL-1 α* en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 93

Figura 30: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de *IL-1 α* en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 93

Figura 31: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de *IL-1 α* en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 94

Figura 32: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para *IL-1 α* en animales de los grupos control y COD espontánea. Se muestra además un control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T:

teca interna. B. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-1 α (17 kDa). 94

Figura 33: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 β en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 95

Figura 34: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 β en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 95

Figura 35: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 β en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 96

Figura 36: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 β en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 96

Figura 37: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-1 β en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. B. En el inmunoblot se observan dos bandas, una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-1 β forma madura (17 kDa) y otra banda en la zona correspondiente al peso molecular de la pro-IL-1 β (35 kDa). 97

Figura 38: Concentración de IL-1 β en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro) y con COD espontánea. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 98

Figura 39: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RA en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 98

Figura 40: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RA en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 99

Figura 41: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RA en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 100

Figura 42: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RA en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 100

Figura 43: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-1RA en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. B. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-1RA (22 kDa)..... 101

Figura 44: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RI en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 102

Figura 45: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RI en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 102

Figura 46: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RI en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 103

Figura 47: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RI en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 103

Figura 48: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-1RI en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. B. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-1RI (66 kDa)..... 104

Figura 49: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RII en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la

teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 105

Figura 50: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RII en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 105

Figura 51: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RII en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 106

Figura 52: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RII en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 106

Figura 53: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-1RII en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. B. En el inmunoblot se observan dos bandas, una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-1RII forma soluble (45 kDa) y otra banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL1RII de membrana (68 kDa). 107

Figura 54: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-4 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 108

Figura 55: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-4 en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 108

Figura 56: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-4 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 109

Figura 57: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-4 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro).

Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 109

Figura 58: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-4 en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. B. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-4 (15 kDa)..... 110

Figura 59: Concentración de IL-4 en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro) y con COD espontánea. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias entre LF y suero dentro de un mismo grupo (indicadas por corchetes) ($p < 0,05$). 111

Figura 60: Expresión de ARNm de *IL-6* determinado por PCR en tiempo real en células foliculares de casos de COD espontánea en relación a ovarios controles. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 111

Figura 61: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 112

Figura 62: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 113

Figura 63: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 113

Figura 64: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 114

Figura 65: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-6 en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. B. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-6 (26 kDa)..... 114

- Figura 66:** Concentración de IL-6 en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro) y con COD espontánea. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p>0,05$). 115
- Figura 67:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-8 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p>0,05$). 116
- Figura 68:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-8 en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p<0,05$). 116
- Figura 69:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-8 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p>0,05$). 117
- Figura 70:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-8 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p<0,05$). 117
- Figura 71:** A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-8 en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. B. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-8 (11 kDa). La banda inmunorreactiva más pequeña representa fragmentos de escisión de la proteína IL-8 madura. 118
- Figura 72:** Concentración de IL-8 en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro) y con COD espontánea. Los valores representan la media \pm DE. # IL-8 en LF de animales controles ($<$ a 7,8 pg/ml). No se evidenciaron diferencias significativas ($p>0,05$). 119
- Figura 73:** Expresión de ARNm de *TNF- α* determinado por PCR en tiempo real en células foliculares de casos de COD espontánea en relación a ovarios controles. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p>0,05$). 119
- Figura 74:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de *TNF- α* en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p<0,05$). 120

Figura 75: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TNF- α en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 121

Figura 76: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TNF- α en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 121

Figura 77: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TNF- α en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 122

Figura 78: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para TNF- α en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. B. En el inmunoblot se observan dos bandas, una banda en la zona correspondiente al peso molecular de TNF- α forma madura (17 kDa) y otra banda en la zona correspondiente al peso molecular de TNF- α pro-proteína (26 kDa). 122

Figura 79: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 α en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 123

Figura 80: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 α en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 124

Figura 81: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 α en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 124

Figura 82: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 α en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 125

- Figura 83:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 α en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$)..... 126
- Figura 84:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 α en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$)..... 126
- Figura 85:** Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-1 α en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. 127
- Figura 86:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 β en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 128
- Figura 87:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 β en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$)..... 128
- Figura 88:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 β en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$)..... 129
- Figura 89:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 β en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$)..... 129
- Figura 90:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 β en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$)..... 130
- Figura 91:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 β en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$)..... 130

- Figura 92:** Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-1 β en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. 131
- Figura 93:** Concentración de IL-1 β en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro), P0, P5, P10 y P15. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias entre LF y suero dentro de un mismo grupo (indicadas por corchetes) ($p < 0,05$). 132
- Figura 94:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RA en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 133
- Figura 95:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RA en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 133
- Figura 96:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RA en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 134
- Figura 97:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RA en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 134
- Figura 98:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RA en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 135
- Figura 99:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RA en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 135
- Figura 100:** Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-1RA en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. 136

- Figura 101:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RI en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p>0,05$). 137
- Figura 102:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RI en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p>0,05$). 137
- Figura 103:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RI en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p>0,05$). 138
- Figura 104:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RI en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p>0,05$). 138
- Figura 105:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RI en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p<0,05$). 139
- Figura 106:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RI en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p>0,05$). 139
- Figura 107:** Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-1RI en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. 140
- Figura 108:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RII en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p<0,05$). 141
- Figura 109:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RII en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p<0,05$). 141

- Figura 110:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RII en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$)..... 142
- Figura 111:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RII en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 143
- Figura 112:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RII en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 143
- Figura 113:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RII en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 143
- Figura 114:** Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-1RII en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. 144
- Figura 115:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-4 en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$)..... 145
- Figura 116:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-4 en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 145
- Figura 117:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-4 en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 146

- Figura 118:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-4 en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 147
- Figura 119:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-4 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 147
- Figura 120:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-4 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 148
- Figura 121:** Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-4 en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. 148
- Figura 122:** Concentración de IL-4 en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro), P0, P5, P10 y P15. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias entre LF y suero dentro de un mismo grupo (indicadas por corchetes) ($p < 0,05$). 149
- Figura 123:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 150
- Figura 124:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 150
- Figura 125:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 151

Figura 126: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....	151
Figura 127: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).....	152
Figura 128: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).	152
Figura 129: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-6 en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna.	153
Figura 130: Concentración de IL-6 en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro), P0, P5, P10 y P15. Los valores representan la media \pm DE. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los distintos grupos. * indica diferencias entre LF y suero dentro de un mismo grupo (indicadas por corchetes) ($p < 0,05$).	154
Figura 131: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-8 en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....	155
Figura 132: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-8 en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	155
Figura 133: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-8 en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	156

- Figura 134:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-8 en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 156
- Figura 135:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-8 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 157
- Figura 136:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-8 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 157
- Figura 137:** Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para IL-8 en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. 158
- Figura 138:** Concentración de IL-8 en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro), P0, P5, P10 y P15. Los valores representan la media \pm DE. # IL-8 en LF de animales controles, P0, P5 y P10 ($< 7,8$ pg/ml). No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$). 159
- Figura 139:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TNF- α en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 160
- Figura 140:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TNF- α en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 160
- Figura 141:** Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TNF- α en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 161

Figura 142: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TNF- α en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 161

Figura 143: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TNF- α en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 162

Figura 144: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TNF- α en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$). 162

Figura 145: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para TNF- α en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. 163

RESUMEN

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

ABSTRACT

The production of oocytes and the hormonal secretion in the ovaries, determine the reproductive and consequently, productive efficiency in dairy and beef cattle. Progression through follicular development requires a communication between the oocyte, the granulosa and the theca cells, in the exchange of information between these cells are involved cytokines. The present study was designed to determine the specific cellular localization and expression of the major cytokines and receptors who could participate in ovarian cystic disease in cattle and in the follicular persistence associated. The development of the experimental models was appropriate for the study of the early stages of the disease and the development of persistence found some differences between model and spontaneous cases, which could be explained mainly by the persistence time. We showed that there is a possible effect of cytokines on the pathogenesis of the disease, balance proliferation/apoptosis and cell differentiation previously described in cystic ovaries. Knowing the strong economic justification for developing preventive measures and treatments for follicular disorders, the results obtained in this thesis increase the knowledge of the pathogenesis of cystic ovarian disease and the mechanisms involved in the follicular persistence providing an invaluable tool for additional studies and for the evaluation of preventive and therapeutic actions.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL OVARIO

Los ovarios son los órganos esenciales para la reproducción en la hembra, del mismo modo que los testículos lo son en el macho. Son de naturaleza doble: endocrina y citógena (productora de células) pues a la vez que elaboran hormonas que van a la circulación, producen los óvulos posteriormente expulsados por la glándula. Los ovarios de la vaca son pequeños, miden normalmente de 3,5 a 4 cm de longitud, 2,5 cm de ancho y son aproximadamente de 1,5 cm de espesor en su porción mayor; el peso es de 15 a 20 g (Sisson y Grossman, 1982). La mayor parte de la superficie de la glándula está cubierta por un epitelio germinal, si bien el epitelio peritoneal está limitado a una zona estrecha a lo largo del borde de inserción. A menudo se pueden ver varios folículos de distinto tamaño, que se proyectan desde la superficie, así como cuerpos lúteos. Un cuerpo lúteo (CL) de una vaca preñada tiene color amarillo intenso y puede alcanzar un diámetro de 1 a 1,5 cm. El tamaño del ovario se modifica por el CL (Sisson y Grossman, 1982). Después de la ovulación, la pared de la cavidad folicular se pliega debido a la caída de la presión a causa de la expulsión del líquido folicular (LF). La actividad de los vasos sanguíneos que generan los procesos ulteriores de reconstrucción y proliferación lleva a la formación del cuerpo amarillo o CL. En el cuerpo amarillo se distinguen un estadio temprano y un estadio tardío (estadio de proliferación y estadio de vascularización), un estadio de desarrollo y un estadio de involución. El cuerpo amarillo que pasa por estos estadios durante un ciclo sexual, se denomina CL cíclico. Si se produce la fecundación, el cuerpo amarillo permanece activo durante largo tiempo y entonces se habla de un CL de la gravidez. Al final del proceso de involución del cuerpo amarillo queda una cicatriz, el cuerpo blanco o *corpus albicans* (König y Liebich, 2002).

La porción medular o central (zona vascular) del ovario es la más vascularizada, en contraste con la corteza (zona parenquimatosa), donde abunda el tejido conectivo denso e irregular y donde se encuentran células epiteliales emigradas desde la superficie. La capa más externa de la corteza es una capa de tejido conectivo, que toma el nombre de túnica albugínea (figura 1). En el feto, la superficie externa consta de una simple capa de epitelio germinativo. Las células sexuales primordiales se originan en el saco vitelino y emigran a los rebordes germinativos. Unos cordones de células epiteliales germinativas invaden el estroma del ovario y al final forman islotes conocidos como folículos primordiales.

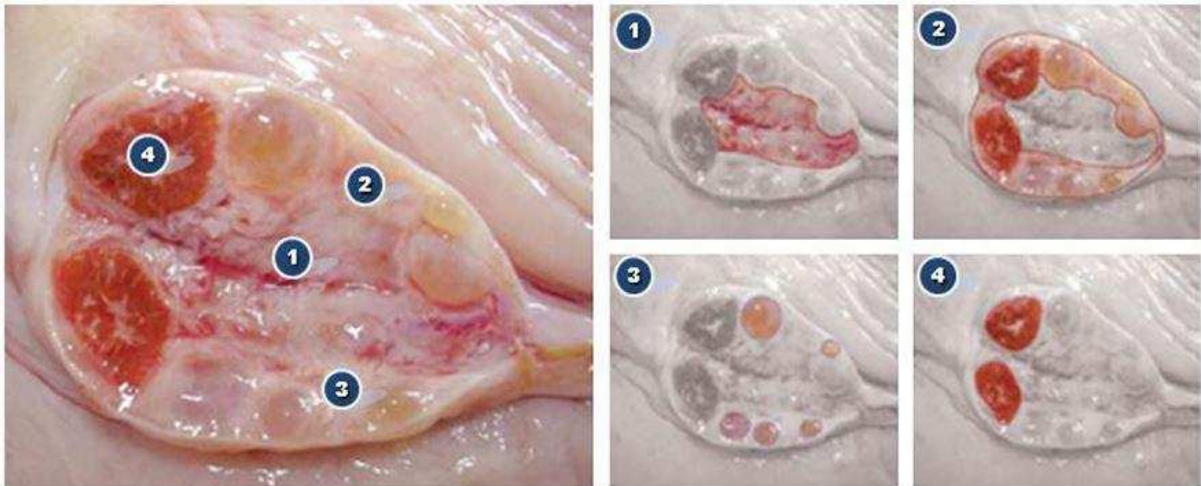


Figura 1: Anatomía del Ovario. El ovario se compone de dos zonas: región medular (1) que abarca la región central del ovario y se forma de tejido conectivo, vasos y fibras nerviosas, y la región cortical (2) que contiene folículos (3) en diferentes estadios, cuerpos lúteos (4) y el estroma ovario. (Adaptado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

Mientras que en la gónada, la mayoría de las células germinales primordiales continúan proliferando, antes del nacimiento el número de ovocitos disminuye drásticamente como resultado de la apoptosis. En la vaca, el número máximo de células germinales primordiales se estima en 2.100.000, que se reduce a un promedio de 130.000 en el nacimiento (Erickson, 1966a,b). En la vaca, los folículos primordiales están presentes alrededor del día 90 de la gestación (Yang y Fortune, 2008). La reserva folicular es dinámica, ya que su población de folículos primordiales sufre un agotamiento no sólo en la vida fetal, sino también a través de la vida reproductiva de un individuo mamífero. Dos procesos complementarios son responsables por la pérdida de folículos primordiales. El primero de estos, es la continua degeneración apoptótica de los ovocitos, seguido por la muerte de las células de la granulosa que los recubren. La disminución post-natal más pronunciada ocurre durante los periodos pre-pubertad y post-pubertad temprana (Bristol-Gould y col., 2006; Murphy, 2011). La segunda fuente de reducción en la reserva folicular es la activación del folículo primordial, un proceso que les provoca la entrada irreversible dentro del *pool* de crecimiento de folículos en el ovario. La activación folicular ocurre continuamente, y no está relacionada con el patrón cíclico de liberación de gonadotrofinas (Webb y Campbell, 2007), sino que la hipótesis actual más verídica, es que la activación es inhibida por factores paracrinos y autocrinos del ovario (Murphy, 2011). Dentro de cada folículo se encuentra una gran célula que es el óvulo u ovocito rodeada de una simple capa de células foliculares. Esos óvulos de los folículos primordiales aumentan de tamaño al mismo tiempo que el resto de las

células foliculares se multiplican y disponen en varias capas, para formar los folículos en maduración (figura 2).

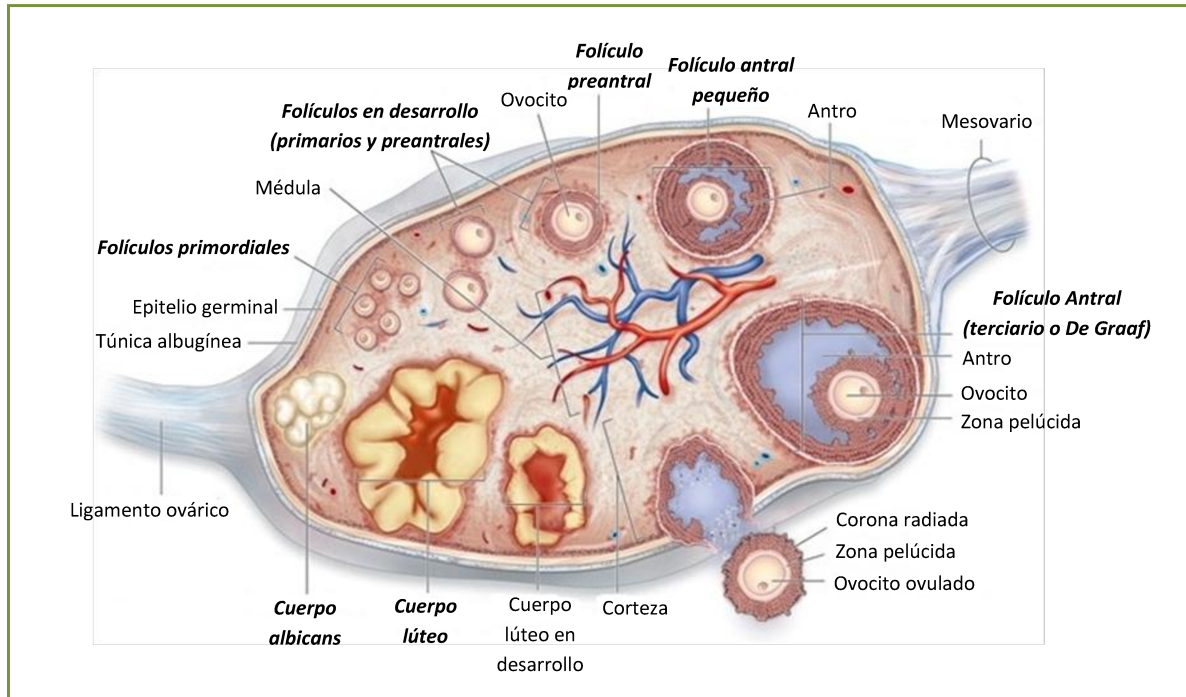


Figura 2: Esquema de un corte longitudinal de ovario donde se observan las distintas categorías foliculares en crecimiento, ovulación y formación de cuerpo lúteo. (Adaptado de Enciclopedia Británica, 2007).

Clasificación Folicular

Con el fin de estudiar las poblaciones de folículos se utiliza la clasificación histológica de los folículos bovinos realizada por Braw-Tal y Yossefi (1997) (tabla 1). En esta clasificación, los folículos primordiales (tipo I) se caracterizan por un ovocito en reposo, detenidos en la profase I de la meiosis, y rodeados por un número limitado (<10) de células de la granulosa aplanadas. Estos folículos primordiales constituyen la reserva ovárica, de la que son reclutados para el desarrollo folicular. Después de la iniciación del crecimiento, en una primera fase de crecimiento de células de la granulosa se someten a una transformación de aplanadas a cúbicas y su número aumenta. Un folículo primario (tipo II) se caracteriza por una capa completa de células de la granulosa cúbicas, y está rodeado por una lámina basal. En una segunda fase de crecimiento el número de células de la granulosa aumenta aún más. Cuando los folículos contienen al menos 40 células de la granulosa, el ovocito inicia el crecimiento, evidenciado por un aumento rápido de su diámetro. El crecimiento de los ovocitos también induce la formación de una zona pelúcida. El material de la zona pelúcida se

deposita primero en folículos preantrales pequeños (tipo III), y el recinto completo del ovocito se alcanza en la etapa de preantral grande (tipo IV) (Braw-Tal y Yossefi, 1997). Las células de la teca se derivan del estroma intersticial, y están presentes como células individuales en la lámina basal de los folículos primarios (Hirshfield, 1991). Las primeras células de la teca interna se pueden identificar en folículos preantrales pequeños (tipo III), pero no se distingue claramente la teca interna hasta que no se desarrolla el estado de preantral grande (tipo IV). La capa externa de la teca está densamente vascularizada, y por lo tanto, es capaz de proporcionar al folículo su oferta de factores endocrinos. La formación del antro empieza cuando los folículos alcanzan más de 250 células de la granulosa. Inicialmente, varios parches llenos de líquido aparecen en las células de la granulosa, cuando estos se unen en una sola cavidad del folículo se denomina antral (tipo V) (Smitz y Cortvrindt, 2002) o también llamados folículos de De Graaf. En estos folículos, el ovocito ocupa una posición excéntrica rodeado de dos o tres capas de células granulosas, que componen el denominado cúmulo ovígero (Dellmann y Eurell, 1998).

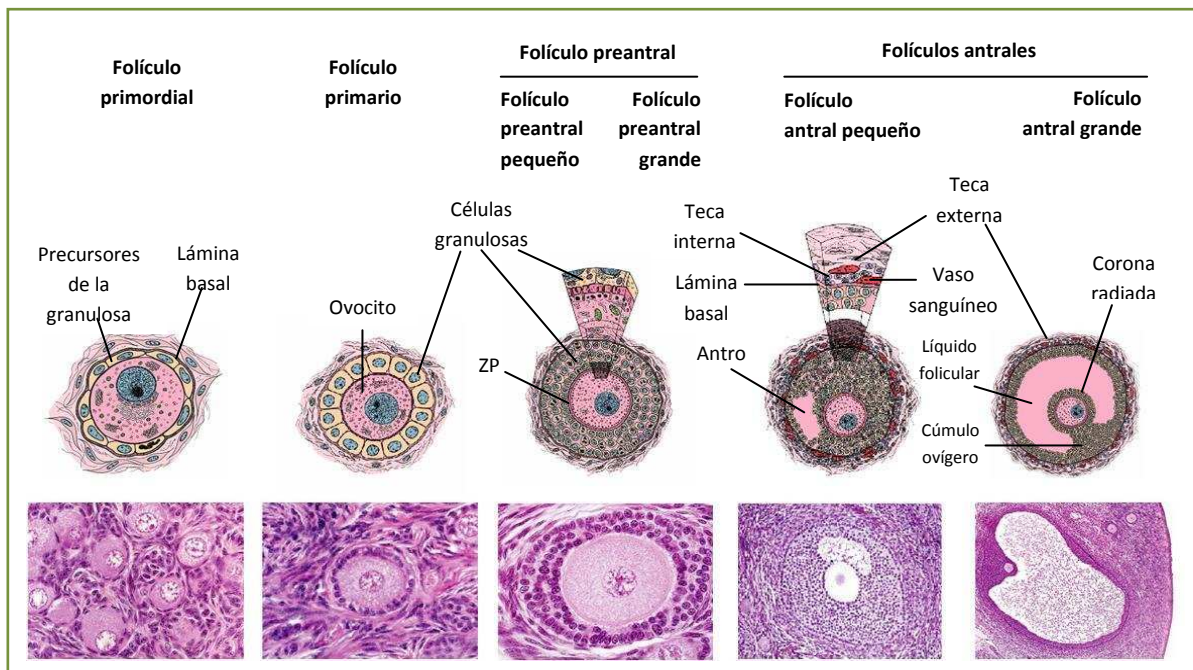


Figura 3: Principales categorías de folículos en reposo y en crecimiento. En la parte superior, se esquematizan los folículos indicando sus componentes, en la parte inferior se muestran cortes histológicos de los mismos teñidos con hematoxilina-eosína (Adaptado de Ross y col., 2004).

El estrato granuloso en los folículos antrales está rodeado por la teca, que se diferencia en dos capas: una interior, glandular y vascularizada, llamada teca interna, y otra exterior, formada por tejido conectivo y, en algunos casos, células musculares lisas, denominada teca

externa. La membrana basal que limita la capa de células de la granulosa de la teca interna se encuentra muy desarrollada en este estadio. En los grandes folículos terciarios las células de la granulosa que rodean íntimamente al ovocito se vuelven cilíndricas y se disponen radialmente formando la corona radiada que nutre al ovocito. Estas células permanecen junto al ovocito incluso después de la ovulación en la mayoría de las especies (Dellmann y Eurell, 1998). (figura 3).

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

<i>Folículo</i>	<i>Capas de CG</i>	<i>Nº de CG</i>	<i>Diámetro folicular (µm)</i>	<i>Diámetro del ovocito (µm)</i>	<i>Presencia de ZP</i>	<i>Presencia de TI</i>
Primordial (tipo I)	1	< 10 planas	< 40	30	No	No
Primario (tipo II)	1-1,5	10-40 cúbicas	40-80	31	No	No
Preantral pequeño (tipo III)	2-3	41-100	81-130	49	No	No
Preantral grande (tipo IV)	4-6	101-250	131-250	69	+	+
Antral (tipo V)	> 6	> 250	250-500	93	++	++

CG: células de la granulosa, Nº: número, ZP: zona pelúcida, TI: teca interna.

1.2. FISIOLOGÍA DEL CICLO ESTRAL BOVINO

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 (Forde y col., 2011). Estos patrones son independientes de la estación del año, por lo que las hembras bovinas son consideradas como poliéstricas continuas (García Sacristán, 1995; Hafez y Hafez, 2000). El comienzo de los ciclos estrales ocurre en el momento de la pubertad, la que ocurre 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, y consiste en dos fases: la fase lútea (14-18 días) y la fase folicular (4-6 días). La fase lútea es el período que sigue a la ovulación y es donde se presenta un CL estructural y funcionalmente completo, mientras la fase folicular es el período que sigue a la lisis del CL (luteólisis) hasta la ovulación. Durante la fase folicular se produce la maduración final y la ovulación del folículo preovulatorio. A su vez, estas fases se subdividen en proestro (etapa donde se da el crecimiento final del folículo preovulatorio), estro (etapa donde se produce el comportamiento estral), metaestro (etapa donde se produce la ovulación) y diestro (etapa donde el CL es funcionalmente competente) (Forde y col., 2011). Toda esta serie de eventos están regulados por hormonas provenientes del hipotálamo (GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas), hipófisis (FSH: hormona foliculoestimulante, y LH: hormona luteinizante), ovarios (progesterona, estrógeno, inhibina, entre otras) y útero (PGF2 α), las cuales funcionan a través de un sistema de retroalimentación positiva y negativa para gobernar el ciclo estral (Forde y col., 2011) (figura 4).

Proestro

Es el tiempo inicial de la fase folicular que comienza con la regresión estructural y funcional del CL y termina con el inicio del estro. Conforme el CL regresa y las concentraciones de progesterona disminuyen, van aumentando las concentraciones de estradiol, que cumple una función importante en el aumento del tono uterino (Bonafos y col., 1995; Hafez y Hafez, 2000).

Estro

Es la última fracción de tiempo de la fase folicular, puede durar 18+/- 6 hs. Durante el estro, el estradiol alcanza su máxima concentración circulante y, en forma asociada con la caída de los niveles de progesterona, se da el inicio del comportamiento sexual receptivo o

celo. A nivel endocrino, el centro cíclico hipotalámico recibe el estímulo de los estrógenos y se produce el pico de GnRH y, en consecuencia, el pico de LH y FSH. Dicha onda de LH, precede en aproximadamente 24 - 30 horas a la ovulación (Roelofs y col., 2005; Forde y col., 2011).

Metaestro

Es el período inmediato a la finalización del celo. En este período ocurre la ovulación en el bovino, a diferencia de otras especies que lo hacen durante el estro, y comienza la organización celular y desarrollo del CL. Se extiende durante 6 días según algunos autores (Fortín, 1989; Callejas, 2001) o 3-4 días según otros (Forde y col., 2011). Implica la luteinización de células foliculares del folículo dominante anterior, un proceso complejo que involucra la remodelación del estroma y vasos sanguíneos y transformación bioquímica de las células productoras de andrógenos (teca) y estrógenos (granulosa), en células productoras de progesterona (Niswender y col., 2000).

Diestro

Comienza luego del metaestro y finaliza con la regresión del CL. A través del diestro, el CL maduro mantiene concentraciones máximas de progesterona mientras las ondas de crecimiento folicular continúan siendo iniciadas por la liberación de la FSH. Sin embargo, los folículos dominantes que crecen durante esta fase del ciclo no ovulan, debido a la retroalimentación negativa de la progesterona sobre la liberación cíclica de LH (Forde y col., 2011; Sartori y Barros, 2011). En ausencia de preñez, la regresión estructural y funcional del CL ocurre espontáneamente en respuesta a la prostaglandina F₂α (PGF₂α) durante el final del diestro, para formar un cuerpo *albicans* al comienzo del proestro.

1.2.1. Desarrollo folicular: Regulación endocrina

La foliculogénesis se compone de una compleja serie de eventos interrelacionados y altamente coordinados, que incluyen reclutamiento de folículos primordiales, proliferación de células de la granulosa/teca, maduración de ovocitos, esteroidogénesis y ovulación (Richards y Hedin, 1988; McLaughlin y McIver, 2009). Cada una de estas etapas implica un diálogo paracrino entre las capas celulares de ovocitos y granulosa/teca, principalmente mediado por una amplia gama de hormonas y citoquinas (Eppig, 1985, 2001; Richards y Hedin, 1988; Buccione y col., 1990; Oktay y col., 2000; Skinner, 2005; Su y col., 2008; Wigglesworth y

col., 2013). La luteinización completa el ciclo de vida folicular, proporcionando soporte hormonal para la implantación subsiguiente y la preñez temprana (Devoto y col., 2009; Oktem y Urman, 2010; Field y col., 2014).

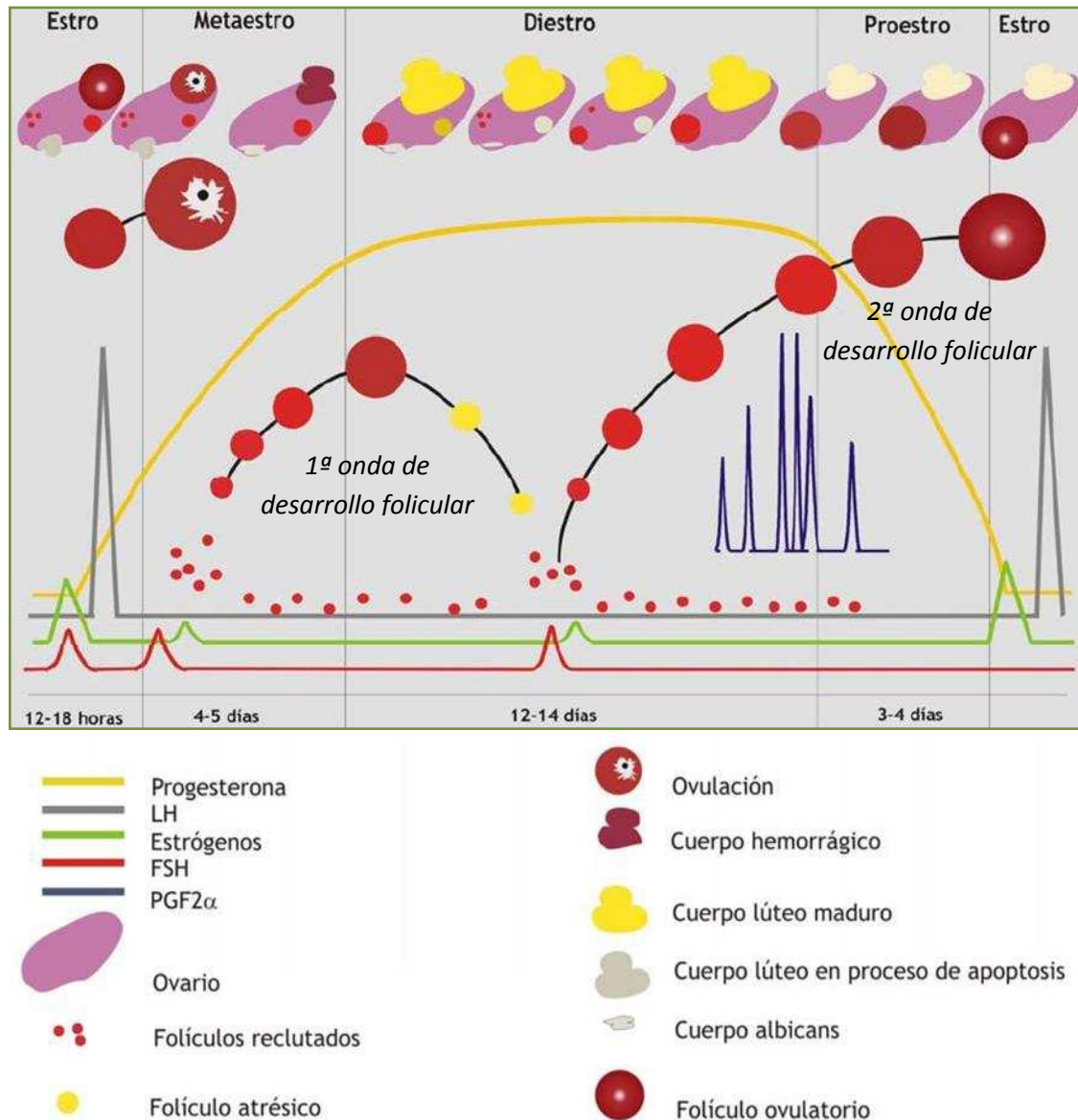


Figura 4: Diagrama del ciclo estral bovino mostrando los niveles hormonales en cada una de las etapas de las fases folicular y luteal (Adaptado de Gasque Gómez, R. (2008) Enciclopedia bovina. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. UNAM).

En el feto bovino hembra, se produce la formación de los folículos primordiales aproximadamente en el día 140 de la gestación (Rüsse, 1983). El reclutamiento inicial de folículos comienza inmediatamente después de su creación, y continúa sin interrupción hasta el agotamiento de la reserva ovárica. Incluso durante la vida fetal se desarrollan folículos

antrales, y en la vaca los primeros folículos antrales pueden ser identificados alrededor del día 230 de gestación (Rüsse, 1983). El desarrollo de folículo primordial a folículo preovulatorio es un evento prolongado, estimado en 180 días en la vaca (Lussier y col., 1987). Se ha establecido que el desarrollo de los folículos antrales requiere un promedio de 42 días en la vaca, o el equivalente a dos periodos de celo, por lo tanto, es en el estadio preantral donde permanece por más tiempo durante el desarrollo folicular. La activación continua de folículos primordiales tiene un marcado contraste con el reclutamiento cíclico de folículos antrales durante el celo. Como resultado de la iniciación incesante de folículos primordiales, el conjunto de folículos antrales que forman la cohorte de folículos en crecimiento es lo suficientemente grande con cada aumento de FSH durante el estro (Aerts y Bols, 2010a). Según Braw-Tal (2002), la activación del crecimiento folicular se puede subdividir en dos fases. En la primera fase, las células de la granulosa se someten a una transformación de planas a cúbicas. La segunda fase de crecimiento está dominada por la proliferación de las células de la granulosa, y por la expansión de volumen del ovocito. En las vacas, el comienzo del crecimiento del ovocito ocurre en folículos con al menos 40 células de la granulosa en la sección transversal mayor (Braw-Tal, 2002; Aerts y Bols, 2010a).

El proceso reproductivo de los mamíferos está regulado por una cascada compleja, a través de la combinación de actividades del sistema nervioso central (SNC), ciertos tejidos secretores, tejidos diana y varias hormonas. El SNC recibe información del entorno del animal (estímulos visuales, olfativos, auditivos, y táctiles) y transmite la información relevante para la reproducción a las gónadas mediante el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero (Hafez y Hafez, 2000; Callejas, 2001).

En una hipótesis aceptada por diversos investigadores (Picton y col., 1998; Fortune, 2003), la regulación del crecimiento del folículo en la primera fase se basa en un delicado equilibrio entre las señales locales inhibitoras y estimulantes. Cuando, por razones aún desconocidas, las señales de activación adquieren predominio, múltiples folículos primordiales inician el crecimiento. En la segunda fase, el folículo activado comienza a funcionar como una unidad autónoma. El ovocito produce dos factores que estimulan de manera autocrina su crecimiento: el factor de crecimiento diferencial (GDF) 9 y proteína morfogenética ósea (BMP) 15. Por su parte, las células de la granulosa secretan kit ligando (Braw-Tal, 2002; Aerts y Bols, 2010a).

El sistema hipotálamo-hipofisario-ovárico coordina el proceso que destina a un folículo a ovular mediante el control del ciclo estral (Hillier, 2001). La hormona que regula la función reproductiva es un decapeptido denominado GnRH, la cual es sintetizada en núcleos

neurales del hipotálamo y luego transportada a través de sus axones terminales a la eminencia media hipotalámica, para ingresar a la circulación portal y ser liberada en la adenohipófisis. La GnRH actúa sobre las células gonadotropas de la hipófisis anterior, que son las encargadas de sintetizar la LH y la FSH, y, tras su unión a receptores de alta afinidad expuestos en la membrana, estimula la liberación de estas gonadotropinas. Es indispensable que su secreción se dé en forma pulsátil, para la secreción normal de gonadotropinas hipofisarias (Hillier, 2001).

La FSH estimula el crecimiento de los folículos ováricos y la síntesis de estrógenos a través de receptores presentes en la membrana de las células de la teca y de la granulosa. La LH promueve la diferenciación de las células de la granulosa, la expulsión del ovocito y la consecuente formación del CL luego de la ovulación (Geneser, 2005). Tanto la FSH como la LH son secretadas a la circulación en forma de pulsos y picos, y son reguladas por dos sistemas: el tónico o generador de pulsos de la GnRH, y el cíclico o generador del pico preovulatorio de GnRH (Hafez y Hafez, 2000; Callejas, 2001; Hillier, 2001; Geneser, 2005). El primero, produce el nivel basal circulante, siempre presente, de hormonas hipofisarias, las cuales promueven el desarrollo de los elementos germinales y endocrinos de las gónadas. El segundo, opera agudamente, siendo evidente por sólo 12 a 24 horas en cada uno de los ciclos reproductivos de la hembra. El modo cíclico tiene por función desencadenar el pico preovulatorio de LH y, en consecuencia, la ovulación (Hillier, 2001; Geneser, 2005).

Además de requerir la pulsatilidad de GnRH, existe una regulación de parte de las hormonas ováricas tanto en la hipófisis como en el hipotálamo. Las concentraciones tónicas de FSH y de LH son controladas por retroalimentación endocrina negativa desde las gónadas. La frecuencia y amplitud de los pulsos de FSH y LH están influenciadas por las concentraciones circulantes de progesterona y estradiol. El principal efecto del estradiol es inhibir la liberación de FSH hipofisaria, conjuntamente con otros factores como IGFs, inhibina y foliculostatina, que producen los folículos antrales y sinergizan el efecto del estradiol (Wiltbank y col., 2002; Adams y col., 2008; Ortega y col., 2008; Rey y col., 2010; Rodríguez y col., 2015). La respuesta diferencial al mismo ambiente de FSH parece ser fundamental en la selección del folículo dominante y en la regresión de los folículos subordinados.

En ausencia de gonadotropinas, los folículos pueden desarrollarse hasta las etapas preantrales finales o estadios antrales tempranos (Roche, 1996; Knight y Glister, 2001). La dependencia a FSH del folículo parece coincidir con la diferenciación de células de la granulosa en dos subtipos (las que dan origen al cúmulo y las murales), y por lo tanto, la

formación de antro (Richards, 2001). A pesar de que los folículos pre-antrales pueden desarrollarse independientemente de la disponibilidad de FSH, los receptores de FSH ya están presentes en las células de la granulosa de folículos primarios (Oktay y col., 1997; Findlay y Drummond, 1999). Por tanto, es concebible que el desarrollo óptimo de los folículos pre-antrales se alcanza sólo en la presencia de gonadotrofinas (Cortvrindt y col., 1997) (figura 5). La importancia de las gonadotrofinas en la cascada de eventos de desarrollo folicular se complica aún más por la producción y secreción de factores moduladores de la actividad de las gonadotrofinas a nivel celular. Estos factores moduladores locales incluyen la familia del factor de crecimiento transformante β (por ejemplo, inhibina y activina), y factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF1). La inhibina y la activina son a la vez secretadas por células de la granulosa. En cooperación con estradiol, inhibina funciona como un supresor de la FSH a través de un sistema de retroalimentación negativa en la glándula pituitaria. Localmente la inhibina actúa sensibilizando las células de la teca a la LH, causando un aumento de la producción de andrógenos. La activina estimula la proliferación de las células de la granulosa, la expresión del receptor de FSH, y la producción de estrógenos (Knight y Glistler, 2001). El IGF1 tiene un efecto sinérgico sobre la actividad de las gonadotrofinas (Armstrong y col., 2000; Aerts y Bols, 2010a).

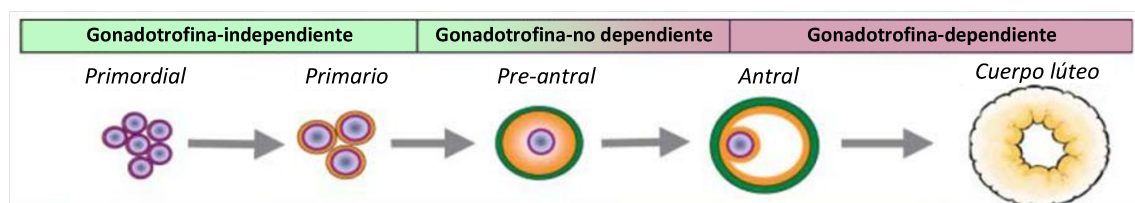


Figura 5: Progresión folicular a través de las sucesivas etapas de desarrollo y su respuesta a las gonadotrofinas hipofisarias. (Adaptado de Knight y Glistler, 2006).

La FSH, como se mencionó anteriormente, tiene una función importante en el inicio de la formación de la cavidad antral. Los folículos preantrales en su etapa tardía así como los folículos antrales tempranos, expresan receptores para dicha hormona (FSHR). Esta gonadotrofina, estimula la mitosis de las células de la granulosa, la formación del LF y la actividad esteroidogénica del folículo maduro. Estos eventos responden a cambios en los patrones de expresión de los receptores de gonadotrofinas (LHR y FSHR) como de enzimas esteroidogénicas (citocromo P450 aromatasa, 3β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa) que ocurren en este estadio del desarrollo folicular y en cada uno de los estratos celulares que

integran los folículos (Bao y Garverick, 1998; Webb y col., 1999; Zurvarra y col., 2009; Pretheeban y col., 2010; Alfaro y col., 2012). Por otro lado, las concentraciones séricas basales de LH, interaccionan con los receptores gonadotróficos presentes en las células de la teca interna de los folículos antrales y estimulan la producción de andrógenos y bajas concentraciones de estrógenos (principalmente 17β -estradiol). Estos andrógenos son secretados a los capilares o bien atraviesan la lámina basal para alcanzar la capa de células de la granulosa donde se produce su aromatización por acción de las enzimas esteroidogénicas (figura 6). Al mismo tiempo, conforme avanza el desarrollo del folículo dominante, los niveles basales de LH actúan conjuntamente con la FSH en la estimulación de la secreción de estrógenos, dada la presencia de receptores de LH en las células de la granulosa de folículos maduros (Bodensteiner y col., 1996; Robert y col., 2003). El aumento en el número total de receptores de LH en el folículo maduro, lo hacen sensible a las altas concentraciones de LH de la onda preovulatoria, al mismo tiempo que lo preparan para el proceso de luteinización posterior a la ovulación (Jolly y col., 1994; Mihm y Austin, 2002; Wiltbank y col., 2002). El aumento en la concentración de estrógenos circulantes debido a la marcada actividad esteroidogénica del folículo dominante, tiene un efecto de retroalimentación positiva en el centro cíclico del hipotálamo. Esto induce una onda repentina de liberación de GnRH, que se acompaña por la onda preovulatoria de LH y FSH. Ocurrida la ovulación, el folículo se retrae, dado que la presión del LF se reduce y mediante un notable plegamiento de la pared folicular, se forma lo que se conoce como cuerpo hemorrágico. Las células de la granulosa aumentan de tamaño, se multiplican bajo el influjo de la LH, y contribuyen a formar la población de células luteínicas grandes del CL. Las células de la teca interna, también contribuyen a la formación del mismo. La LH hace que las células de la granulosa y de la teca se conviertan en células lúteas (por hipertrofia e hiperplasia de las mismas) y produzcan progesterona, hormona necesaria para mantener la gestación. En la vaca, el CL está totalmente desarrollado y vascularizado a los nueve días de la ovulación, pero continúa creciendo hasta el duodécimo día, al alcanzar un diámetro aproximado de 25 mm. La progesterona producida en altas concentraciones por dicha glándula, es esencial para el mantenimiento de la preñez temprana, inhibe la producción de gonadotrofinas a nivel hipotálamo-hipofisario, controlando mediante el sistema de retroalimentación, los niveles de LH (Day y Anderson, 1998).

Finalmente, y considerado por ciertos autores como una parte más que se agrega al eje hipotálamo-hipófisis-gónada, se encuentra el útero, que es el responsable de la secreción de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$), (Shemesh y col., 1997; Callejas, 2001; Schillo, 2008). Esta hormona, secretada en forma pulsátil, interviene en la regulación neuroendocrina del ciclo

estral a través de su efecto luteolítico, y permite el inicio de un nuevo ciclo estral en ausencia de fertilización (Hafez y Hafez, 2000; Callejas, 2001; Ungerfeld, 2002, Adams y col., 2008) (figura 7).

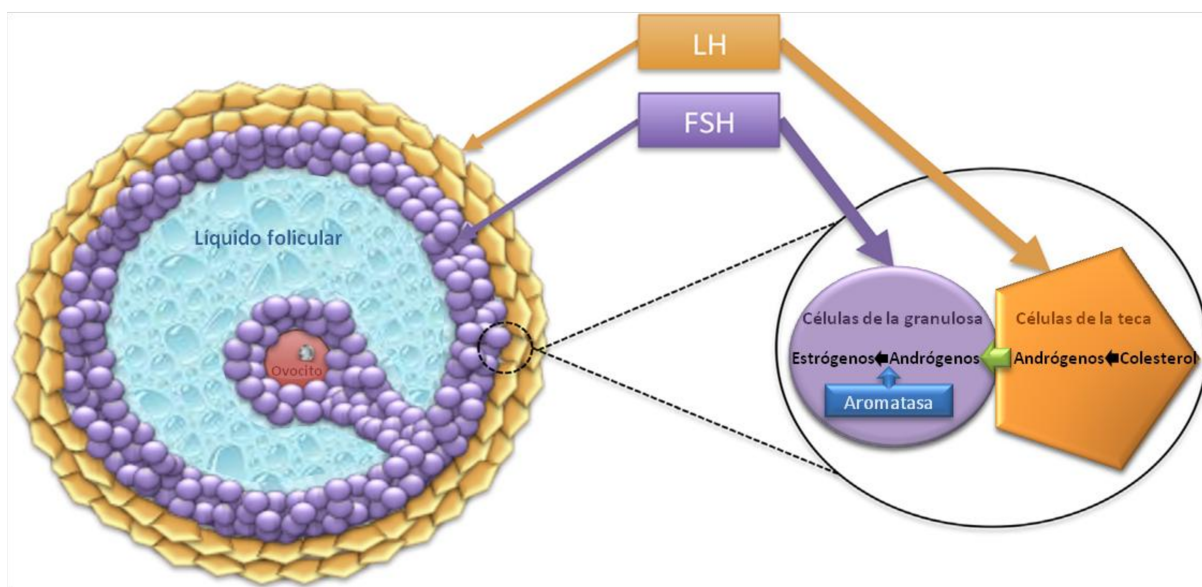


Figura 6: Dos gonadotropinas, dos células, mecanismo de la biosíntesis de estrógenos (Adaptado de Baskind y Balen, 2016).

1.2.2. Factores reguladores autocrinos y paracrinos

Es ampliamente reconocido que FSH y LH regulan tanto las funciones ováricas como testiculares. Sin embargo, es difícil explicar los procesos reproductivos como la foliculogénesis, la selección de folículos ovulatorios y atresicos, y la maduración del ovocito sólo con base en los cambios en las concentraciones de gonadotropinas (Hafez y Hafez, 2000).

En los estadios foliculares tempranos, las gonadotropinas parecen no ser un requisito definitivo para el desarrollo folicular (Campbell y col., 2003; Webb y col., 2003; Hunter y col., 2004). En ese momento del desarrollo, son los factores locales los que regulan el proceso de foliculogénesis. Los folículos primordiales permanecen en una fase latente hasta ser reclutados en la primera etapa de crecimiento y convertirse en primarios. Tradicionalmente se ha propuesto que en lugar de una sola vía de señalización, una orquesta multidireccional de comunicación entre los ovocitos y células somáticas (células de la granulosa y de la teca) conjuntamente con ciertos componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento, actúan en forma autocrina y paracrina, ejerciendo una acción relevante en esta transición y posterior crecimiento folicular (Oktay y col., 1997, 2000; Eppig,

2001; Skinner, 2005). Sin embargo, estudios recientes demostraron que existen señales inhibitorias capaces de mantener a los folículos primordiales en estado latente, evitando su activación. La pérdida de alguna de las moléculas inhibitorias, tales como la hormona anti-mulleriana (AMH), conduce a la prematura activación del *pool* de folículos primordiales y el agotamiento de la reserva folicular (Castrillon y col., 2003; Reddy y col., 2008; Adhikari y col., 2010; Oktem y Urman, 2010).

Los factores autocrinos y paracrinos involucrados en el desarrollo y diferenciación folicular incluyen a proteínas y hormonas (Hussein, 2005; Skinner, 2005; Song y Wessel, 2005; Van der Hurk y Zhao, 2005; Pangas y Rajkovic, 2006; Palma, 2008). Dentro de ellos, se puede citar a las neutropinas (NTs) que son miembros de la familia de los factores de crecimiento neuronales (NGF del inglés, *neuronal growth factor*), el Kit ligando (KL del inglés, *kit ligand*), el factor de crecimiento epidermal (EGF del inglés, *epidermal growth factor*), el factor de crecimiento transformante-alfa (TGF- α del inglés, *transforming growth factor- α*), el factor de crecimiento del queratinocitos (KGF del inglés, *keratinocyte growth factor*; también conocido como factor de crecimiento fibroblástico-7, FGF-7), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF del inglés, *basic fibroblast growth factor*; también conocido como FGF-2), el factor inhibidor de la leucemia (LIF del inglés, *leukemia inhibitory factor*), el IGF1 con sus receptores y moduladores, y todos los miembros de la superfamilia del TGF- β . Otras proteínas involucradas en el desarrollo y la diferenciación folicular son las interleuquinas y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α del inglés, *tumor necrosis factor- α*), estas proteínas son el objeto de estudio de esta tesis y serán abordadas en detalle en el apartado siguiente. La producción de citoquinas, su acumulación en el LF y su influencia en algunos procesos ováricos (Richards y Pangas, 2010; Qiao y Feng, 2011) sugiere que las citoquinas pueden ser importantes reguladores autocrinos, paracrinos y endocrinos de las funciones ováricas (Sirotkin, 2011).

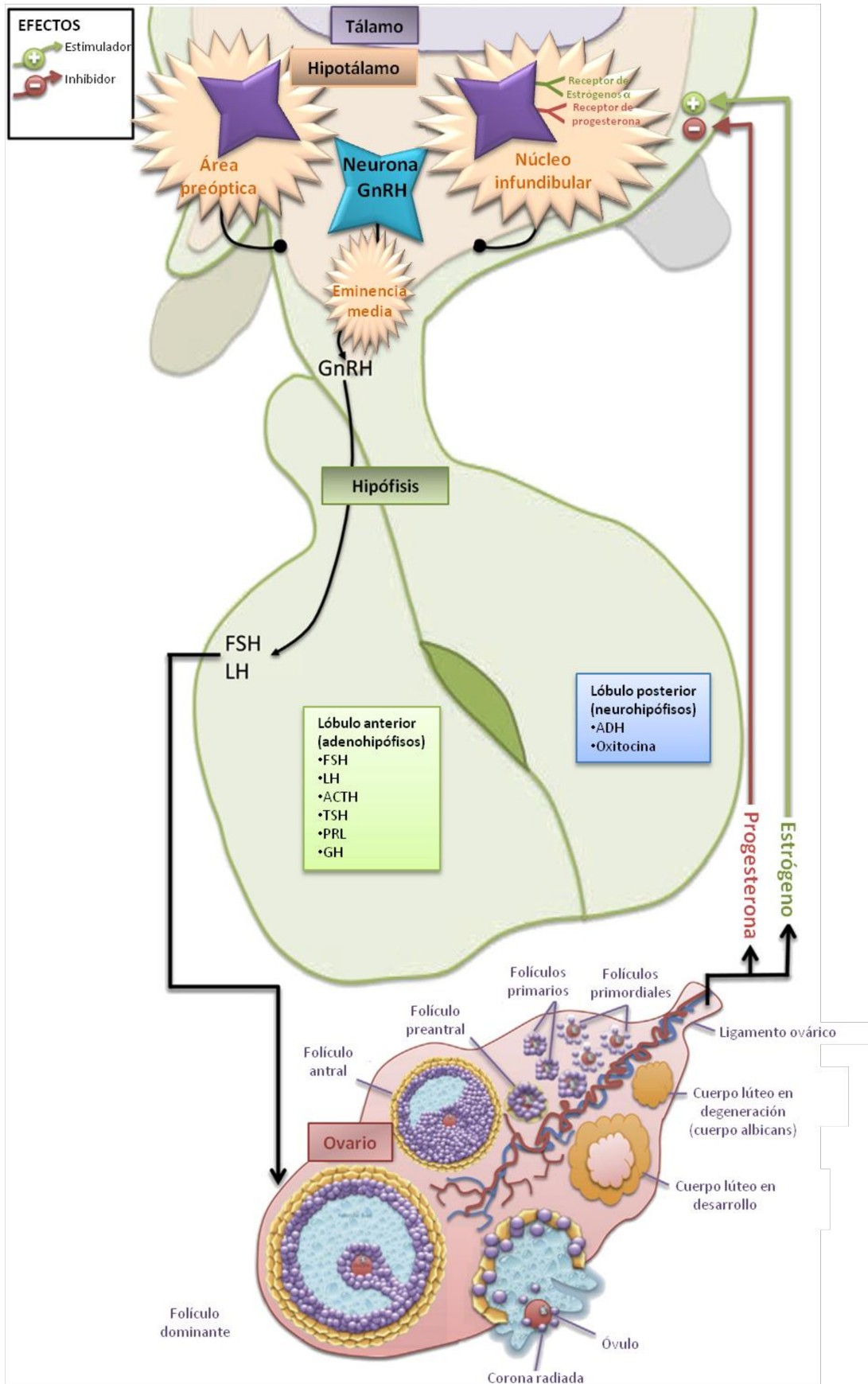


Figura 7: Esquema de los principales mecanismos de regulación endocrina del eje hipotálamo hipófisis gónadal. GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas. FSH: hormona foliculoestimulante. LH: hormona luteinizante (Adaptado de Baskind y Balen, 2016).

1.2.3. Dinámica folicular: Patrón de ondas

Los ciclos del bovino se presentan típicamente con dos o tres ondas de crecimiento, a pesar de que los ciclos con una o cuatro ondas también han sido observados (De Rensis y Peters, 1999). Ciclos cortos con una sola onda de crecimiento aparecen más comúnmente en posparto (Savio y col., 1990) y durante la pubertad (Evans y col., 1994).

La primera onda de crecimiento del ciclo emerge en el día de la ovulación (D0). En un patrón de dos ondas, la onda siguiente se produce en 9-10 días; en un patrón de tres ondas las próximas ondas se producen en 8-9 y 15-16 días (De Rensis y Peters, 1999; Mapletoft y col., 2002). En consecuencia, las ondas de crecimiento se desarrollan tanto durante la fase folicular y la fase lútea del ciclo estral.

La duración del ciclo estral en vacas con dos ondas de crecimiento es en promedio de 21 días, y de 23 días en los animales con tres ondas de crecimiento (Pierson y Ginther, 1987; Sirois y Fortune, 1988).

Cada onda de crecimiento se puede subdividir en una fase de reclutamiento, selección y dominancia. En la figura 8 se representa gráficamente un patrón típico de desarrollo folicular de tres ondas.

Reclutamiento

Existen dos tipos de reclutamiento, el inicial y el cíclico. El reclutamiento *inicial* se da de una forma continua y empieza en el preciso momento en que se han formado los folículos, casi inmediatamente después del nacimiento y es el responsable de que los folículos primordiales salgan de su estado de reposo y comiencen una etapa de crecimiento. Durante el reclutamiento inicial, factores intraováricos u otros factores desconocidos, estimulan a un grupo de folículos primordiales a iniciar el crecimiento, mientras el resto permanece senescente durante meses o años. Este proceso podría deberse a la liberación de estímulos inhibitorios que hasta ese momento mantenían a los folículos en reposo (McGee y Hsueh, 2000). El reclutamiento *cíclico*, en cambio, comienza antes de la llegada a la pubertad como resultado de un aumento en los niveles de FSH circulante de manera transitoria (Mihm y Austin, 2002; Espinoza-Villavicencio y col., 2007). Esto permite que una cohorte de folículos en crecimiento sea rescatada del proceso de atresia (McGee y Hsueh, 2000), e implica el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos antrales (típicamente 5-10 folículos según Aerts y Bols, 2010b; y 8-41 folículos según Adams y col., 2008), identificables por ultrasonografía a partir de los 4 mm, que ocurre al mismo tiempo en los dos ovarios (Ginther

y col., 1989). La “ventana de reclutamiento” o sea el momento de la emergencia folicular, es de 2 días en el bovino. La regresión del folículo dominante de una onda de crecimiento o la ovulación al final de un ciclo estral, provoca un aumento transitorio en las concentraciones circulantes de FSH. Esto se debe a que la pérdida del folículo dominante es acompañada por la disminución de los niveles de hormonas sintetizadas por el folículo, tales como estrógeno e inhibina, que conducen a través de un sistema de retroalimentación negativa, al aumento de la secreción hipofisaria de FSH. En consecuencia, la FSH es la principal responsable del reclutamiento de una nueva cohorte de folículos antrales durante el ciclo estral (Aerts y Bols, 2010b).

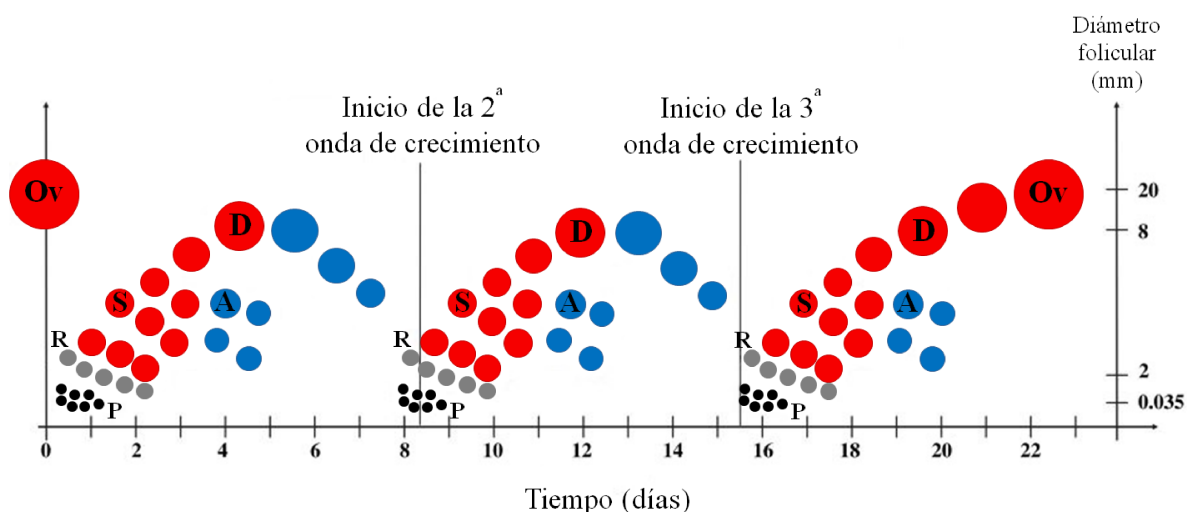


Figura 8: Reclutamiento, selección y dominancia en un patrón de tres ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. P: Folículo primordial, reserva ovárica. R: Reclutamiento. S: Selección. D: Dominancia. A: Apoptosis. Ov: Ovulación. (Adaptado de Aerts y Bols 2010b).

Selección

Durante cada ciclo estral, los folículos reclutados se someten a un proceso de selección, mediante el cual en las especies monovulares - tales como las vacas - normalmente un único folículo se desarrolla en un folículo dominante, mientras los demás folículos de la onda regresan (subordinados). La selección folicular ocurre al final de la fase común de crecimiento (Ginther y col., 2000).

El ascenso transitorio de FSH responsable de la iniciación de una onda de crecimiento folicular alcanza su pico cuando los folículos bovinos más grandes alcanzan un diámetro de 4-5 mm, y después disminuye (Kulick y col., 1999). Los niveles máximos de FSH en la primera onda de crecimiento del ciclo se alcanzan normalmente 28 horas posteriores al inicio del estro (Mihm y Austin, 2002). La producción y secreción de estradiol e inhibina por los folículos en

crecimiento resulta en la supresión de la liberación de FSH, a pesar de que estos folículos siguen dependiendo de FSH para su continuo crecimiento. En los bovinos, los experimentos han revelado que los folículos con un diámetro de 3 mm no suprimen la secreción de FSH, pero adquieren la capacidad de suprimir la secreción de FSH cuando el folículo alcanza un diámetro de 5 mm (Gibbons y col., 1999).

Dominancia

El folículo dominante de la primera onda será anovulatorio, porque se desarrolla durante la fase luteal, y tiene una fase de crecimiento (días 0 a 6), una fase estática (días 6 a 12) y una fase de regresión (día 12 en adelante). Los folículos subordinados en cada onda incrementan su tamaño, hasta alcanzar un diámetro máximo de 8 mm, 3 días posteriores a la emergencia de la onda, luego tienen una pequeña fase estática y regresan (Bó y Caccia, 2002). Cuando el folículo de mayor tamaño de la segunda onda, después de aproximadamente 3 días de crecimiento, alcanza un diámetro de 8,5 mm en promedio, ocurre una diferenciación entre el futuro folículo dominante y los folículos subordinados restantes. Este momento decisivo se denomina “desviación” (Ginther y col. 1997, 1998, 1999; Beg y Ginther, 2006). Antes de la desviación todos los folículos en crecimiento tienen la capacidad de convertirse en folículo dominante; ocurrida la desviación del folículo de mayor tamaño, se convierte en un folículo dominante, mientras que los otros regresan. El folículo dominante se transforma rápidamente en el inhibidor primario de la secreción de FSH, pero es capaz de continuar su crecimiento a pesar de los niveles basales de FSH. Las bajas concentraciones de FSH tienen la ventaja de impedir el surgimiento de una nueva cohorte de folículos en crecimiento. Esta diferenciación es generalmente un evento muy brusco (Ginther y col. 1997), mediante el cual el folículo dominante en un período crítico de alrededor de 8 horas de ser destinado a la desviación suprime la FSH, y por lo tanto provoca atresia de los folículos antrales restantes (Ginther y col., 2000). La relación entre los folículos y FSH es descrito por Ginther y col. (2000, 2001) como un acoplamiento funcional de dos vías. Durante la selección, existe un acoplamiento FSH-folículo, mediante el cual los folículos en crecimiento inhiben la secreción de FSH mediante la producción de estradiol e inhibina, mientras que son aún dependientes de FSH para su propio crecimiento. Al inicio de la desviación, la relación cambia a un único acoplamiento folículo-FSH, proporcionando niveles restringidos de FSH que permiten que sólo el futuro folículo dominante prospere. Es generalmente aceptado que la LH realiza un papel clave durante la fase de dominio. En los folículos de la especie bovina, en general, los receptores de LH aparecen cuando el folículo ha adquirido 8 mm de diámetro. Se supone que

el folículo dominante experimenta una transición en la dependencia de la gonadotropina FSH a LH (Mihm y col., 2006), por lo que es capaz de sobrevivir y madurar a pesar de los bajos niveles circulantes de FSH. Durante la etapa de dominancia, los cambios funcionales del folículo dominante, tales como una disminución de la relación intrafolicular de estradiol: progesterona (Mihm y col. 2006), están dirigidos a la preparación para la ovulación. El efecto de la GnRH está determinado por su frecuencia de pulso: frecuencias rápidas promueven la liberación de LH y frecuencias lentas promueven la liberación de FSH (Wildt y col., 1981; Nicol y col., 2008). La progesterona inhibe de forma aguda la frecuencia del pulso de GnRH, y es considerado como el efector principal de LH (Bergfeld y col., 1996; McCartney y col., 2007). El efecto de retroalimentación del estradiol sobre la secreción de gonadotropina es en función de un nivel de umbral: a concentraciones plasmáticas por debajo del umbral, el estradiol ejerce un efecto de retroalimentación negativa; encima del umbral ejerce un efecto de retroalimentación positiva (Bouchard y col., 1988; Svensson, 2000; Wiltbank y col., 2002). Por lo tanto el aumento de las concentraciones de estradiol periféricas afecta positivamente la frecuencia del pulso de GnRH, resultando en la secreción elevada de LH. En ausencia de un CL funcional, la acción de la LH, inducirá la ovulación y la luteinización. Por su parte, la síntesis de estradiol folicular también es influenciada por LH y FSH. La producción de los receptores de andrógenos en las células de la teca es estimulada por LH. Estos andrógenos son posteriormente aromatizados en las células de la granulosa a estradiol por la aromatasa, cuya expresión es estimulada por FSH (Fortune, 1994). La producción de 17β -estradiol (E2), sin embargo, no parece ser una característica clave en el mecanismo de selección del folículo, y las concentraciones varían de acuerdo con el estado fisiológico de la vaca. Concentraciones de E2 bajas son típicas de los folículos en desarrollo posparto, concentraciones moderadas de folículos en la primera onda de crecimiento y altas concentraciones de folículos en desarrollo en la fase folicular del ciclo estral (Driancourt, 2001) (figura 9).

Atresia folicular

Como consecuencia de que únicamente un pequeño porcentaje de los ovocitos potenciales son liberados por el ovario en cada ovulación, la mayoría de los folículos experimentan regresión en algún momento de su desarrollo. Esta regresión recibe el nombre de *atresia folicular*, y puede ocurrir en cualquiera de las etapas del crecimiento folicular (Hsueh y col., 1994; Quirk y col., 2004). Se caracteriza por cambios degenerativos no inflamatorios que llevan a la pérdida del ovocito y células de la granulosa. Si bien la atresia es un evento que culmina en la muerte de las células involucradas, también se trata de un

proceso celular activo donde ocurren la reabsorción de los folículos como producto de la infiltración de macrófagos y la fagocitosis; la migración de fibroblastos tecales y la producción de colágeno (Martin, 1997; Schultz y Wysocki, 2009; Rodgers e Irving-Rodgers, 2010).

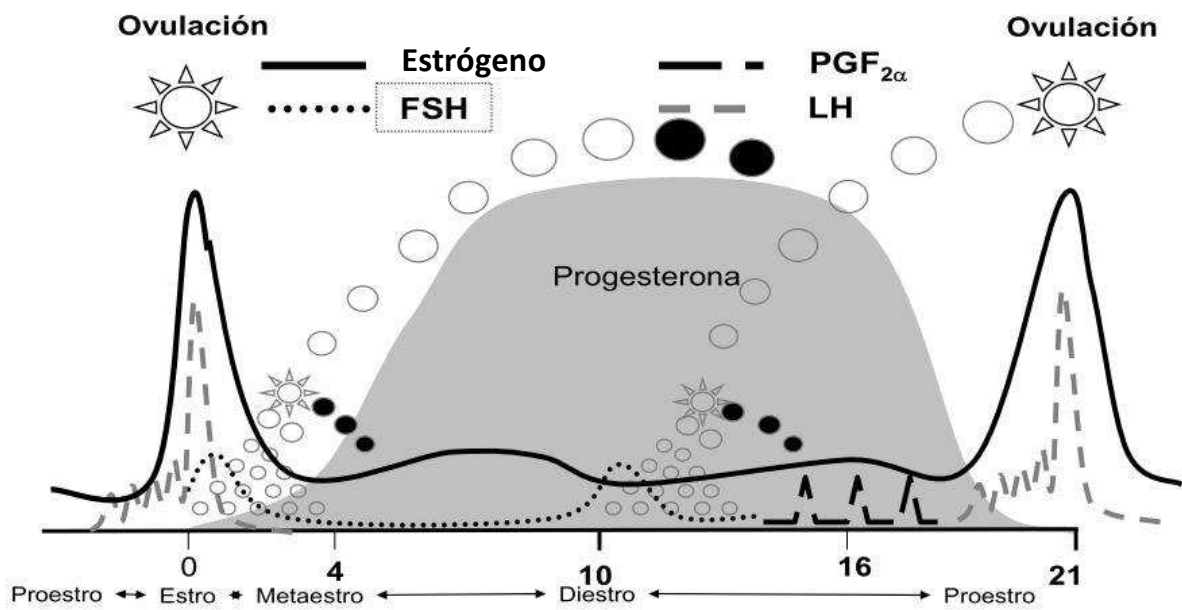


Figura 9: Esquema de las concentraciones hormonales y la dinámica de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. FSH: hormona foliculoestimulante. LH: hormona luteinizante. $PGF_{2\alpha}$: prostaglandina $F_{2\alpha}$. (Adaptado de Rippe, 2009).

1.2.4. Maduración, función del cuerpo lúteo y ovulación

Aquellos folículos antrales que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración y han adquirido la capacidad para ovular ante los adecuados niveles de LH se denominan folículos preovulatorios. Estos folículos se caracterizan por una baja tasa mitótica de las células foliculares y una alta relación estrógenos/andrógenos y estrógenos/progesterona en el LF. El folículo ovulatorio maduro alcanza un tamaño aproximado de 17 mm en la vaca y cuando se encuentra desarrollado al máximo, sobresale de la superficie del ovario. Una serie de eventos debe ocurrir para que se produzca la ovulación. La pared folicular se adelgaza, se producen pequeñas hemorragias en la misma y se hace transparente en el lugar de la ruptura folicular, el estigma. Los cambios en la pared folicular que preceden a su ruptura están causados por la liberación de colagenasas que causan la digestión de la pared folicular y su distensión en el estigma. Este proceso de digestión también ocasiona la liberación de

proteínas que provocan una respuesta inflamatoria con infiltración leucocitaria y liberación de histamina. Todos estos procesos degradan el tejido conjuntivo de la pared folicular y los componentes del cúmulo ovígero de tal manera que el folículo, finalmente se rompe en el estigma y el ovocito es liberado (figura 3) (Dellmann y Eurell, 1998). En los mamíferos los pulsos de LH preovulatorios son determinantes para la maduración folicular y la ovulación. En respuesta a la oleada de LH a mitad de ciclo, las prostaglandinas de la serie E son producidas por el folículo, y son cruciales para el éxito de la ruptura del folículo y la liberación del ovocito en el espacio periovárico (Filion y col., 2001). Además, se presume que la LH estimula y prepara células de la granulosa y la teca para la luteinización (Smith y col., 1994). Las células del cúmulo ovígero comienzan la síntesis de ácido hialurónico, lo cual permite la expansión del mismo a través de la ampliación del espacio entre las células de la granulosa (Eppig, 2001). Los pulsos de LH episódicos son necesarios para la formación de CL en las vacas, pero no se requieren para el mantenimiento de la función lútea. Las frecuencias pulsátiles típicas de LH durante el ciclo estral bovino son: 9-16 pulsos/24 horas en la fase lútea temprana; 6 pulsos/24 horas en la fase lútea media; y 14-24 pulsos/24 horas durante la fase folicular (Cupp y col., 1995; Ginther y col., 1998; Mihm y Austin, 2002). El primer folículo dominante del ciclo generalmente surge mientras el CL sigue activo. A través de la secreción de progesterona, el CL afecta negativamente la frecuencia de pulsos de LH, resultando en una frecuencia de pulso inferior a la mitad de la fase lútea y atresia el folículo dominante dependiente de LH. La luteólisis durante la fase de dominancia del segundo folículo dominante, dará lugar a la ovulación de este folículo. Sin embargo, si el CL permanece activo, la secreción de progesterona y la supresión de LH subsiguiente causarán la regresión del segundo folículo dominante. El folículo dominante sólo se beneficiará del aumento de frecuencias de los pulsos LH en la fase folicular, que promoverán la maduración y, finalmente, la ovulación (Mihm y Austin, 2002).

Luego de la ovulación, las capas foliculares se reorganizan para convertirse en el cuerpo hemorrágico en un principio y luego en el CL. Los capilares y los fibroblastos del estroma circundante proliferan y penetran la membrana basal. El CL es una glándula endocrina transitoria formada por las células foliculares remanentes del folículo que ha sido ovulado. Su principal función es secretar progesterona, la cual tiene numerosas funciones, entre ellas, el acondicionamiento del útero para el período de preñez y la regulación de las contracciones del oviducto para el transporte del óvulo hacia el útero (Dellmann y Eurell, 1998).

1.2.5. La ovulación: proceso inflamatorio

Hasta hace poco tiempo se asumía que la ovulación era un proceso relativamente simple, que involucraba a un pequeño número de factores reguladores, activados por el pico preovulatorio de LH. Esto se basaba en los pocos cambios metabólicos necesarios para activar a las enzimas proteolíticas que degradan el área más apical del folículo ovulatorio (estigma). Sin embargo, los nuevos métodos para el estudio de expresión génica, han permitido relacionar a más de 100 genes con el proceso de ovulación y la mayoría de estos han sido asociados directa o indirectamente con reacciones inflamatorias agudas en los siguientes procesos fundamentales: 1) elementos de respuesta temprana que inician la reacción inflamatoria; 2) eventos proinflamatorios que llevan a la degradación proteolítica de la pared folicular; 3) antiinflamatorios endógenos que promueven la cicatrización y reparación de las áreas afectadas del ovario; y 4) protección del tejido frente al estrés oxidativo generado localmente durante el proceso ovulatorio. En la actualidad, numerosas evidencias experimentales refuerzan la hipótesis de que la ovulación es un proceso inflamatorio agudo, incluyendo el hecho de que determinados agentes antiinflamatorios que afectan la respuesta aguda, tales como la indometacina, son capaces de bloquear la ovulación, mientras que otras drogas antiinflamatorias que tienen efecto sobre procesos inflamatorios crónicos, como la dexametasona, no tienen efecto sobre la misma (Espey, 1994; Espey y col., 2004).

La ovulación implica la remodelación activa de la matriz extracelular para facilitar la ruptura del folículo antes de la luteinización, vasomoción microcirculatoria (oscilación del músculo liso de los vasos sanguíneos intraováricos), formación de un área avascular en el ápice folicular y extrusión del complejo ovocito-cúmulo (Zackrisson y col., 2011). Este proceso se considera un evento inflamatorio, mediado por citoquinas, asociado con marcadores citológicos bien conocidos, tales como una afluencia de leucocitos, que son potencialmente derivados del bazo (Bukulmez y Arici, 2000; Richards y col., 2008; Oakley y col. 2010, Richards y Pangas, 2010). Estos leucocitos (que comprenden linfocitos, granulocitos y macrófagos) promueven la ovulación a través de su secreción de una serie de proteasas y agentes vasoactivos (Brännström y Enskog, 2002; Oakley y col., 2010). Los macrófagos realizan una serie de funciones durante la ovulación, incluyendo la secreción de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) que median la remodelación de la matriz extracelular (Curry y Osteen, 2003; Parks y col., 2004) y la fagocitosis de las células de la granulosa atrésicas (Duncan, 2000; Penny, 2000; Pate y Landis Keyes, 2001). Los linfocitos

también contribuyen a la función folicular a través de la producción selectiva de una serie de citoquinas (Bukulmez y Arici, 2000; Field y col., 2014).

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

Como ya hemos mencionado, el proceso ovulatorio en mamíferos se ha caracterizado como una reacción inflamatoria aguda (Espey, 1980; Espey, 1994). Por lo tanto, la ovulación (es decir, la rotura folicular) es un fenómeno morfológico distinto que se produce durante la transformación de un folículo ovárico en un CL (Espey, 1999). Los cambios que se producen en el tejido en el sitio de ruptura son de naturaleza fisiopatológica, ya que requieren una disrupción aguda de las capas densas de los tejidos conjuntivos ricos en colágeno que consisten en la teca externa alrededor de los folículos individuales y la túnica albugínea que encapsula todo el ovario (Espey, 1994). El daño local incluye hemorragia en la proximidad de la lesión en la superficie del ovario. Sin embargo, los cambios estructurales no se limitan únicamente al área que se rompe en la superficie folicular. El proceso ovulatorio afecta a todo el estrato granuloso y a la teca interna adyacente (Espey, 1994) y en consecuencia, cada porción de las dos capas más internas de la pared del folículo se transforman en tejido luteal activo. Esto no debería ser sorprendente, porque los receptores LH que responden al estímulo ovulatorio están distribuidos tanto en las células de la granulosa como en las de la teca interna (Espey y col., 2004).

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

Las respuestas inflamatorias se asocian con el desarrollo local de estrés oxidativo en el tejido afectado (Li y Jackson, 2002; Holmes-McNary, 2002). Como componente de las respuestas inflamatorias de los mamíferos, las especies reactivas de oxígeno (ROS), junto con las especies reactivas de nitrógeno (RNS), se generan especialmente en la vecindad de la

mitocondria hipóxica o reoxigenada (Davies, 1995; Mills y Higgins, 1997; Li y Jackson, 2002; Melov, 2002). Los superóxidos, y otras especies oxígeno reactivas, incluyendo O_2^- , OH^- y H_2O_2 , contribuyen a la lesión celular local mediante la liberación de proteasas y eicosanoides (Mills y Higgins, 1997), la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (Bautista, 2001) y el reclutamiento de leucocitos en el tejido afectado (Laroux y col., 2001). Para prevenir la necrosis excesiva y la apoptosis en el área (y especialmente en las células endoteliales altamente sensibles), la cascada inflamatoria incluye la activación de genes para minimizar las consecuencias deletéreas del estrés oxidativo (Espey y col., 2004).

Cuando un folículo se rompe y comienza a transformarse en tejido luteal, la angiogénesis es esencial para establecer y mantener un CL metabólicamente viable. La angiogénesis es una secuencia de eventos que ocurre en procesos fisiológicos normales y en una variedad de condiciones patológicas (Bouma-ter Steege y col., 2001). Comúnmente comienza con la vasodilatación y un aumento de la permeabilidad vascular en el tejido afectado (Distler, 2002). Además, las etapas iniciales del proceso requieren degradación proteolítica de la matriz extracelular que rodea los capilares existentes. Una vez que la matriz es más flexible y ha sido infiltrada por las proteínas plasmáticas, las condiciones locales son favorables para la proliferación y migración de las células endoteliales que componen las paredes de los capilares ya en la zona (Nguyen y col., 2001; Distler y col., 2002). Con el tiempo, a medida que los nuevos vasos comienzan a tomar forma, se estabilizan mediante el reclutamiento de pericitos y células musculares lisas a su alrededor (Espey y col., 2004).

Dentro de los efectores de la respuesta inflamatoria, las citoquinas cumplen papeles fundamentales debido a que influyen sobre la producción de diversos mediadores (bradicinina, histamina, derivados eicosanoides: prostaglandinas) y metaloproteasas, principales componentes activos del proceso inflamatorio (Richards y col., 2008). En el ovario, las citoquinas son secretadas tanto por células del sistema inmune que se encuentran en el estroma (Bukulmez y Arici, 2000; Wong y col., 2002), por las células somáticas incluyendo las de la granulosa y de la teca (Richards y col., 2008) como además, por el ovocito (Gerard y col., 2004). Una gran variedad de citoquinas han sido relacionadas con los distintos procesos que ocurren a nivel ovárico tales como la foliculogénesis, atresia folicular, ovulación y formación del CL, entre las que se destacan: el sistema de la interleuquina-1 (IL-1) compuesto por las $IL-1\alpha$ y $IL-1\beta$, el antagonista del receptor de IL-1 ($IL-1RA$) y sus receptores $IL-1RI$ e $IL-1RII$; la interleuquina-4 ($IL-4$), la interleuquina-6 ($IL-6$);

interleuquina-8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Gérard y col., 2004; Sakumoto y Okuda, 2004).

1.3. CITOQUINAS

1.3.1. Conceptos generales

Las citoquinas pertenecen a un grupo de más de 100 proteínas con un gran número de funciones superpuestas para llevar a cabo la regulación autocrina/paracrina de las células inmunes y también de otro tipo de células (Brännström y col., 2010). Son proteínas de señalización pequeñas y solubles, conocidas por sus propiedades inmunorreguladoras, pero cada vez más reconocidas como factores de crecimiento que rigen la proliferación, diferenciación, función y destino de las células (Orsi y Tribe, 2008). Incluyen a las interleuquinas (ILs), factor estimulante de colonias (CSFs, del inglés: *colony-stimulating factors*), factor de necrosis tumoral (TNFs, del inglés: *tumor necrosis factors*), factores de crecimiento transformantes (TGFs, del inglés: *transforming growth factors*) y otras hormonas peptídicas (tales como prolactina) producidas por una amplia gama de tipos celulares. Las citoquinas son fundamentales para el éxito reproductivo, creando un ambiente inmuno-permisivo, embriotrófico que apoya la gametogénesis, la fertilización, el desarrollo embrionario temprano, la implantación de blastocitos y el crecimiento fetal (Knight y Glister, 2006; Orsi y Tribe, 2008; Forbes y Westwood, 2010; Arsenescu y col., 2011, Witkin y col., 2011). La mayoría de estas citoquinas asociadas a la ovulación son producidas por macrófagos activados, y también se expresan en células de la granulosa y de la teca (Brännström y col., 2010). La importancia de las citoquinas en la fisiología ovárica es cada vez más reconocida, aunque la comprensión de sus funciones e interacciones precisas sigue siendo limitada (Field y col., 2014).

Numerosos efectos de las citoquinas, como son proliferación celular, diferenciación celular, apoptosis, angiogénesis y producción hormonal, se evidencian en las distintas fases del ciclo ovulatorio, como la foliculogénesis, esteroideogénesis, la ruptura folicular y ovulación, la remodelación folicular con formación y posterior regresión del CL (Inza y Van Thillo, 2011).

Numerosos estudios muestran evidencias de que las citoquinas no solo actúan durante reacciones inmunológicas sino también regulando otros procesos fisiológicos como la ovulación (Dhillo y col., 2006).

En el ovario, las citoquinas son secretadas por células del sistema inmune que se encuentran en el tejido conjuntivo ovárico (reclutadas desde la circulación sanguínea) (Bukulmez y Arici, 2000; Wong y col., 2002), y además, por el ovocito y las células

somáticas que lo rodean incluyendo las de la granulosa y de la teca (Brännström, 2004; Richards y col., 2008). Una gran variedad de citoquinas han sido relacionadas con los distintos procesos que ocurren a nivel ovárico como la foliculogénesis, atresia folicular, ovulación y formación del CL, así como también, liberación de hormonas, respuesta a reguladores hormonales, fertilidad y en ciertos casos el desarrollo de desórdenes ováricos (Sirotkin, 2011).

Cada una de las etapas de la foliculogénesis implica un diálogo paracrino entre el ovocito y las capas de las células de la granulosa y de la teca, mediado por una amplia gama de hormonas y citoquinas (Eppig, 1985, 2001; Richards y Hedin, 1988; Buccione y col., 1990; Oktay y col., 2000; Skinner, 2005; Su y col., 2008; Wigglesworth y col., 2013). Las citoquinas son esenciales para la progresión oportuna y satisfactoria en todas las etapas de la foliculogénesis, desde el reclutamiento folicular primordial hasta la ovulación y la luteinización. En consecuencia, la calidad y la viabilidad de los ovocitos resultantes están íntimamente ligadas al medio de citoquinas intraováricas/perifoliculares. Muchos estudios se han centrado en el análisis de cantidades pequeñas e individuales de citoquinas, a pesar de que se sabe que estos mediadores operan en redes en lugar de aislarse, exhibiendo características como pleiotropismo, sinergismo, antagonismo y redundancia funcional (figura 10) (Frankenstein y col., 2006; Orsi, 2008; Orsi y Tribe, 2008). Por tanto, el efecto de cualquier citoquina dada no depende sólo de su concentración absoluta, sino más bien de un equilibrio entre sus propios efectos y los inducidos por otros mediadores locales, incluidas otras citoquinas (Orsi, 2008; Field y col., 2014). La figura 11 resume la contribución temporal de cada citoquina en los distintos estadios de desarrollo folicular.

Las citoquinas dentro del folículo ovárico son, en su mayor parte, producidas localmente y, una vez secretadas, se difunden para crear gradientes quimiotácticos o actúan localmente en forma paracrina/autocrina, a menudo en concentraciones bajas y con una semivida corta, las perturbaciones pueden no afectar a los perfiles circulatorios (Field y col., 2014). El crecimiento del ovocito dentro de los folículos preantrales y la maduración dentro de los folículos antrales, son procesos dependientes de factores intraováricos, los cuales están presentes en el LF (Hsieh y col., 2009; Padhy y col., 2009). La concentración de estos factores dentro del LF está relacionada positivamente con sus niveles sanguíneos (Qiao y Feng, 2011). Cualquier desbalance o disfunción en estos factores junto con la alteración del microambiente del LF puede resultar en una foliculogénesis anormal y en desórdenes en el crecimiento y maduración ovocitario (Artini y col., 2007; Franks y col., 2008; Padhy y col., 2009).

Como en otros órganos, la acción de las citoquinas proinflamatorias durante la ovulación depende de la expresión de su correspondiente receptor en las células blanco y de la producción local de antagonistas de dichas citoquinas.

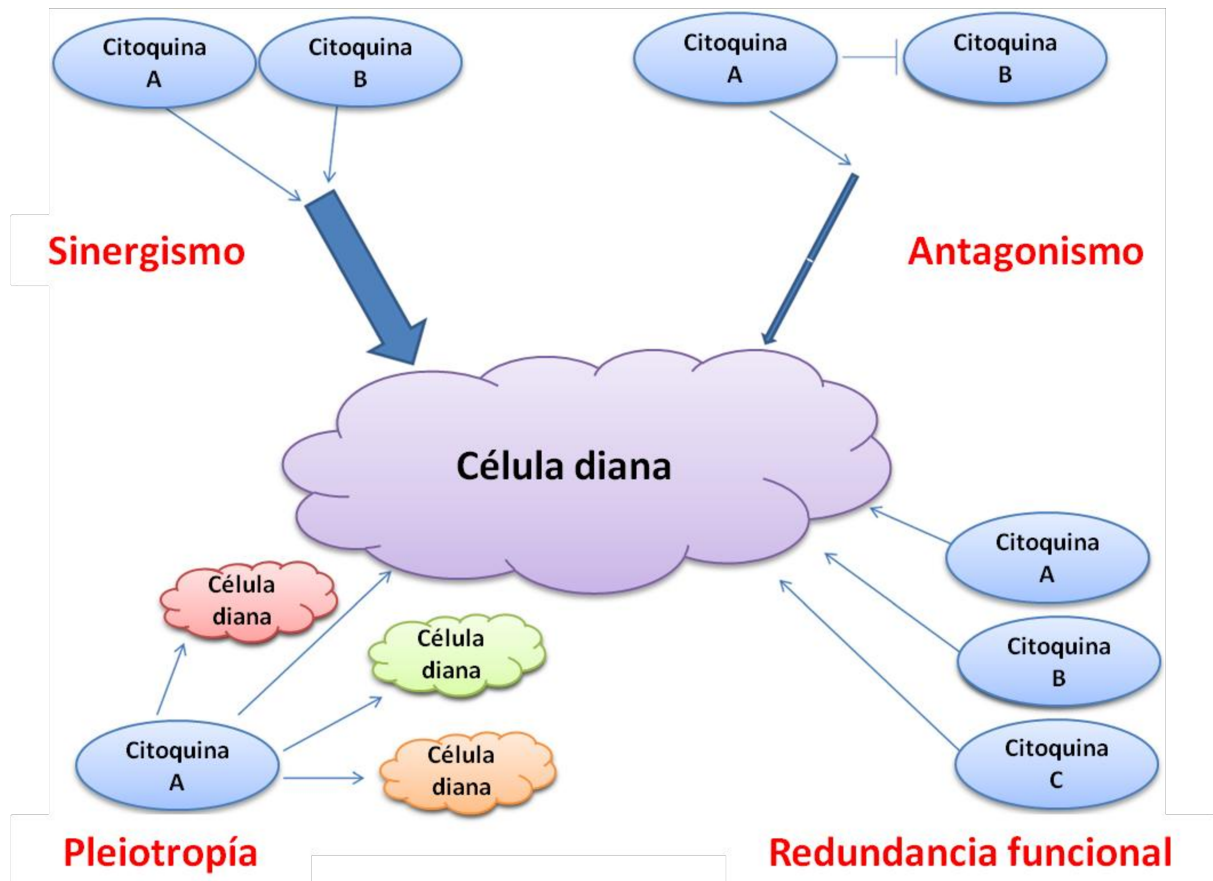


Figura 10: Representación esquemática de las propiedades claves de las citoquinas y sus interacciones. El sinergismo describe la interacción de dos (o más) citoquinas para mediar un efecto común cuya magnitud es mayor que la alcanzada por ambas citoquinas aisladamente. El antagonismo refleja los efectos opuestos de dos citoquinas, donde uno puede potencialmente modular la magnitud de un efecto dado inducido por el otro. La redundancia funcional representa la observación de que muchas citoquinas tienen funciones análogas (a veces operando a través del mismo sistema receptor) de tal manera que una función fisiológica dada puede ser alcanzada por cualquiera de un conjunto de mediadores. Finalmente, la pleiotropía se refiere a que cualquier citoquina puede tener un número de células diana, tanto cercanas como distantes. (Adaptado de Field y col., 2014).

1.3.2. Ligandos y receptores

1.3.2.1. Sistema de IL-1

Uno de los mediadores más importantes del proceso inflamatorio es la familia de la IL-1 (Mu y col., 2010). El sistema IL-1 está compuesto por dos ligandos bioactivos, IL-1 α e IL-1 β (Dinarello, 1994), dos tipos de receptores, el IL-1RI y IL-1RII y el IL-1RA, que regula

la actividad biológica de IL-1 mediante una fijación competitiva en los receptores (Arend, 1991). IL-1 α e IL-1 β ejercen efectos similares uniéndose a IL-1RI. Aunque hay diferencias fundamentales en su localización, maduración y secreción. IL-1 α se traduce en proIL-1 α , una forma ya biológicamente activa, mientras que IL-1 β se traduce en proIL-1 β , que no tiene actividad biológica, hasta que se procesa mediante la caspasa-1 activada tras el reclutamiento del complejo inflamasoma. También pueden unirse a IL-1RII, que actúa como un receptor señuelo y no está implicado en la transducción de señales (Akdis y col., 2016). IL-1RA e IL-1 se sintetizan y liberan en respuesta a los mismos estímulos (Eisenberg y col., 1990). IL-1RA carece del dominio interactivo con la cadena accesoria del receptor de IL-1 (IL-1RAcP), de modo que su unión a IL-1RI inhibe la señalización de IL-1 (Garlanda y col., 2013) (figura 12).

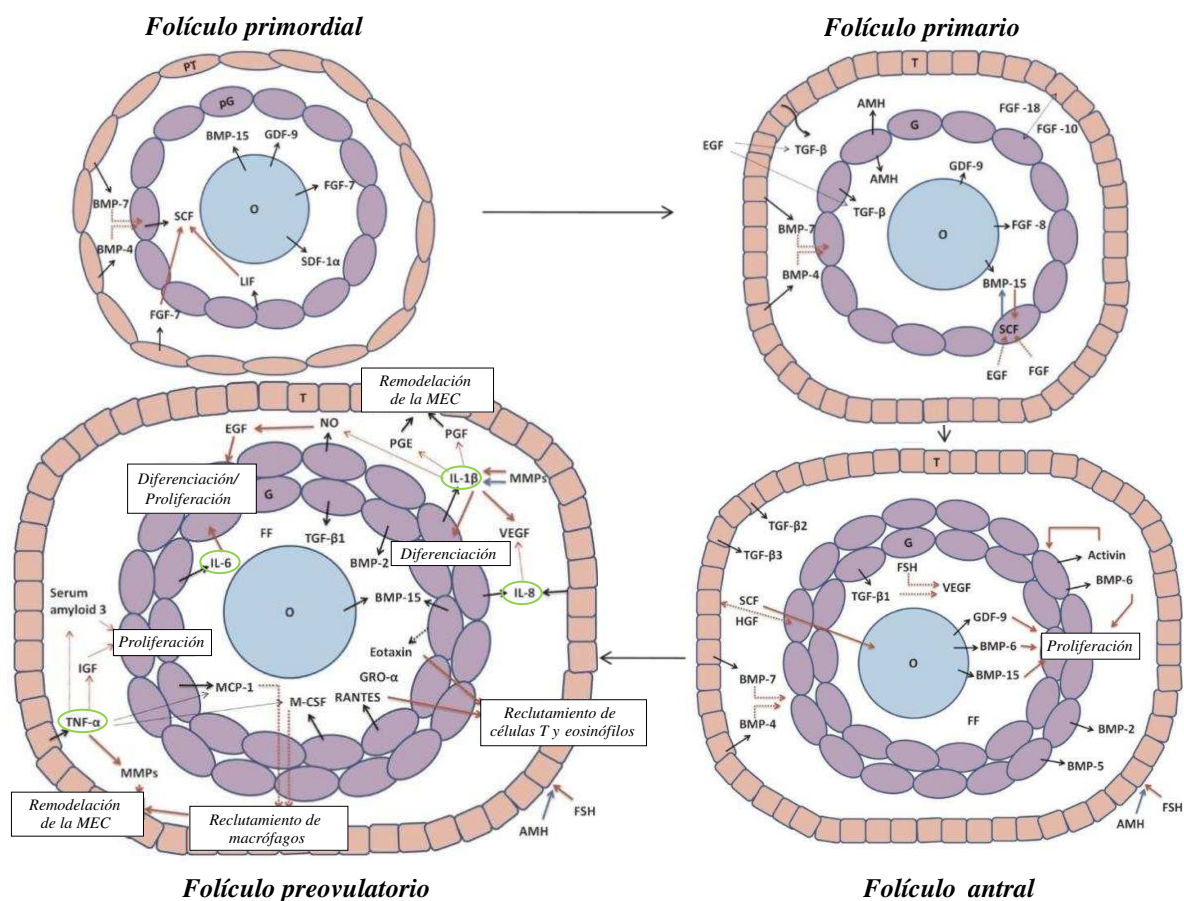


Figura 11: Representación esquemática de la implicación de citoquinas a lo largo de la foliculogénesis. Interacciones y localizaciones basadas en foliculogénesis humana, con inferencias a partir de modelos animales. Las capas celulares se separan y reducen para mayor claridad. O: ovocito; PG: células pre-granulosas; G: células de la granulosa; PT: células pre-teca; T: células de la teca. MEC: matriz extracelular. Las flechas negras indican sitios de producción de citoquinas; Las flechas rojas sólidas indican interacciones positivas mientras que las flechas azules interacciones negativas. Las flechas punteadas indican interacciones presuntas; aquellas alineadas indican sinergismo potencial. Las citoquinas modulan la foliculogénesis en todas las etapas, aumentando el número de citoquinas conocidas hacia la ovulación. Destacadas con óvalos verdes las estudiadas en este trabajo (Adaptado de Field y col., 2014).

Durante la foliculogénesis, la IL-1 promueve la proliferación y suprime la diferenciación, mientras que durante el proceso ovulatorio, IL-1 aumenta la producción local de eicosanoides, esteroides, metaloproteasas y sustancias vasoactivas para promover la ovulación (Brännström, 2004). Ha sido demostrado que los componentes del sistema IL-1 tienen numerosos sitios de síntesis en el ovario, a su vez, existe evidencia del rol de IL-1 en la estimulación de células ováricas, supresión de la apoptosis y en el crecimiento folicular (Gérard y col., 2004; Brännström y col., 2010).

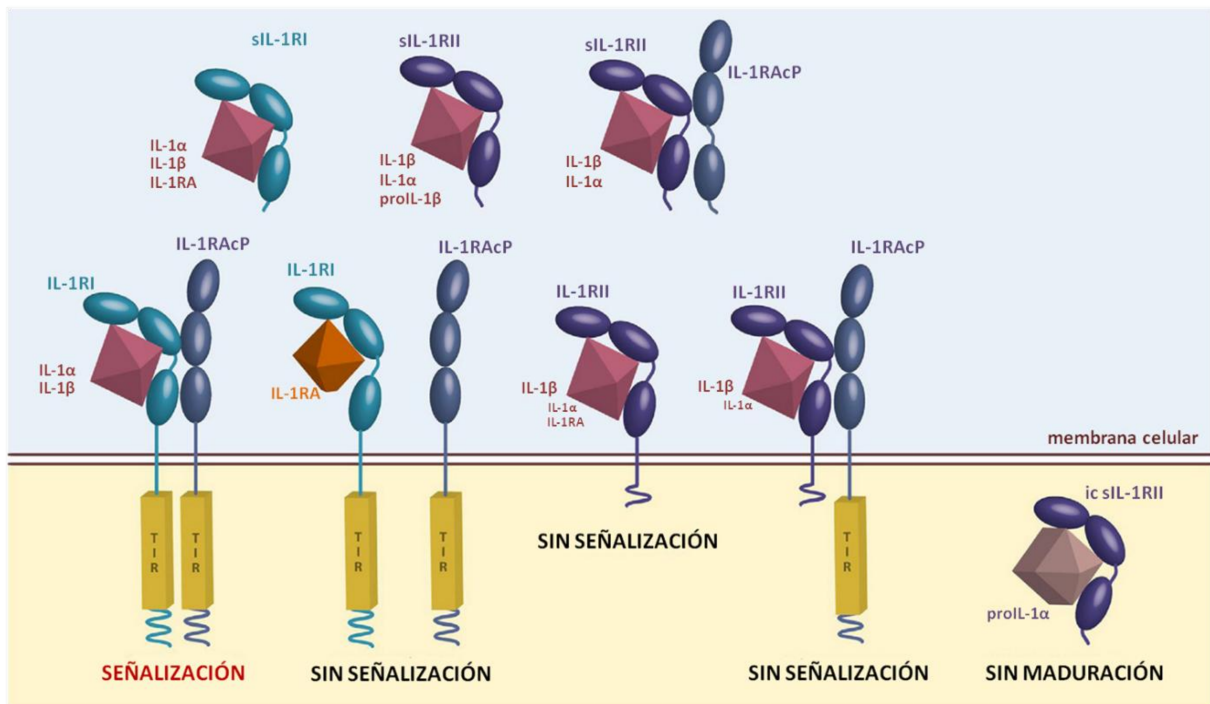


Figura 12: Complejos de los receptores de la IL-1. La unión de las citoquinas agonistas IL-1 α e IL-1 β se produce a través del receptor de unión a ligando IL-1RI, que contacta al ligando con dos sitios, y sufre un cambio conformacional que permite reclutar la cadena accesoria IL-1RAcP. La aproximación de los dominios TIR intracelulares de las dos cadenas inicia la señalización. La unión del antagonista IL-1RA a IL-1RI ocurre en un solo sitio y no induce cambios conformacionales ni reclutamiento de IL-1RAcP; por lo tanto, la señalización no se produce. La unión de IL-1 β (y con IL-1 α e IL-1RA de afinidad más baja) a IL-1RII unido a la membrana da como resultado el secuestro de ligandos agonistas y la falta de señalización. La unión de IL-1 β (y con IL-1 α de afinidad más baja) a IL-1RII unida a membrana también induce cambios conformacionales y permite el reclutamiento de IL-1RAcP. Debido a la falta de dominio TIR en IL-1RII, no ocurre la señalización. Las formas solubles de las tres cadenas también están presentes en el espacio extracelular e interactúan con ligandos y entre sí, dando como resultado el secuestro del ligando. La forma soluble de IL-1RI (sIL-1RI) se describió como capaz de unirse a IL-1 α , IL-1 β e IL-1RA. La forma soluble de IL-1RII (sIL-1RII) puede unirse y secuestrar IL-1 β , IL-1 α y proIL-1 β . El complejo entre sIL-1RII y ligandos agonistas (IL-1 α e IL-1 β) también puede reclutar sIL-1RAcP dando como resultado una mayor afinidad de unión. Se ha informado que una forma intracelular de sIL-1RII (ic sIL-1RII) es capaz de unir proIL-1 α y protegerlo de la escisión proteolítica y la generación de la forma madura. (Adaptado de Borashi y Tagliabue, 2013).

Murayama y col. (2010) mostraron que el ARNm para IL-1RI se expresa en las células de la teca en folículos antrales antes y después de la selección folicular en el ovario bovino y que el factor de crecimiento de endotelios vasculares (VEGF) estimula la expresión de IL-1 β y de IL-1RI en células tecales en cultivo. A su vez, la expresión génica del VEGF es inducida por IL-1 β , destacando el papel de este último en mejorar el flujo sanguíneo peri-folicular y el posterior reclutamiento de macrófagos / células T en el folículo (Levitas y col., 2000; Jung y col., 2001). Además, la IL-1 β modula la producción total de prostaglandina E (PGE) por las células de la granulosa, proporcionando así un mecanismo para determinar el sitio de la ruptura del folículo (Hurwitz y col., 1995a,b, 1997; Gaytan y col., 2002). Por otra parte, numerosos estudios han caracterizado la expresión del sistema de IL-1 en el CL bovino y en endometrio de la misma especie (Nishimura y col., 2004; Tanikawa y col., 2005; Majewska y col., 2010; Correia-Álvarez y col., 2015a). Passos y col. (2016) evaluaron la expresión proteica y génica de los miembros del sistema de la IL-1 en los folículos ováricos bovinos y los efectos de la IL-1 β sobre la activación del folículo primordial y la supervivencia *in vitro*. Después de 6 días de cultivo *in vitro*, la IL-1 β contribuyó a mantener la supervivencia temprana del folículo. Además, pudo detectarse expresión de los miembros del sistema IL-1 en todas las categorías foliculares (folículos primordial, primario, secundario y antral) mediante inmunohistoquímica. Paralelamente, la presencia de ARNm de estas proteínas demuestra la actividad de síntesis en las células del folículo bovino. Dichos autores demostraron que el crecimiento de folículos secundarios a antrales pequeños es seguido por un aumento en los niveles de ARNm para IL-1 β e IL-1RA. Dentro de los folículos antrales, este estudio muestra que la pared folicular es el principal sitio de producción de ARNm para IL-1 β , IL-1RA e IL-1RI. En general, los folículos grandes presentaron una expresión más elevada de IL-1 β , IL-1RA, e IL-1RII. Los resultados de los estudios inmunohistoquímicos demuestran la presencia de IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI y IL-1RII en ovocitos y células de la granulosa de los folículos primordiales, primarios y secundarios. En los folículos antrales pequeños y grandes, estas proteínas se encontraron en los ovocitos, en las células del cúmulo y en la granulosa mural.

Se sabe que en los ovocitos de ratones, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K/Akt) es la vía que regula la activación y la supervivencia de los folículos primordiales (Reddy y col., 2008). Es posible que los efectos de la IL-1 β en el desarrollo de los folículos primordiales bovinos involucren esta vía ya que Sizemore y col. (1999) encontraron que la IL-1 estimula el reclutamiento de PI3K al receptor y su posterior activación, iniciando una vía del factor nuclear kappa B (NF-kB), probablemente a través de señales transducidas a través de la

proteína quinasa B (Akt). En folículos preovulatorios de ratón, IL-1 β suprime la aparición espontánea de apoptosis en folículos cultivados *in vitro*, pero estimula la producción de óxido nítrico (NO) (Chun y col., 1995). En contraste, la adición de IL-1RA suprime estas acciones promoviendo la apoptosis, confirmando la mediación del receptor. Tomados en conjunto, estos hallazgos indican que la IL-1 β es un factor de supervivencia para los folículos ováricos, siendo su acción mediada parcialmente a través de NO y generación de guanosin monofosfato cíclico (Chun y col., 1995). Ha sido corroborado que IL-1 β es capaz de promover la proliferación de las células de la granulosa en la rata (Karakji y Tsang, 1995) y bovino (Basini y col., 1998) y suprimir la apoptosis en folículos ováricos de rata (Reddy y col., 2008), y por lo tanto puede ser considerado como un factor de supervivencia de los folículos. Estudios anteriores observaron que la IL-1 β controla la transición de las células foliculares facilitando su proliferación y diferenciación (Brännström, 2004), mientras que es capaz de modular la esteroidogénesis y promover la proliferación de células de la granulosa en porcinos (Fukuoka y col., 1989), bovinos (Spicer y Alpizar, 1994) y humanos (Best y Hill, 1995).

La IL-1 β ha sido ampliamente estudiada, y posee sus mayores efectos funcionales y estructurales como elemento de respuesta temprana del proceso inflamatorio en el ovario (Brännström, 2004). Sin embargo, numerosos estudios se han centrado en el efecto de la IL-1 sobre la esteroidogénesis. En células de la granulosa de folículos bovinos se determinó que la IL-1 β modifica la síntesis de progesterona y E2 (Baratta y col., 1996) y durante la ovulación incrementa la producción local de esteroides, MMPs y sustancias vasoactivas (Brännström, 2004). En estudios *in vitro* se ha demostrado que la IL-1 β inhibe la producción de progesterona en células de la granulosa de diversas especies (rata: Gottschall y col., 1987, 1988; Kasson y Gorospe, 1989; Brännström y col., 1993; cerdo: Fukuoka y col., 1989; conejo: Bréard y col., 1998). Por el contrario, la IL-1 β incrementa la producción *in vitro* de progesterona en las células de la granulosa bovinas (Baratta y col. 1996), y la IL-1 α estimula su síntesis en células de la granulosa provenientes de humanos (Sjogren y col., 1991), así como en folículos preovulatorios de hámster (Nakamura y col., 1990). Otros estudios han demostrado que no hay un efecto evidente de la IL-1 β en la producción de progesterona (bovinos: Nothnick y Pate 1990; Acosta y col., 1998; humanos: Barak y col., 1992). Además, la IL-1 puede tener algún efecto sobre la producción de E2. Se ha demostrado *in vitro* en células de la granulosa humanas que la IL-1 inhibe la producción de E2 (Barak y col., 1992), probablemente por el aumento de la producción de NO (Tobai y Nishiya, 2001). La IL-1 también podría inhibir la actividad de la aromatasa P450 (Yasuda y col., 1990, Ghersevich y col., 2001), así como otras enzimas implicadas en la síntesis de E2 (Hurwitz y col., 1991,

Ghersevich y col., 2001). Baratta y col. (1996) observaron un resultado similar en estudios desarrollados en bovinos. En células de la granulosa de rata, Gottschall y col. (1989) y Zhou y Galway (1991) han demostrado una inhibición dosis-dependiente de IL-1 β en la producción de estrógenos dependiente de FSH. Puede asumirse la hipótesis que existe un efecto de la IL-1 β sobre el receptor de FSH, ya que en el ovario de rata la IL-1 β disminuye la cantidad de receptores para esta gonadotropina (Gottschall y col., 1987, 1988, Kasson y Gorospe, 1989).

1.3.2.2. IL-4

La IL-4 se clasifica generalmente como una citoquina antiinflamatoria, dependiendo del tejido y tipo de estímulos, pero puede tener efectos proinflamatorios o antiinflamatorios (Woods y Judd, 2008) y ayuda a regular las respuestas inflamatorias (Espey, 1994; Nelms y col., 1999; Sakumoto y col., 2006).

La IL-4 suprime la inflamación cuando interactúa con el receptor IL-4 α (IL-4R α) (Bonder y col., 1998; Mozo y col., 1998; Hart y col., 1999; Espey y col., 2004). Este receptor ha sido detectado en una variedad de células, y está presente en todos los fibroblastos (Doucet y col., 1998), incluyendo los fibroblastos tecales en los folículos durante el proceso ovulatorio (Leo y col., 2001). El papel potencial de la IL-4 en la ovulación está íntimamente asociado con su capacidad para interactuar con IL-4R α y suprimir la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α (Bonder y col., 1998), interrumpiendo así el proceso inflamatorio y por lo tanto la ovulación. Además, se ha reportado que IL-4 inhibe la respuesta inflamatoria en la piel (Hwang y col., 2007) y disminuye las manifestaciones de artritis (Finnegan y col., 2002).

Sumado a esto, experiencias previas demostraron que IL-4 podría estar involucrada en la regulación de la esteroidogénesis en varios tejidos, ya que es capaz de aumentar la expresión de la enzima 3 β -hidroxiesteroidehidrogenasa (3 β -HSD) tipo 1 y tipo 2, las cuales están involucradas en el metabolismo de hormonas esteroides (Simard y col., 2005). Particularmente en células ováricas, IL-4 aumenta la expresión de 3 β -HSD tipo 2, la cual interviene en la síntesis de hormonas esteroides, aumentando de esta manera la liberación de progesterona (Hashii y col., 1998) y dejando en evidencia otra vía de acción directa sobre el ovario. Las células luteales cultivadas obtenidas de mujeres embarazadas producen IL-4, que estimula la secreción de progesterona (Hashii y col., 1998). Ha sido demostrado que el ARNm del receptor IL-4 (IL-4R) se expresa en ovario de rata (Leo y col., 2001). Por otro lado, la IL-

4 inhibe la secreción de estrógenos por las células lúteas porcinas, aunque no altera significativamente la secreción de progesterona (Sakumoto y col., 2006).

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

Papacleovoulou y col. (2009), demostraron que además de la función de la IL-4 en el mantenimiento de la biodisponibilidad de la progesterona en las células del epitelio de la superficie ovárica. A su vez, IL-4 también es esencial para la regulación de la expresión del ARNm de COX-2 y LOX, genes esenciales para la degradación y deposición de matriz extracelular (Papacleovoulou y col., 2011). En presencia de IL-1 α , IL4 atenuó los niveles de expresión de ARNm de COX-2 inducidos por IL-1 α aproximadamente dos veces, sugiriendo que IL-4 inhibe la síntesis de prostaglandinas durante la reparación post-ovulatoria, aliviando la degradación del tejido conectivo. Al mismo tiempo, la IL-4 indujo masivamente la expresión de 3 β -HSD a nivel de ARNm y proteico como así también su actividad y, por lo tanto, la capacidad de biosíntesis local de progesterona (Papacleovoulou y col., 2009).

La IL-4, un modulador crucial del sistema inmune y un agente antitumoral activo, es también un potente inhibidor de la angiogénesis *in vivo* al ser administrado local o sistémicamente (Volpert y col., 1998).

1.3.2.3. IL-6

IL-6, una citoquina multifuncional, representa un enlace fisiológico entre el sistema endocrino y el sistema inmunológico y es un modulador de la función ovárica (Buyalos y col., 1992; Alpizar y Spicer, 1993; Gorospe y Spangelo, 1993).

Inicialmente la IL-6 fue caracterizada por su capacidad para promover la expansión de la población y la activación de las células T, la diferenciación de las células B y la regulación de la respuesta de fase aguda (Klimpel, 1980; Yoshizaki y col., 1984; Woloski y Fuller, 1985; Hirano y col., 1985, 1986, Yasukawa y col., 1987; Andus y col., 1987; Hirano, 2014; Hunter y Jones, 2015). Actualmente, la IL-6 está clasificada como pleiotrópica, y se considera que tiene propiedades similares a las hormonas que afectan al sistema vascular, el metabolismo de los lípidos, la resistencia a la insulina, las actividades mitocondriales, el sistema neuroendocrino y el comportamiento neuropsicológico (Bethin y col., 2000; McInnes y

Schett, 2007; Jones y col., 2011; Rohleder y col., 2012; Schett y col., 2013; Hodes y col., 2014; Kraakman y col., 2015). Practicamente todas las células estromales y del sistema inmunitario producen IL-6, y mientras que la IL-1 β y el TNF- α son los principales activadores de la expresión de IL-6, otras vías mediadas por los receptores de tipo Toll, prostaglandinas, adipocinas, y otras citoquinas pueden promover la síntesis de IL-6 (Hunter y Jones, 2015). Cabe destacar que IL-6 es producida no sólo por las células del sistema inmunológico, sino también por una variedad de otras células, incluyendo fibroblastos, mastocitos y células endoteliales (Van Snick, 1990) así como también por células de la granulosa, teca y estromales del ovario. La IL-6 es producida por células de granulosa en cultivo de bovino (Alpizar y Spicer, 1994), conejo (Breard y col., 1998) y rata (Gorospe y col., 1992). Además, la IL-6 fue identificada en el LF en humanos y equinos, sugiriendo un papel como regulador local de la función ovárica a través de las células de la granulosa (Alpizar y Spicer, 1993; Machelon y col., 1994a). Además, la IL-6 inhibe la secreción de progesterona por las células de la granulosa de ratas (Gorospe y col., 1992), humanas (Salmassi y col., 2001) y porcinas (Machelon y col., 1994b). Estos hallazgos implican que la IL-6 actúa como un regulador intraovárico (Sakumoto y col., 2006). En este sentido, ha sido demostrado que la IL-6 es producida por las células de la granulosa en los folículos preovulatorios en el momento de la ovulación (Kawasaki y col., 2003).

Además de sus funciones proinflamatorias, se ha confirmado que IL-6 tiene una función antiinflamatoria porque suprime la IL-1 y la síntesis del TNF- α e induce la producción o liberación de antagonistas de IL-1 y TNF- α (Tilg y col., 1994). La IL-6 es una citoquina multifuncional con un amplio espectro de actividades biológicas incluyendo la inducción de proteínas de fase aguda. Su expresión ha sido asociada a la angiogénesis en los folículos en desarrollo. La IL-6 aumenta la permeabilidad vascular y participa en la neovascularización, funciones fundamentales durante la ovulación y formación del CL (Brännström y col., 1994; Nilsson y col., 2005). Se ha sugerido que, en el ovario, la IL-6 actúa potenciando la esteroidogénesis. Esta interleuquina es un potente inductor de cininógeno T que se incrementa durante la ovulación, atribuyéndole una función reguladora de la localización y grado de proteólisis durante este proceso (Brännström y col., 1994). Sakumoto y col. (2006) demostraron por primera vez, la existencia de ARNm de IL-6 e IL-6R en el CL porcino durante todo el ciclo estral. Además, probaron que la IL-6 inhibe la secreción de progesterona y estrógenos por células lúteas en cultivo.

A menudo IL-6 muestra características similares a las hormonas que afectan los procesos homeostáticos en diversos sistemas, incluyendo el reproductivo (Smolikova y col.,

2012; Rincon, 2012; Hunter y Jones, 2015). IL-6 juega un doble papel en la regulación del desarrollo folicular y la ovulación. Suprime la esteroidogénesis inducida por FSH (Alpizar y Spicer, 1994; Salmassi y col., 2001), y también promueve la expresión del receptor de LH (Imai y col., 2014) y la expansión de los complejos cúmulo-ovocito (Liu y col., 2009). Aunque estudios previos han confirmado que la IL-6 y sus receptores son expresados en las células de la granulosa (Buyalos y col., 1992; Gorospe y col., 1992; Machelon y col., 1994b), los factores que regulan la expresión de IL-6 en los folículos ováricos son aún desconocidos.

La importancia de la señalización de IL-6 se ha observado en cerdos, donde los receptores de IL-6 pueden promover la supervivencia de las células de la granulosa (Maeda y col., 2007). Este mecanismo, que involucra a IL-6 y su receptor soluble (IL-6sR), es un regulador clave del crecimiento folicular y la atresia en humanos (Kawasaki y col., 2003; Field y col., 2014). Yang y col. (2017) demostraron que IL-1 α podría regular la expresión de IL-6 en las células de la granulosa de bovinos *in vitro*. Además, evidenciaron que las vías de señalización implicadas en este proceso de regulación son MAPKs y NF- κ B. La inducción mutua de la expresión de genes es una característica importante de las citoquinas inflamatorias.

1.3.2.4. IL-8

La IL-8, del grupo de las α -quimioquinas, está involucrada en el desarrollo folicular, atresia, ovulación, esteroidogénesis, y función del CL (Garcia-Velasco y Arici, 1998; Bornstein y col., 2004). Además, la IL-8 parece ser esencial para la ovulación inducida por gonadotrofinas en el conejo (Ujioka y col., 1998; Belayet y col., 2000) y está involucrada en la angiogénesis, la proliferación celular y la apoptosis (Koch y col., 1992; Li y col., 2005; Jiemtaweeboon y col., 2011).

La IL-8 es una citoquina quimiotáctica asociada con la ovulación en mamíferos y está también involucrada en el reclutamiento y la activación de los neutrófilos en el ovario. Ha sido detectada en el ovario, en las células de la teca, granulosa, granulosa-luteinizadas, y las células endoteliales vasculares en los seres humanos (Arici y col., 1996; Połec y col., 2009) y conejos (Belayet y col., 2000). A su vez, en humanos, se han encontrado grandes concentraciones de IL-8 en el LF de folículos preovulatorios (Runesson y col., 1996; Chang y col., 1998; Yoshino y col., 2003), y tanto las células del estroma ovárico como las células de la granulosa luteinizadas expresan ARNm para IL-8 (Arici y col., 1996). En consecuencia, un gran número de neutrófilos y macrófagos se infiltran en el folículo preovulatorio en el

momento de la ovulación (Brännström y Norman, 1993; Jiemtaweeboon y col., 2011). En el ovario bovino, la IL-8 se encuentra en el LF durante el desarrollo de los folículos y su concentración aumenta en la medida que estos se desarrollan (Shimizu y col., 2013). Un estudio reciente informó que la IL-8 se expresa en el CL durante todo el ciclo estral en el ovario bovino (Jiemtaweeboon y col., 2011; Shimizu y col., 2013). Las células de la granulosa son capaces de inducir la migración dirigida de los neutrófilos mediante la liberación de esta citoquina (Poteć y col., 2009)

La IL-8 es inducida por la hipoxia, lo que puede influir en la angiogénesis, dado que los folículos ováricos pueden representar un ambiente hipóxico (Yoshino y col., 2003). En línea con esta observación, los modelos de rata han demostrado que la IL-8 puede actuar como un factor angiogénico durante la foliculogénesis tardía (Arici y col., 1996, Goto y col., 2002; Yoshino y col., 2003; Hickey y Simon, 2006). La IL-8 es estimulada por el VEGF en células de la teca bovina, promoviendo la angiogénesis y mejorando el flujo sanguíneo perifolicular y, posiblemente, contribuyendo a la viabilidad de los ovocitos (Murayama y col., 2010; Pancarci y col., 2012).

Junto con la IL-1 β , la IL-8 juega un rol crítico en eventos preovulatorios. Existe evidencia de la participación de IL-8 y su receptor CXCR1 en el desarrollo folicular en bovinos y en eventos como atresia, ovulación, esteroidogénesis y formación del CL (Bornstein y col., 2004; Murayama y col., 2010; Shimizu y col., 2012). En un modelo bovino *in vitro*, IL-8 inhibe la producción de estradiol y estimula la de progesterona en células de la granulosa tratadas con FSH (Shimizu y col., 2012). Este mismo grupo de trabajo demostró que en células de la teca en cultivo la IL-8 estimula la producción de progesterona, pero no de androstenodiona, por lo que considera a esta citoquina asociada con la luteinización de las células foliculares, como son las de la granulosa y teca, antes de la ovulación (Shimizu y col., 2013). Büscher y col. (1999) arribaron a la conclusión de que la IL-8 está involucrada en las interacciones celulares en folículos preovulatorios humanos y cumpliendo una función relevante en el proceso de ovulación.

En numerosos tipos de células, la síntesis de IL-8 es intensamente estimulada por IL-1 y TNF- α (Mukaida y col., 1991). Por otro lado, hormonas y citoquinas con actividad antiinflamatoria como los glucocorticoides, IL-4 y TGF- β inhiben la síntesis de IL-8 (Lotz y col., 1992; Qazi y col., 2011).

1.3.2.5. TNF- α

TNF- α es una citoquina multifuncional que puede ser considerado un modulador paracrino del desarrollo folicular y puede estar implicada en la alteración de las funciones ováricas durante los procesos patológicos (Morrison y Marcinkiewicz, 2002; Gaafar y col. 2014).

TNF- α desempeñaría un papel funcional en la ovulación, induciéndola en el ovario de rata (Brännström y col., 1995) y se ha observado que la inyección intra-folicular del antisuero de TNF- α bloquea la ovulación en el ovario ovino (Gottsch y col., 2000). TNF- α es un mediador de la respuesta inmediata-temprana y puede promover la proliferación de células ováricas y la producción de prostaglandinas (Terranova y Rice, 1997; Bornstein y col., 2004). Hong y col. (2016) demostraron que altas dosis de TNF- α son capaces de estimular la proliferación de las células de la teca interna de porcinos *in vitro*. Además de promover la proliferación de las células ováricas, inhibe la esteroidogénesis en las células ováricas indiferenciadas y estimula la síntesis de progesterona en las diferenciadas (Wang y col., 1992; Terranova y Rice, 1997; Bornstein y col., 2004; Sirotkin, 2011). El TNF- α es reconocido como una citoquina proinflamatoria que media la diferenciación celular, supervivencia, renovación y homeostasis en distintos tejidos (Haider y Knöfler, 2009). Además, activa varias vías intracelulares a través de su unión a dos receptores distintos, TNFR1 y TNFR2 (Aggarwal y col., 2012). El receptor TNFR1 está asociado con la apoptosis celular y el TNFR2 es más versátil pudiendo conducir a procesos apoptóticos o de proliferación de acuerdo al estímulo (Correia-Álvarez y col., 2015b). En general, el mecanismo mediante el cual el TNF- α equilibra la proliferación frente a la apoptosis y su papel en la atresia folicular no está claro (Field y col., 2014). Los estudios inmunohistoquímicos en ovarios de humanos sugieren que el TNF- α se expresa en el ovocito desde la primera etapa, aumentando a medida que el folículo se acerca a la ovulación (Kondo y col., 1995), lo que implica que la respuesta folicular puede ocurrir de una manera dependiente de la concentración local de TNF- α . Las diferencias en la relación de receptores también pueden mediar en la respuesta. La activación de TNFR1 da lugar a citotoxicidad mientras que TNFR2 a proliferación celular (Tartaglia y col., 1991). Otro mecanismo potencial del TNF- α es a través de la inducción del NO, que por sí mismo puede exhibir un efecto dicotómico en la vía de la apoptosis (Brunswig-Spickenheier y Mukhopadhyay, 1997; Rosselli y col., 1998; Matsumi y col., 2000; Brune, 2003). De hecho, el TNF- α induce la actividad de la NOS2, de forma que el NO puede promover la proliferación y / o diferenciación de las células de la granulosa a través de la vía

de señalización del factor de crecimiento epidermal (Hattori y col., 1996). Curiosamente, el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) y sus receptores pro y antiapoptóticos se expresan en células de la granulosa, donde pueden regular la apoptosis de las células de la granulosa y la atresia folicular (Jaaskelainen y col., 2009; Field y col., 2014).

Además, el TNF- α y sus receptores, se encuentran presentes en los folículos en desarrollo en el ovario de diversas especies incluyendo ratas (Marcinkiewicz y col., 1994), ratones (Chen y col., 1993), conejos (Bagavandoss y col., 1990) y humanos (Roby y col., 1990). Silva y col. (2017), determinaron en estudios realizados *in vitro*, que las proteínas del sistema TNF- α se expresan en diferentes etapas del desarrollo de folículos bovinos. A su vez, demostraron que la adición de TNF- α en cultivo reduce la supervivencia de los folículos y aumenta el número de células apoptóticas en el tejido ovárico, mientras que la adición de dexametasona al medio de cultivo mantiene la ultraestructura del folículo en el tejido. Se ha descrito que el TNF- α inhibe la producción de E2 inducida por FSH, insulina o IGF1 en células de la granulosa y también inhibe la producción de androstenediona estimulada por LH en las células de la teca (Sakumoto y Okuda, 2004). Además de modular la esteroidogénesis basal o inducida por gonadotropinas interviene en la secreción proteica en células de la granulosa y la teca *in vitro* (Terranova y Rice, 1997). Por lo tanto, se ha sugerido que el TNF- α participa en la regulación de la función de las células foliculares y por consiguiente, en la ovulación. En bovinos, los máximos niveles de TNF- α han sido detectados en los folículos dominantes. En ovinos, la inyección de anticuerpos anti-TNF luego de la administración de GnRH inhibe la ovulación (Murdoch y col., 1997). Además, se cree que la escisión inducida por plasmina del TNF- α unido a la membrana procedente del endotelio de la teca facilita el proceso de ovulación induciendo la apoptosis localizada en la superficie ovárica-folicular (Murdoch y col., 1999). Por otro lado, el TNF- α también puede regular las MMPs y otras colagenasas, causando remodelación de la matriz extracelular preparando el tejido para la ovulación (Johnson y col., 1999; Yang y col., 2004), un proceso que implica la actividad proteasa local de los macrófagos (Wu y col., 2004; Cerri y col., 2010; Kallis y col., 2011; Quillard y col., 2011; Field y col., 2014). Tanto la IL-1 como el TNF- α inducen la producción de mediadores ovulatorios tales como la progesterona y prostaglandinas, y además, promueven la ovulación en ovarios de ratas perfundidos *in vitro*, apoyando la hipótesis de que dichas citoquinas son importantes reguladores paracrinos del proceso ovulatorio (Bornstein y col., 2004).

1.4. ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA

1.4.1. Definición, clasificación y epidemiología

En base a lo que hemos mencionado, las alteraciones en el proceso inflamatorio asociado a la ovulación y su regulación, podrían ser parte de la patogenia de importantes trastornos reproductivos relacionados con la anovulación, cuya incidencia va en aumento en relación directa a la intensificación de la producción. Dados los intrincados mecanismos que regulan la cascada inflamatoria previamente descritos, que incluyen diferentes grupos de genes asociados con el inicio de la reacción inflamatoria, la degradación proteolítica de la pared del folículo ovárico y la activación local de mecanismos antiinflamatorios que promueven la reparación de la pared folicular luego de la ovulación; pequeñas modificaciones en los mecanismos de transcripción y/o traducción de estos genes, podrían producir importantes alteraciones a nivel de la dinámica folicular normal.

La enfermedad quística ovárica (COD, del inglés: *Cystic Ovarian Disease*) es uno de los desórdenes reproductivos más frecuentes en vacas lecheras, en especial las de alta producción, provocando cuantiosas pérdidas económicas para la producción pecuaria debido al incremento en los intervalos parto-concepción y parto-parto (Silvia y col., 2002; Vanholder y col., 2006; Rizzo y col., 2011). Dicha enfermedad puede afectar desde un 5 hasta un 30% de las vacas del rodeo lechero (Vanholder y col., 2006; Cattaneo y col., 2014, Ortega y col., 2015, 2016). La COD se ha observado con mayor frecuencia en las vacas durante su segunda a quinta lactancia. En consecuencia, las lactancias posteriores tienen un impacto negativo sobre la eficiencia reproductiva en los animales afectados (Cattaneo y col., 2014).

La COD puede definirse como la interrupción de los ciclos estrales normales producida por la persistencia en el ovario de una o más estructuras foliculares anovulatorias que superan los 20 mm de diámetro, por un período mayor a 10 días en ausencia de tejido luteal (Silvia y col., 2002). Por otro lado, Bartolomé y col. (2005), basados en información obtenida a partir de ultrasonografía, palpación rectal y concentración de hormonas, definieron esta condición como folículos anovulatorios únicos o múltiples en uno o ambos ovarios, con un diámetro mayor que el folículo ovulatorio en ausencia de un CL y falta de tonicidad uterina.

Los quistes surgen como resultado de la anovulación de un folículo preovulatorio. En circunstancias normales, la anovulación es seguida por atresia o luteinización, después de lo cual el folículo regresa. En la COD, el folículo evita este proceso, aumentando en tamaño y

persistiendo en el ovario (Ortega y col., 2016). Los diámetros de los quistes foliculares suelen ir desde 2,5 cm a 7,5 cm, pero sobre todo de 2,5 a 3,0 cm (Eyestone y Ax, 1984). Macroscópicamente, los quistes se pueden clasificar en quistes foliculares y luteínicos, que se consideran formas diferentes del mismo trastorno (Opsomer y col., 1996). La determinación de las concentraciones de progesterona en el plasma sanguíneo, leche o grasa de la leche puede ayudar a hacer una distinción entre los dos tipos. Los quistes foliculares secretan cantidades bajas o no secretan progesterona, mientras que los quistes luteínicos claramente secretan progesterona (Garverick, 1997). Los quistes foliculares tienen usualmente una pared delgada y secretan grandes concentraciones de E2. A su vez, según estudios histológicos los quistes foliculares se clasifican en quistes con o sin células de la granulosa (Isobe y Yoshimura, 2007). Durante la cistogénesis, la degeneración inicial de las células de la granulosa es seguida por la degeneración del ovocito y la teca interna (la luteinización de la teca se produce eventualmente), y este hecho conduce a la falla de la ovulación de un folículo antral ovulatorio. Las células de la granulosa experimentan picnosis y cariorrexis y finalmente desaparecen de la cavidad del quiste (Ortega y col., 2016). Las células de la teca interna sufren una picnosis con posterior fibrosis de la pared del quiste. La luteinización de la teca interna, cuando ocurre, varía de pequeñas áreas aisladas a espesas, usualmente localizadas en la base del quiste en la profundidad del ovario (Brown y col., 1982). Incluso, en la primera etapa de persistencia, el espesor de la granulosa disminuye significativamente (Díaz y col., 2015).

1.4.2. Etiología, patogenia y factores predisponentes

La hipótesis más aceptada en la actualidad acerca de la patogenia de la COD involucra un desequilibrio neuroendocrino a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, de esta manera, la causa primaria de la enfermedad podría ser una deficiencia en la onda preovulatoria de LH o un patrón de liberación aberrante de dicha hormona (Peter, 2004; Vanholder y col., 2006). A la falla de la funcionalidad hipotálamo-hipofisaria se le suma un componente intraovárico que ocasiona la disfunción de este órgano. El desarrollo de los quistes foliculares tiene una etiología multifactorial debido a los numerosos factores clínicos, medioambientales y hereditarios que intervienen (Peter, 2004).

Dentro de los factores predisponentes se describen factores generales y específicos. Dentro de los factores generales se encuentran la *herencia* (Kesler y Garverick, 1982; Hooijer y col., 2001); *alta producción de leche* (Bartlett y col., 1986; Laporte y col., 1994; Rajala y

Gröhn, 1998; Hooijer y col., 2001); la *edad*, la tasa de COD aumenta con la edad (Garverick, 1997; Peter, 2004); el *período de lactancia*, la incidencia es mayor entre 40 y 150 días después del parto (Bierschwal, 1966; Romaniuk, 1972) o entre 31 y 60 días y entre 120 y 210 días después del parto (Bartlett y col., 1986; Bartolomé y col., 2005); el *índice de condición corporal* (CC), animales con CC superior a 4 (escala de 0 a 5) suelen presentar quistes con una frecuencia 2,5 veces superior, respecto a aquellas vacas cuya CC es menor o igual a 3 (Salveti y col., 2007a); *estacionalidad*, tiene una distribución variable según la estación del año (Bartlett y col., 1986; Garverick, 1997; López-Gatius y col., 2002; Peter, 2004; Nelson y col., 2010).

Dentro de los factores específicos se describen la *alimentación*, la privación aguda de energía está asociada a la supresión de la liberación pulsátil de LH (Diskin y col., 2003); otras *enfermedades*, incluyendo mastitis clínica, retención de placenta, endometritis, metritis, hipocalcemia y anestro posparto (Kesler y col., 1980; Bosu y Peter, 1987; Nakao y Grünert, 1990; Garverick, 1997; Cattaneo y col., 2014) y por último el *estrés*. El estrés se ha postulado como uno de los factores predisponentes más importantes de la COD (Vanholder y col., 2006; Amweg y col., 2016). Los glucocorticoides (GC) son hormonas inducidas por el estrés y agentes antiinflamatorios que modulan la producción de citoquinas y prostaglandinas en diferentes procesos reproductivos (Amweg y col., 2016). La generación de GCs durante la ovulación ayudaría a limitar el proceso inflamatorio en el ovario (Hillier y Tetsuka, 1998; Andersen, 2002; Michael y col., 2003). Sin embargo, situaciones extremas podrían afectar el mecanismo ovulatorio normal, alterando el ciclo estral y bloqueando la ovulación (Amweg y col., 2017). Se ha demostrado que la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) aumenta la secreción endógena de cortisol, induciendo así la persistencia folicular y la formación de quistes en el ganado (Dobson y col., 2000; Salvetti y col., 2010; Amweg y col., 2013).

1.4.2.1. Disfunción hipotálamo-hipofisaria

El eje hipotalámico-hipofisario-gonadal se encontraría involucrado en el desarrollo de quistes debido a su participación en la regulación de diversas funciones reproductivas (López-Díaz y Bosu, 1992; Garverick, 1997; Zulu y Penny, 1998; Dobson y col., 2000; Ribadu y col., 2000; Peter, 2004). La hipótesis más ampliamente aceptada explicando la formación de un quiste es que la liberación de LH desde el hipotálamo-hipófisis está alterada: la onda LH pre-ovulatoria está ausente, es de insuficiente magnitud o se produce en el momento equivocado durante la maduración del folículo dominante, lo que conduce a la formación de quistes (Day,

1991; López-Díaz y Bosu, 1992; Hamilton y col., 1995; Yoshioka y col., 1996; Díaz y col., 2015) (figura 13). Esta liberación aberrante de LH no parece ser causada por un menor contenido de GnRH del hipotálamo, ni por la reducción del número de receptores de GnRH o contenido de LH en la hipófisis (Brown y col., 1986; Cook y col., 1991; Vanholder y col., 2006). Esta falla en la liberación de LH parece ser causada por una alteración en el mecanismo de retroalimentación positiva de los estrógenos secretados por el folículo preovulatorio, lo cual resultaría en una falla en la liberación de GnRH y por ende de su acción a nivel hipofisario (Vanholder y col., 2006). Las vacas con COD y con niveles elevados de estrógenos endógenos fallan en generar un pico de LH en respuesta a una dosis de E2 exógeno, indicando que se ha perdido la capacidad de responder a la retroalimentación positiva del estradiol sobre el eje hipotálamo-hipofisario (Zaied y col., 1981; Refsal y col., 1988; De Silva y Reeves, 1988). En este sentido, si la onda preovulatoria de GnRH/LH ocurre inoportunamente durante el crecimiento folicular, puede ocasionar la pérdida de sensibilidad del hipotálamo al efecto de retroalimentación positiva del E2, llevando de esta manera a la anovulación y consecuente formación de quistes (Gümen y col., 2002; Gümen y Wiltbank, 2002). En un estudio realizado por Hamilton y col. (1995) se detectó una concentración promedio mayor tanto de LH como de E2 circulantes en las vacas con quistes, al compararlas con vacas con ciclos normales o con recuperación espontánea, no registrándose un pico preovulatorio de LH en las hembras con COD. La secreción aumentada de LH en las hembras bovinas con quistes podría estimular un incremento en el E2 y este incremento podría causar un aumento en la secreción de LH, creando así un efecto cascada que afectaría la respuesta ovárica a la secreción de LH. En otro estudio observaron que al momento del diagnóstico de COD en bovinos, la mayoría de los casos estaban acompañados de concentraciones suprabasales, aunque por debajo de los niveles luteales, de progesterona. Un estudio realizado recientemente mostró que las concentraciones de progesterona se mantenían en niveles intermedios en todos los animales con COD (Probo y col., 2011). Precisamente, el efecto de niveles intermedios de dicha hormona (apenas por encima de los niveles basales pero insuficientes como para inducir la regresión de folículo dominante y el inicio de una nueva onda), sería inhibir la ovulación, bloqueando la oleada de LH y aumentando su frecuencia pulsátil basal. Sin embargo, esta hipersecreción basal de LH no se asociaría a las causas de formación de los quistes sino a su crecimiento y persistencia a lo largo del tiempo (Hatler y col., 2003). En este sentido, algunos autores definen a la persistencia como una etapa en el desarrollo de los quistes (Cook y col., 1990; Hamilton y col., 1995; Ortega y col., 2015).

En resumen, una falta de sensibilidad a la retroalimentación positiva del E2 a nivel del hipotálamo, desencadenaría la falta del pico preovulatorio de LH debido al menor contenido de GnRH en el área preóptica-supraquiasmática, y los elevados niveles de la misma en el tallo hipofisario (eminencia media) desde donde se libera LH de manera tónica. Como consecuencia, los niveles basales de LH durante la fase de crecimiento folicular serían más elevados (mayor frecuencia como resultado de un mayor contenido de GnRH en la eminencia media) y al momento de la ovulación, los niveles de GnRH serían insuficientes en el centro cíclico (área preóptica-supraquiasmática) para inducir el pico preovulatorio de LH desde la hipófisis, conduciendo de esta manera a la formación de quistes. Por otra parte, esos niveles basales persistentemente elevados de LH podrían actuar sobre los receptores de las células de la granulosa, estimulando el desarrollo folicular más allá del tamaño ovulatorio (Vanholder y col., 2006; Salvetti y col., 2007a).

1.4.2.2. Disfunción ovárica/folicular

Una disfunción primaria a nivel del folículo puede alterar el eje hipotálamo-pituitario-ovárico y provocar la formación de COD (Vanholder y col., 2006) (figura 13). El conocimiento de los cambios celulares y moleculares que ocurren en el ovario previo al proceso de anovulación aún es escaso. En este sentido, nuestro grupo ha descrito alteraciones en la expresión de proteínas del citoesqueleto, en la matriz extracelular y moléculas de adhesión, modificaciones en la proliferación y apoptosis celular tanto en ovarios como en otros órganos, producción aberrante de factores de crecimiento y cambios en receptores hormonales, enzimas y otras proteínas asociadas (Ortega y col., 2007; 2008; 2009; Salvetti y col., 2007b, 2010, 2012; Rey y col. 2010; Velázquez y col., 2010, 2013; Rodríguez y col., 2011, 2013, 2015; Alfaro y col., 2012; Amweg y col., 2013; Matiller y col., 2014; Stangaferro y col., 2014; Hein y col., 2015; Díaz y col., 2016a; Peralta y col., 2017). Además, recientemente hemos efectuado la primera publicación sobre la expresión de receptores de melanocortinas y la respuesta directa del ovario bovino a la acción de la ACTH, lo que plantea una nueva vía de acción del estrés sobre la función ovárica (Amweg y col., 2011, 2013, 2016, 2017). Sin embargo, sigue siendo necesario aumentar el conocimiento en lo que respecta a la falla ovárica a nivel celular y molecular durante el proceso de formación de quistes, validando o ampliando lo que fue descubierto a través de estudios sobre quistes ya formados.

Variaciones en la expresión y en el número de receptores de hormonas hipotálamo-hipofisarias así como de hormonas esteroides parecen estar implicados en la anovulación de un folículo dominante. En primer lugar, las alteraciones en la expresión de los receptores de LH y FSH podrían ser uno de los factores involucrados (Vanholder y col., 2006; Marelli y col., 2014).

Los receptores de estrógenos y de progesterona podrían estar involucrados en los mecanismos que llevan a la anovulación. Un balance inapropiado de los receptores de estrógeno α y β por ejemplo, dadas las diferencias en afinidad por el E2 de cada uno de ellos o la capacidad de formar heterodímeros y actuar de manera diferente a nivel nuclear, puede causar modificaciones en el desarrollo folicular normal (Odore y col., 1999; Salvetti y col., 2007b; Alfaro y col., 2012; Salvetti y col., 2012). Un evento importante en las células que componen el folículo quístico es la expresión de los genes responsables de la proliferación, apoptosis y diferenciación celular, los cuales probablemente estén involucrados en la anovulación y en el proceso de formación y mantenimiento de los quistes (Peter y Dhanasekaran, 2003; Salvetti y col., 2004, 2009, 2010; Isobe y Yoshimura, 2007; Ortega y col., 2007). Al respecto, diversos investigadores sugieren que el proceso apoptótico está involucrado en los mecanismos que llevan a la anovulación. La falta de ocurrencia de dicho proceso en células de la granulosa podrían contribuir a la formación y persistencia de dicha estructura anovulatoria (Isobe y Yoshimura, 2000 a,b; Salvetti y col., 2010).

El eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, a través del mecanismo de estrés, también puede afectar la función ovárica y contribuir con la formación de quistes (Baravalle y col. 2007; Amweg y col., 2011). De la misma forma y considerando que la ovulación es un evento inflamatorio caracterizado por un incremento en la síntesis de interleuquinas y prostaglandinas (Espey, 1980; Ando y col., 1998), un aumento en la producción de GCs antiinflamatorios durante la ovulación, en respuesta a situaciones de estrés, podría limitar este proceso inflamatorio en el ovario (Hillier y Tetsuka, 1998; Michael y col., 2003; Acosta y col., 2005). Los GCs como el cortisol y la corticosterona son importantes hormonas esteroides con diferentes funciones en el metabolismo, el desarrollo, la diferenciación celular, la respuesta inmune y la reproducción. En respuesta al estrés fisiológico e inmunológico, la ACTH actúa sobre la glándula suprarrenal al estimular la síntesis y secreción de glucocorticoides (Amweg y col., 2017). Mediante estudios *in vitro* en pared folicular se demostró recientemente que las células ováricas expresan receptores para melanocortinas. Dentro del grupo de las melanocortinas se encuentra la ACTH, hormona sintetizada en

condiciones de estrés, lo que podría fundamentar un efecto directo del estrés sobre la funcionalidad ovárica sin involucrar la adrenal (Amweg y col., 2011).

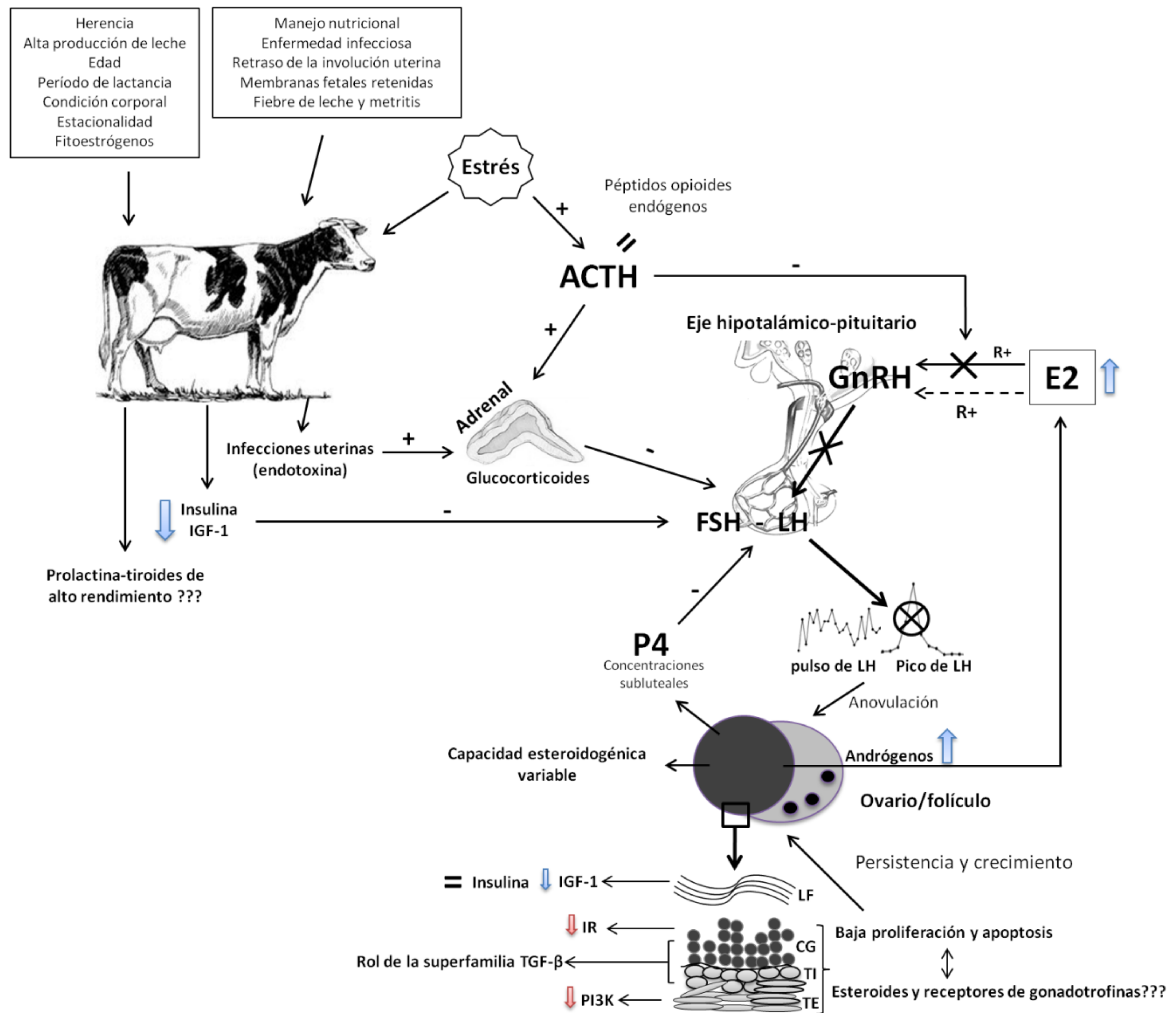


Figura 13: Representación esquemática de la etiopatogenia multifactorial y posibles vías involucradas en la enfermedad quística ovárica bovina. En el esquema se indicaron factores que alteran los mecanismos de respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Estresores, concentraciones subluetales de progesterona, modificación en el mecanismo de retroalimentación del estradiol y cambios importantes en el ovario (factores de crecimiento, gonadotropinas y receptores de esteroides, señalización de la vía de la insulina, proliferación y mecanismo apoptótico) pueden modificar los patrones fisiológicos de liberación de hormonas en el hipotálamo (GnRH) y la hipófisis (FSH y LH), conduciendo al fallo ovulatorio, persistencia folicular y formación de quistes. Signo más (+): efecto estimulante. Signo menos (-): efecto inhibitorio. Flechas azules hacia arriba: alta concentración. Flechas azules hacia abajo: baja concentración. Flechas rojas hacia abajo: expresión reducida. Flecha discontinuas: modificaciones inducidas. R +: retroalimentación positiva. GC: células de la granulosa. TI: células de la teca interna. TE: células de la teca externa. LF: líquido folicular. IR: receptor de insulina. PI3K: fosfatidilinositol - 3 - quinasa. TGF-β: factor de crecimiento transformante beta. IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina-1. P4: progesterona. E2: estradiol. LH: hormona luteinizante. FSH: hormona foliculo estimulante. GnRH: hormona liberadora de gonadotropina. (Adaptado de Ortega y col., 2016).

Se cree también, que el cortisol producido en condiciones de estrés podría ser almacenado en el LF e inducir cambios notables en la esteroidogénesis y expresión de

receptores de LH a nivel de la pared folicular, que contribuyan al desarrollo de la enfermedad (Moberg, 1991). A su vez, hay evidencia creciente de que los GCs también pueden ser sintetizados por tejidos extra-adrenales. En un estudio realizado se examinó la enzima 11 β -hidroxilasa P450c11 (CYP11B1), implicados en la conversión de 11-desoxicortisol en cortisol, en los diferentes componentes del ovario bovino y se determinó la funcionalidad de CYP11B1 *in vitro*. Este estudio demostró por primera vez la presencia de CYP11B1 en el ovario bovino. Esto confirma que podría haber una síntesis local de GCs en el ovario bovino y, por lo tanto, una respuesta endocrina potencial al estrés a través de estas hormonas. Un aumento en la concentración local de GCs en el ovario podría actuar como un mecanismo protector para controlar los efectos deletéreos de la producción excesiva de mediadores inflamatorios. Además, a través de sus efectos antiinflamatorios, los GCs locales pueden estar involucrados en los mecanismos reguladores relacionados con la ovulación, la esteroidogénesis ovárica y la función lútea (Amweg y col., 2017).

1.5. PERSISTENCIA FOLICULAR

Generalmente se acepta que los quistes se desarrollan a partir de folículos preovulatorios que no ovulan, persisten en el ovario y, por tanto, interfieren con la función ovárica normal (Vanholder y col., 2006; Roth y col., 2012).

Silvia y col. (2002) han propuesto que el defecto primario reside en el hipotálamo, que no logra liberar una oleada de GnRH en respuesta al E2 folicular. Este fallo conduce a una falta de estímulo para que la hipófisis segregue la oleada preovulatoria de LH. Esta insensibilidad hipotalámica al estradiol puede ser debido a las concentraciones intermedias de progesterona comúnmente encontradas en las vacas con COD (Roberson y col., 1989; Cupp y col., 1992; Kojima y col., 1992; Kojima y col., 2003; Hatler y col., 2003, 2008). El estudio de los procesos que conducen a la falla ovulatoria y la persistencia del folículo dominante es la clave para entender la patogénesis de la COD. La principal dificultad para estudiar la COD en el bovino es que la formación del quiste sólo se puede reconocer retrospectivamente después de que el folículo ha sufrido extensos cambios morfológicos y fisiológicos (Roth y col., 2012). Por lo tanto, la predicción del tiempo de formación de la estructura quística a través del desarrollo folicular en modelos experimentales es una oportunidad formidable para comprender su patogénesis (Díaz y col., 2015). En este sentido, numerosos modelos experimentales se han desarrollado para inducir la formación de quistes foliculares (Wiltbank, 1966; Erb y col., 1973; Nadaraja y Hansel; 1976; Liptrap y McNally, 1976; Fathala y col., 1978; Winters y col., 1986; Refsal y col., 1987; Cook y col., 1990; Cook y col., 1991; Hamilton y col., 1995; Carrie're y col., 1995; Kawate y col., 1996; Ortega y col., 2008; Amweg y col., 2013).

La prolongación de la vida útil de los folículos bovinos produce una reducción de la fertilidad luego de la inseminación y de la ovulación (Revah y Butler, 1996). Una alta incidencia de pérdida embrionaria temprana se relaciona con la persistencia de los folículos dominantes. Dicha persistencia del folículo dominante resulta de la incrementada frecuencia pulsátil de la LH cuando existen bajas concentraciones plasmáticas de progesterona (Taft y col., 1996) ya sea naturalmente durante la fase lútea (Folman y col., 1973; Meisterling y Dailey, 1987) o como parte de sincronización de celos (Wishart, 1977; Ahmad y col., 1995). Al parecer, las bajas tasas de preñez se deben a la reanudación prematura de la meiosis en los ovocitos (Mihm y col., 1994; Revah y Butler, 1996), que lleva a la mortalidad embrionaria temprana. Wishart (1977) encontró que el 53% de los embriones fecundados de vacas tratadas

con progesterona durante 21 días tenían escisión retardada a los 3-4 días después de la inseminación.

Durante décadas, los investigadores han tratado de desarrollar con éxito programas para sincronizar el estro en el ganado bovino (Jöchle, 1993). Los tratamientos que incluyen la administración prolongada de progesterona (por más de 7 días) resultan en una buena sincronización pero con baja fertilidad en el primer estro después del tratamiento (Hill y col, 1971; Henricks y col, 1973; Butcher y Pope, 1979; Macmillan y col., 1991; Jöchle, 1993; Savio y col, 1993; Stock y Fortune, 1993; Wehrman y col., 1993). Diversos estudios han mostrado que el tratamiento con progesterona induce la prolongación del desarrollo del folículo dominante (Trimberger y Hansel, 1955; Sirois y Fortune, 1990; Savio y col, 1993). Al finalizar el tratamiento con progesterona, se produce el estro seguido por el aumento de LH y la ovulación del folículo dominante (Sirois y Fortune, 1990; Jöchle, 1993; Savio y col., 1993; Stock y Fortune, 1993; Revah y Butler, 1996). Dado que el CL surge del folículo dominante persistente y produce cantidades normales de progesterona, la infertilidad no se puede atribuir a una incapacidad lútea (Stock y Fortune, 1993). Sin embargo, si se puede atribuir a los efectos del desarrollo folicular prolongado en el ovocito o en el tracto reproductivo. El mantenimiento de los folículos en una prolongada dominancia puede causar una maduración prematura del ovocito, antes del pico de LH (Mihm y col., 1994).

Entre los múltiples factores que intervienen en la etiopatogenia de la COD, recientemente ha sido demostrado que las concentraciones subluteales de progesterona son capaces de inducir un incremento en la frecuencia de los pulsos de LH, inhibiendo el pico preovulatorio de LH y así la ovulación, llevando a la prolongación del crecimiento y en consecuencia persistencia de los folículos dominantes, incrementando el E2 periférico y reduciendo la fertilidad (Bridges y Fortune, 2003).

Las ondas de crecimiento y regresión de los folículos ováricos bovinos se producen sucesivamente en un ambiente rico en progesterona con el folículo dominante de la ola final diferenciándose en folículo preovulatorio, luego de la regresión del CL. Si las concentraciones típicas de progesterona de la fase lútea son mantenidas experimentalmente, el ciclo estral puede extenderse en ondas regulares de crecimiento folicular y atresia continua (Sirois y Fortune, 1990; Stock y Fortune, 1993). Sin embargo, las concentraciones subluteales de progesterona circulantes extienden el ciclo mediante la inducción de un folículo dominante que permanece más tiempo que el normal (persistente). Con insuficiente progesterona para inducir la frecuencia pulsátil de LH, el folículo dominante continúa creciendo, secretando concentraciones cada vez mayores de E2 (Sirois y Fortune, 1990; Shaham-Albalancy, 2000).

En estas condiciones, la fertilidad se encuentra dramáticamente reducida (Stock y Fortune, 1993; Mihm y col., 1994) presentando inconvenientes en los regímenes de sincronización que extienden el estro con una terapia progestágena. Una prolongada exposición a concentraciones subluteales de progesterona induce una prematura luteinización de las células de la granulosa (Bigelow y Fortune, 1998). El incremento en la capacidad secretora de E2 de folículos de dominancia prolongada en un ambiente hormonal de progesterona subluteal puede ser atribuido a un incremento en la masa de tejido esteroideogénico recibiendo una frecuente estimulación de LH. En ausencia de los efectos inhibitorios de las concentraciones de progesterona en una fase lútea normal, los folículos dominantes persistentes desarrollan una mayor masa de teca interna que puede producir niveles mayores de andrógenos tras la frecuente estimulación de LH. Se detecta entonces, una mayor concentración de E2 en el plasma de los animales con este tipo de folículos, en comparación con los niveles encontrados en animales con folículos dominantes normales. El incremento en la capacidad para producir esteroides sugiere que la prematura luteinización en los folículos dominantes persistentes y puede ser un factor involucrado en la disminución de la fertilidad de ovocitos de este tipo de folículos (Bigelow y Fortune, 1998).

Las concentraciones intermedias de progesterona impiden el estímulo del E2, endógeno o exógeno, para desencadenar un pico preovulatorio de LH, pero no suprimen la secreción pulsátil tónica de LH (Roberson y col., 1989; Cupp y col., 1992; Kojima y col., 1992, 2003; Hatler y col., 2008). Tanto las células de la granulosa como de la teca de los folículos de animales que presentan COD conservan altas concentraciones de receptores de LH (Calder y col., 2001), lo que implicaría que la persistencia y el crecimiento de los quistes pueden depender del estímulo de LH (Marelli y col., 2014). Se conoce que los tratamientos que suprimen la frecuencia pulsátil de LH acortan la vida media de los quistes foliculares (Calder y col., 1999; Hatler y col., 2006).

Resumiendo, el proceso de ovulación es inducido por la liberación hipofisaria de un pico de LH e involucra diferentes tipos celulares y cambios precisos en los patrones de expresión génica dentro de esas células, lo que lleva a un proceso similar a una inflamación aguda localizada.

Las citoquinas son los principales efectores de la respuesta inflamatoria en el ovario y cumplen un rol fundamental debido a que influyen sobre la producción de diversos mediadores de la cascada inflamatoria y controlan, a través de los componentes

antiinflamatorios, dicho proceso para evitar una reacción exacerbada que afectaría la viabilidad de las células germinales con las consecuencias esperadas sobre la fertilidad.

En base a los conocimientos actuales, las alteraciones en el proceso inflamatorio asociado a la ovulación y su regulación, podrían ser parte importante de la patogenia de algunos importantes trastornos reproductivos en los cuales se ve afectada la ovulación.

El estudio de los procesos que conducen al fracaso ovulatorio y la persistencia del folículo dominante son claves para comprender la patogenia de la COD. Sin embargo, debido a la imprevisibilidad de la ocurrencia de quistes, es extremadamente difícil y poco práctico estudiar su desarrollo espontáneo. Por lo tanto, el uso de modelos experimentales para el estudio de los primeros eventos de la formación de los quistes foliculares es fundamental para comprender los mecanismos implicados en la patogenia de la enfermedad.

2. OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS GENERAL

Considerando que una de las causas iniciales en la cascada de eventos que conduce a la COD es una alteración en el proceso de ovulación y que la misma ha sido definida como un proceso inflamatorio localizado, planteamos como hipótesis general que las citoquinas asociadas a la ovulación y su regulación, podrían tener un rol importante en la patogenia de la COD en bovinos.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión y localización intraovárica de las principales interleuquinas asociadas a la ovulación y sus receptores, procurando esclarecer su participación en la patogenia de la enfermedad quística ovárica (COD, del inglés: *Cystic Ovarian Disease*) en bovinos.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Estudiar los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en el LF de folículos preovulatorios de vacas control y folículos persistentes de animales provenientes de un modelo experimental.

2) Evaluar los niveles de expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias y sus receptores en las estructuras foliculares de la corteza ovárica de animales con persistencia folicular y controles.

3) Caracterizar la expresión de los genes previamente detallados en muestras provenientes de bovinos con COD espontánea, procurando establecer un patrón de localización asociado con alteraciones reproductivas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES EFECTUADOS CON ANIMALES

Todos los procedimientos que se llevaron a cabo con animales fueron aprobados por el Comité de Ética y Seguridad Institucional de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral de Santa Fe (Protocolo N° 131/12), y se realizaron de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (*Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*. Tercera Edición. Federation of Animal Science Societies, 2010).

3.1.1. COD espontánea

3.1.1.1. Diagnóstico de COD espontánea

Se realizó la identificación de casos de COD espontánea a través de controles reproductivos de rutina en rodeos comerciales de la zona, mediante la cooperación de numerosos profesionales del área de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral. Estos médicos veterinarios nos informaron al primer indicio de alteraciones foliculares compatibles con COD, las cuales verificamos mediante palpación rectal y ultrasonografía (transductor lineal transrectal 5 MHz, Honda HS101V, Japón), teniendo en cuenta para su correcto diagnóstico la definición de COD reportada por Bartolomé y col. (2005) (figura 14).

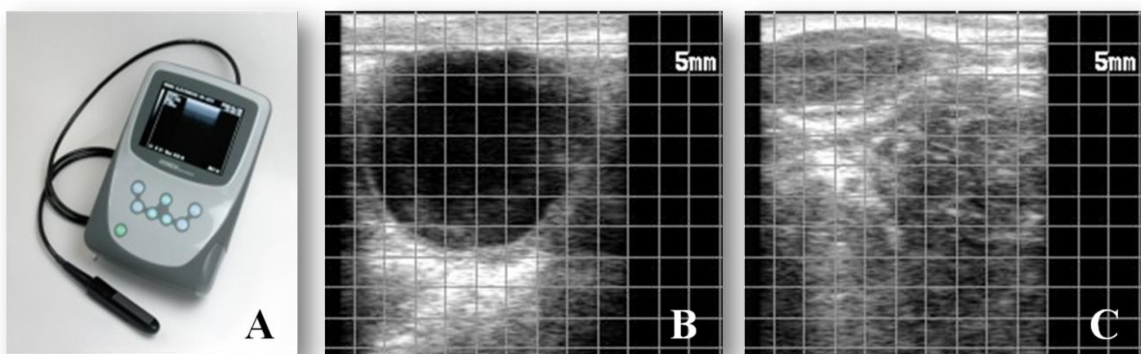


Figura 14: Diagnóstico ecográfico de COD. A: ecógrafo portátil HS101V Honda. B: ovario con un quiste folicular. C: ovario contralateral con escaso desarrollo folicular. En ambos ovarios no se detecta la presencia de CL.

3.1.1.2. Obtención de muestras

A partir del diagnóstico de COD y dependiendo de la categoría de los animales, se tomaron dos tipos de muestras: ovarios enteros (de vacas en lactancia con indicación de rechazo por motivos no reproductivos) o LF (en vacas en lactancia sin indicación de rechazo). La obtención de ovarios enteros se efectuó mediante ovariectomía bilateral, mientras que la obtención de LF se realizó por aspiración folicular guiada por ecografía, utilizando la técnica descrita por Seneda y col. (2003), como se detalla más adelante.

Además, en todos los casos, se tomaron muestras de sangre y se confeccionó una anamnesis completa del animal, recabando datos sobre la alimentación, condiciones climáticas, niveles de producción, manejo e índices reproductivos, para un posterior análisis en trabajos paralelos dentro de nuestro grupo de trabajo. A su vez, se tomaron muestras de animales controles, considerándose tales a vacas que en comparación con el caso de COD, tenían el mismo número de lactancias, la misma edad, se encontraban en el mismo momento de la lactancia (días en lactancia, DEL), pertenecían al mismo lote y no presentaban ningún tipo de enfermedad.

3.1.1.2.1. Aspiración de líquido folicular guiada por ecografía

Para la realización de la aspiración del LF se adaptó la técnica descrita por Seneda y col. (2003) que ha sido ampliamente utilizada para la obtención de muestras para estudios moleculares. Con este fin, se utilizó un sistema de ultrasonido digital Chison 8300Vet equipado con un transductor microconvexo de 5,0 MHz montado en una sonda transvaginal para aspiración folicular (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil). La misma posee una guía para la colocación de una aguja calibre 20G con bisel ecogénico que se conecta por medio de una tubuladura de teflón a tubos contenedores cónicos estériles de 50 ml. Para la aspiración se empleó una bomba de vacío (Watanabe Tecnología Aplicada Ltda., Brasil) a una presión de aspiración de 500 mmHg. El dispositivo de aspiración fue introducido vía vaginal hasta contactar con el fondo de la misma, y el ovario previamente localizado por tacto rectal, fue acercado y fijado al transductor de la sonda. Luego se realizó la introducción de la aguja a través de la pared vaginal y posteriormente a través de la pared folicular para proceder al aspirado del LF. Inmediatamente de recolectada la muestra, se conservó a temperatura de refrigeración (4-6°C) y trasladó al laboratorio para su procesamiento (figura 15).



Figura 15: Procedimiento para la obtención de LF. Una vez realizado el diagnóstico, se procede a la aspiración folicular guiada por ecografía.

3.1.1.2.2. Ovariectomía: Técnica de laparotomía por flanco izquierdo

Confirmado el diagnóstico de COD se llevo a cabo la obtención de los ovarios enteros mediante ovariectomía bilateral por laparotomía (abordaje por flanco izquierdo) (figura 16). La técnica de obtención de los ovarios mediante esta técnica se desarrolló con el animal en pie. En primer lugar se realizó la sedación del animal aplicando por vía subcutánea de 5 ml de una formulación combinada de clorpromazina (5 mg/ml) y difenhidramina (2 mg/ml) (Stresin LA®, Laboratorio Rio de Janeiro) y luego se realizó anestesia local infiltrativa según la técnica de Magda modificada, utilizando 160 ml de clorhidrato de lidocaína (2%) (Lidocaína 2%, Vetue®). Se procedió a realizar una incisión desde dorso-caudal hacia ventro-craneal de la piel del flanco y de los planos musculares que se encuentran por debajo de la misma, de una longitud suficiente para permitir al cirujano un cómodo acceso a cavidad abdominal. Luego se localizaron los ovarios y se colocó una pinza hemostática Kocher modificada *ad hoc* (sin dientes) y se realizó la ligadura del pedículo ovárico por transfixión con hilo no absorbible

simple (lino N°14). Luego se procedió a la sección y extracción de ambos ovarios. A continuación, se realizó la sutura de los planos musculares con hilo de nylon N°50 y puntos simples en “X”, y de la piel con hilo de nylon N°40 realizando una sutura continua de Reverdin (Garnero y Perusia, 2002) (figura 20). Por último, los animales fueron tratados con antibióticos, coagulantes, antiinflamatorios y antiparasitarios externos.



Figura 16: Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje por flanco izquierdo.

3.1.1.2.3. Toma de muestras de sangre

En todos los casos de COD espontánea se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante al momento de la ovariectomía y de la aspiración de LF para la determinación de citoquinas en suero. Se utilizó la técnica de extracción a través de punción de vasos coccígeos (figura 17), para esta maniobra se utilizaron agujas calibre 25 mm x 1,2 mm acopladas a jeringas de 10 ml. Se procedió a punzar aleatoriamente la arteria coccígea media y/o las venas coccígeas medias en la región ventral de los cuerpos de las primeras vertebrae coccígeas.



Figura 17: Técnica de extracción de sangre a través de punción de vasos coccígeos.

3.1.2. Modelo de persistencia folicular

3.1.2.1. Animales

Para el desarrollo del modelo experimental se utilizaron 25 vacas Holando Argentino examinadas antes del comienzo de la experiencia para comprobar la normalidad en su tracto reproductor y regularidad de sus ciclos estrales. La condición corporal de los animales utilizados en el protocolo experimental fue entre 2,75 y 3,50. Las vacas se obtuvieron al final de la lactancia de establecimientos locales y se alojaron en el exterior en un lote abierto, excepto durante la recolección de las muestras de sangre o exámenes de ultrasonografía. La alimentación estuvo basada en alimento balanceado comercial, heno de alfalfa y agua *ad libitum*. Los animales fueron evaluados clínicamente antes y durante el desarrollo del modelo experimental y no mostraron evidencia de enfermedad.

3.1.2.2. Modelo experimental

El desarrollo del protocolo experimental se realizó por triplicado para poder obtener el volumen de muestras necesario para la totalidad de los estudios realizados.

Las hembras bovinas fueron sometidas a la sincronización de sus ciclos estrales antes del comienzo de la experiencia, mediante un protocolo comúnmente denominado G6G-Ovsynch (Pursley y col., 1995; Bello y col., 2006), con algunas modificaciones. El protocolo de sincronización consistió en dos dosis de PGF2 α (150 μ g D + Cloprostenol; Enzaprost DC, Biogénesis-Bagó, Garín, Buenos Aires, Argentina) administradas separadas por 12 horas el día 0 para inducir la luteólisis (Hatler y col., 2008), seguido de una dosis de GnRH (20 μ g 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, las hembras recibieron las dos últimas dosis de PGF2 α , separadas por 12 horas, para inducir la luteólisis (día 15). Después de la sincronización, las vacas se dividieron en los siguientes grupos: control (n = 5), P0 (tiempo esperado de ovulación, n = 5), P5 (5 días de persistencia folicular; n = 5), P10 (10 días de persistencia folicular, n = 5) y P15 (15 días de folicular persistencia; n = 5). Los animales del grupo control no recibieron tratamiento hormonal adicional y dichos animales fueron sometidos a ovariectomía en proestro. Un día después de la última inyección de PGF2 α (día 16), se colocó un dispositivo de progesterona intravaginal (750 mg de progesterona micronizada, Pro-Ciclar P4-Zoovet®, Santa Fe, Argentina), en hembras de los grupos P0, P5, P10 y P15, para obtener concentraciones subluteales de progesterona (1-2 ng/ml) (Bigelow y Fortune, 1998, Díaz y col., 2015). Los dispositivos fueron mantenidos por 8 días momento en el cual fueron reemplazados por otros nuevos. Para evitar cambios bruscos en las concentraciones de progesterona los nuevos dispositivos fueron introducidos un día antes de removido el dispositivo usado. El tiempo esperado de ovulación fue aproximadamente cuatro días posteriores a la administración de la primera dosis de PGF2 α el día 15 del protocolo (rango 101-106 h). El dispositivo intravaginal de progesterona se mantuvo durante tres días hasta el día esperado de la ovulación (101-106 h después de la primera dosis de PGF2 α) en el grupo P0, durante cinco días después del día esperado de ovulación en el grupo P5, durante diez días en el grupo P10 y quince días en el grupo P15. En la figura 18 se esquematizan los diseños de los tratamientos hormonales, el monitoreo y las tomas de muestras vinculados al modelo experimental.

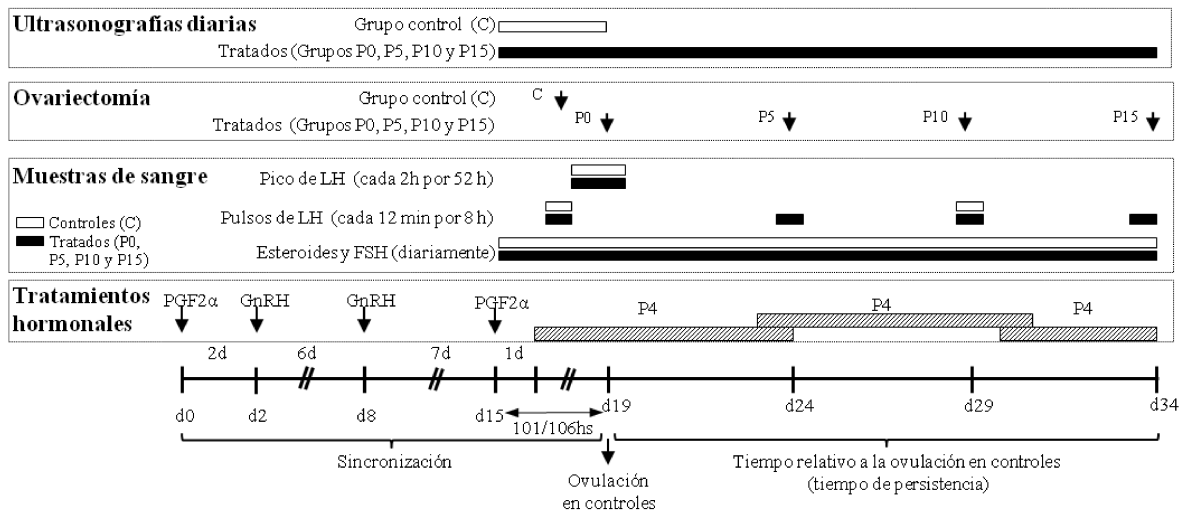


Figura 18: Diseño experimental de los diferentes grupos de estudio. Para inducir persistencia folicular, los ciclos estrales de las vacas fueron sincronizados y luego se aplicó un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona para inducir la persistencia folicular. La dinámica folicular fue monitoreada por ultrasonografía diariamente y los niveles en sangre de hormonas esteroides y gonadotróficas fueron evaluados a los tiempos indicados en los grupos control y tratados. La ovariectomía se realizó en proestro (controles) y después de 0, 5, 10 y 15 días de persistencia folicular.

3.1.2.3. Monitoreo de los cambios ováricos

El desarrollo del modelo experimental fue monitoreado mediante ultrasonografía en todos los animales, utilizando un ecógrafo portátil equipado con un transductor lineal transrectal de 5 MHz HS101V (Honda, Tokio, Japón). Los días de monitoreo del protocolo de sincronización fueron los siguientes: 0, 2, 8 y 15. Además, se realizaron ecografías diarias desde el día de la última administración de PGF2 α hasta la ovulación en los animales controles o hasta los 0, 5, 10 y 15 días de persistencia folicular en los animales tratados (figura 19). Mediante el monitoreo se caracterizaron el tamaño, el crecimiento y la regresión de todos los folículos mayores a 5 mm, incluyendo a los folículos persistentes, así como también los CLs (según corresponda). Los folículos se observaron como estructuras anecoicas presentes permanentemente en la misma posición y ovario.

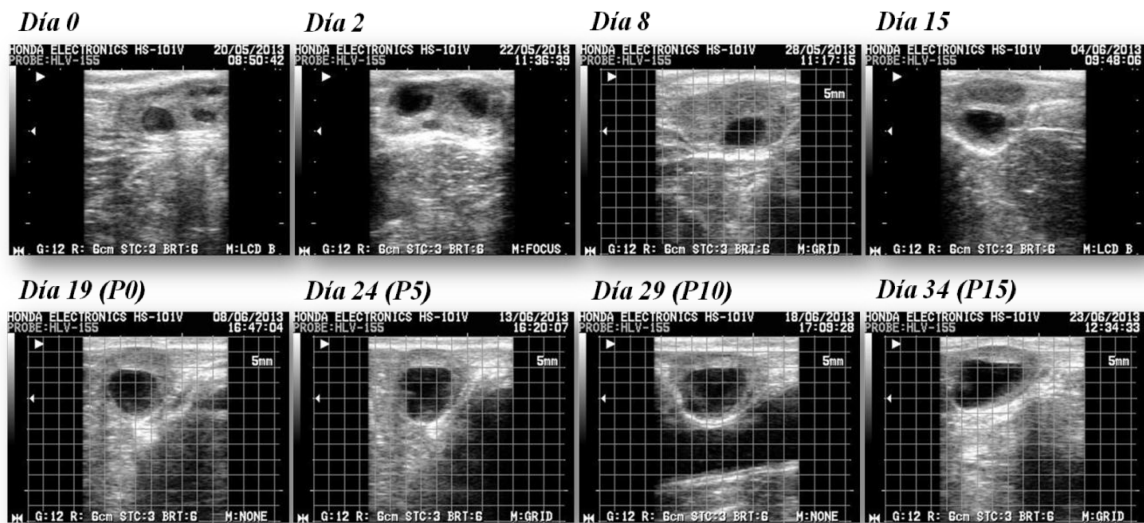


Figura 19: Secuencia de imágenes ecográficas que muestran el seguimiento ultrasonográfico del ovario que desarrolló el folículo persistente de un animal tratado (P15) hasta los 15 días de persistencia.

3.1.2.4. Obtención de muestras

3.1.2.4.1. Aspiración de líquido folicular guiada por ecografía

Previamente a la ovariectomía, para evitar la ruptura de los folículos de interés en el procedimiento quirúrgico, se realizó el aspirado del LF de los animales a los 0 (P0), 5 (P5), 10 (P10) y 15 (P15) días de persistencia folicular y del folículo dominante de los animales del grupo control (C). Para ello, se utilizó la misma técnica de aspiración folicular guiada por ecografía previamente descrita. Después de la aspiración folicular, el LF obtenido fue refrigerado e inmediatamente transportado al laboratorio para su procesamiento.

3.1.2.4.2. Ovariectomía: Técnica por colpotomía

Se utilizaron dos técnicas diferentes para la extracción de los ovarios, en los animales del grupo P0 se realizó la ovariectomía por flanco izquierdo (técnica previamente descrita). En el resto de los grupos del modelo se utilizó la técnica de ovariectomía por colpotomía, a continuación se describe en detalle la técnica. Este procedimiento se llevó a cabo en proestro en los animales controles (día 18 del protocolo), y al final del período de tratamiento para cada grupo tratado, el día esperado para la ovulación (día 19 del protocolo = P0), y los días 5 (día 24 del protocolo = P5), 10 (día 29 del protocolo = P10) y 15 de persistencia (día 34 del

protocolo = P15), puntos de muestreo relativos al momento esperado de ovulación (figura 18). Tanto los ovarios, como las estructuras foliculares de interés fueron medidos y fotografiados.

La técnica de ovariectomía por colpotomía se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Garner y Perussia (2002), la cual pudo realizarse debido a que, al tratarse de hembras pluríparas, el tamaño de los genitales externos (vulva y vagina) era lo suficientemente espacioso como para permitir un cómodo acceso del cirujano, evitando de esta manera cicatrices indeseadas en zonas de valor comercial (flanco izquierdo). En primer lugar se realizó la sedación con 150 mg totales de clorhidrato de ketamina (Ketamina 10%, Alfazan®) y se efectuó anestesia epidural baja con 100 mg totales de clorhidrato de lidocaína (Lidocaína 2%, Vetue®). En segundo lugar, se realizó la limpieza y desinfección del área perineal y de la cavidad vaginal con una solución de cloroxilenol (5 %). Para evitar rupturas de las estructuras foliculares, previo a la ovariectomía se realizó la extracción del LF mediante el sistema de aspiración anteriormente descrito (figura 15). Mediante un tensor de vagina se alejó la pared dorsal de la vagina del recto, posteriormente utilizando un bisturí de hoja oculta se procedió a realizar una pequeña incisión (2 cm) en el fondo de la vagina, incidiendo el techo de la vagina y el peritoneo hasta lograr una abertura que permitió introducir una mano dentro de la cavidad pélvica, se localizaron el útero y los ovarios para retrotraerlos dentro de la cavidad vaginal. A continuación, se colocó una pinza hemostática Kocher modificada *ad hoc* (sin dientes) y se realizó la ligadura del pedículo ovárico por transfijión con hilo no absorbible simple (lino N°14). Luego se procedió a la sección y extracción de ambos ovarios. Por último, los animales fueron tratados con antibióticos, coagulantes, antiinflamatorios y antiparasitarios externos.



Figura 20: Técnica de ovariectomía bilateral a través de abordaje transvaginal (técnica por colpotomía).

3.1.2.4.3. Toma de muestras de sangre

Se realizó la toma de muestras de sangre al momento de la ovariectomía y de la aspiración de LF de los animales a los 0 (P0), 5 (P5), 10 (P10) y 15 (P15) días de persistencia folicular y de los animales del grupo control en proestro (C), para la determinación de hormonas esteroideas y citoquinas en suero.

La obtención de las muestras de sangre de los animales de los grupos experimentales se hizo a través de la colocación en la vena yugular de un catéter endovenoso permanente (figura 21).

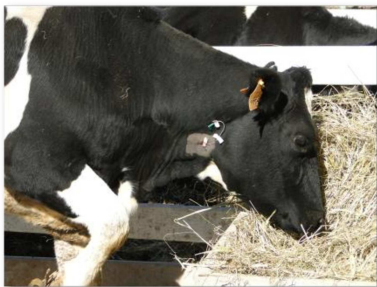


Figura 21: Técnica de extracción de sangre a través de catéter endovenoso.

3.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras derivadas de casos de COD espontánea a campo, del modelo experimental (persistencia folicular) y de los animales controles fueron procesados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET). El esquema de las muestras que arribaron al laboratorio se observa en la figura 22.

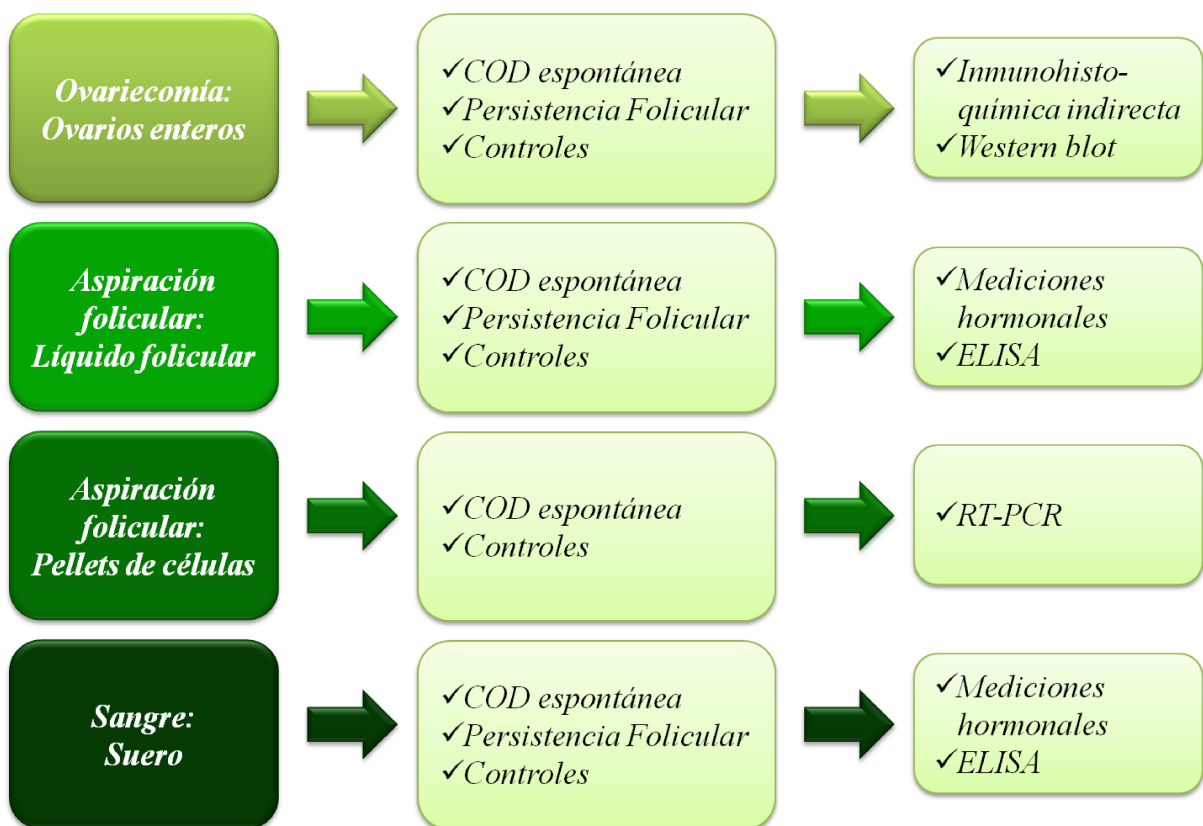


Figura 22: Esquema de la procedencia y destino de las muestras obtenidas.

En el laboratorio, las muestras se procesaron y se almacenaron adecuadamente para su posterior utilización en las distintas técnicas de biología molecular realizadas en esta tesis:

a) *Muestras de sangre:* se mantuvieron a temperatura ambiente (22-25°C) durante 30 min, se colocaron a 4°C durante 1 h y finalmente se centrifugaron a 1000 g durante 10 min. Se separó el suero y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

b) *Ovarios enteros*: Luego de la extracción del LF y pared folicular, los ovarios fueron fijados en formaldehído bufferado (4%) durante 8-12 hs a temperatura ambiente y se procesaron siguiendo protocolos de rutina hasta su inclusión en parafina.

c) *Muestras de pared folicular*: provenientes de quistes foliculares espontáneos, de folículos persistentes, y de folículos dominantes controles (Parrott y Skinner, 1998). Todas estas muestras fueron conservadas a -80 °C hasta su procesamiento (extracción de proteínas para la técnica de western blot).

d) *Muestras de líquido folicular*: obtenidas por aspiración folicular guiada por ecografía de COD espontánea, de folículos persistentes y de folículos dominantes controles, o mediante aspirado con jeringa (1ml) y aguja (25G) en folículos intactos de ovarios enteros obtenidos por ovariectomía (quísticos o controles).

3.2.1. *Procesamiento de las muestras para técnicas histológicas*

Todas las muestras de ovarios enteros fueron procesadas mediante técnicas histológicas de rutina. Luego de la fijación las muestras fueron lavadas en buffer fosfato salino (PBS), reducidas en su tamaño y procesadas siguiendo protocolos histológicos de rutina para efectuar la inclusión en parafina (Salveti y col., 2010).

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

3.2.2. *Procesamiento de las muestras para western blot*

Se tomaron fracciones de aproximadamente 60 mg de pared folicular de folículos antrales grandes de animales controles y de folículos quísticos, que fueron colocadas en buffer RIPA (del inglés: *radioimmunoprecipitation assay buffer*) con inhibidores de proteasas, luego fueron homogeneizadas con un homogeneizador de mano Ultra Turrax®. El sobrenadante se obtuvo luego de centrifugar las muestras a 14.000 g en centrífuga refrigerada durante 20 minutos. Una vez obtenidos los extractos de proteínas se determinó la concentración proteica de cada muestra mediante el método fluorimétrico (Quant-iT Protein Assay Kit, Qubit,

Invitrogen, Nueva York, Estados Unidos). Previamente a las lecturas, se utilizó un patrón de referencia para realizar la curva de calibrado.

3.2.3. *Procesamiento del líquido folicular*

El LF aspirado y transportado en refrigeración al laboratorio, rico en células de la granulosa, de quistes foliculares espontáneos, folículos persistentes y folículos dominantes de los animales control, fue centrifugado por 10 minutos a 2000 g (centrifuga refrigerada IEC Multi RF, Thermo, USA). Así se separó el LF (sobrenadante) del pellet de células foliculares (adherido al fondo del tubo), siendo finalmente ambas muestras conservadas a -80 °C. El destino de las células fue el análisis de ARNm de interés y el LF fue destinado a mediciones hormonales y de citoquinas mediante kits de ELISA comerciales.

3.2.4. *Procesamiento de las muestras para RT-PCR*

3.2.4.1. *Extracción de ARN total*

El total de ARN fue aislado de pellets de células foliculares provenientes de las muestras de LF de los folículos dominantes controles y de quistes foliculares espontáneos, después del tratamiento con el reactivo TRIzol LS (Invitrogen, Life Technology, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

-
- ✓ Se homogeneizaron muestras de aproximadamente 50 mg en 1 mL de reactivo TRIzol LS (Invitrogen) con un homogeneizador de mano UltraTurrax. Para el caso de células se utilizaron 750 µl del reactivo y se homogeneizaron por vórtex (ZX Classic, VELP Científica®).
 - ✓ Se incubó durante 5 min a 25°C.
 - ✓ Se adicionó 400 µl de cloroformo para separar la fase acuosa de la orgánica y se centrifugó a 12000g durante 20 min a 4 °C.
 - ✓ El sobrenadante fue transferido a un eppendorf estéril.
 - ✓ Posteriormente se precipitó el ARN con un volumen equivalente de isopropanol incubando durante toda la noche a -20°C y se separó por centrifugación a 12000g.
 - ✓ El ARN obtenido se lavó con etanol 75% por 10 min a 4°C.
 - ✓ Se resuspendió con agua DEPC precalentada a 60°C.

- ✓ Se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm.
-

La concentración de ARN se obtuvo siguiendo la fórmula detallada a continuación:

Concentración de ARN ($\mu\text{g/ml}$) = Absorbancia 260 nm x 40 $\mu\text{g/ml}$ x 1/dilución

1 unidad de absorbancia a 260 nm = 40 μg ARN/ml

Las muestras obtenidas se almacenaron fraccionadas a -80°C hasta su utilización.

3.2.4.2. Transcripción reversa

Para eliminar posibles contaminaciones del ARN con ADN genómico, se realizó un tratamiento con ADNasa (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las cadenas de ADN copia (ADNc) fueron sintetizadas usando una mezcla de reacción conteniendo MMLV (del inglés: *Moloney Murine Leukemia Virus*) buffer 5X, dithiothreitol (DTT, 100mM), inhibidor de ribonucleasas (40U/ μl , RNaseOUT), retrotranscriptasa (MMLV, 200U), dextrorribonucleótidos trifosfatos (dNTP) y cebadores con secuencia al azar. Se utilizó para ello una cantidad constante de ARN y fueron utilizadas las siguientes condiciones para la transcripción reversa:

-
- ✓ 10 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 ADNasa.
-

Todas las reacciones se llevaron a cabo para un volumen final de 20 μl utilizando un termociclador estándar (TC-3000G, Techne Inc., NJ, USA).

El producto de la reacción, ADNc simple cadena, se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.3. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS EN SUERO Y LÍQUIDO FOLICULAR

Las determinaciones hormonales para COD espontánea fueron realizadas previamente y han sido publicadas por nuestro grupo de trabajo (Amweg y col., 2013).

Para el modelo de persistencia folicular, se determinaron los niveles séricos diarios de gonadotrofinas y de hormonas esteroides, determinaciones realizadas previamente y publicadas por nuestro grupo de trabajo (Díaz y col., 2015; Díaz, 2016b). La concentración de E2 progesterona y testosterona en suero y LF, fue medida por electroquimioluminiscencia inmunoensayo (ECLIA del inglés: *electrochemiluminescence immunoassay*) utilizando kits (Roche Diagnostics GmbH, Germany) en un sistema COBAS e411 (Roche Diagnostics), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 5 pg/ml para estrógenos, 0,03 ng/ml para progesterona y 0,02 ng/ml para testosterona. La concentración de 17-hidroxiprogesterona en suero y LF fue medida por RIA de competición sin extracción comercialmente disponible (Immunotech, Marseille, France) con una sensibilidad de 0,05 ng/ml. Para validar las pruebas de ECLIA y RIA para esteroides, *pools* de LF y suero de vacas ovariectomizadas fueron tratados con carbón para generar muestras libres de esteroides (McNeilly y col., 1991). Diluciones seriadas de estrógenos, testosterona, progesterona y 17-hidroxiprogesterona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) fueron preparadas usando LF o suero libre de esteroides como diluyente. La recuperación de dichos estándares de esteroides que se agregaron a las muestras individuales antes del ensayo estuvo entre el 82% y el 96% para las muestras con alta concentración y entre 79% y 93% para las muestras con baja concentración. El coeficiente de variación intra- e interensayo fue <7 y <6% respectivamente.

3.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS

3.4.1. Inmunohistoquímica indirecta

Cortes histológicos ováricos de animales controles procesados de acuerdo a lo desarrollado en el apartado anterior (3.2.1), con COD espontánea y aquellos provenientes del modelo experimental fueron utilizados para realizar la técnica de inmunohistoquímica indirecta con la finalidad de localizar y cuantificar la expresión proteica de IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI, IL-1RII, IL-4, IL-6, IL-8 y TNF- α , utilizando anticuerpos específicos comerciales, detallados en la tabla 2.

Tabla 2: Anticuerpos primarios, proveedores y condiciones utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.

Tipo y proveedor	Condiciones	Recuperación Antigénica	Tipo de Bloqueo
IL-1α Policlonal (P420A, Endogen)	1/150 Toda la noche a 4°C	-	suero normal de cabra al 10%
IL-1β Monoclonal (MCA1658, Serotec)	1/25 Toda la noche a 25°C	Intensa en microondas	suero normal de cabra al 10%
IL-1RA Policlonal (sc-8481, Santa Cruz)	1/25 Toda la noche a 4°C	Intensa en microondas	suero normal de burro al 10%
IL-1RI Monoclonal (NBP1-50304, Novus Biologicals)	1/100 Toda la noche a 25°C	Proteinasa k	suero normal de cabra al 10%
IL-1RII Policlonal (sc-292522, Santa Cruz)	1/25 Toda la noche a 4°C	-	suero normal de cabra al 10%
IL-4 Policlonal (AF2469, R&D Systems)	1/25 Toda la noche a 4°C	Intensa en microondas	suero normal de burro al 10%
IL-6 Monoclonal (MAB 686, R&D Systems)	1/400 Toda la noche a 4°C	-	suero normal de cabra al 10%
IL-8 Monoclonal (ab34100, Abcam)	1/150 Toda la noche a 4°C	Olla a presión	suero normal de cabra al 10%
TNF-α Policlonal (AHP852Z; Serotec)	1/100 Toda la noche a 4°C	-	suero normal de cabra al 10%

Las inmunodetecciones se realizaron sobre cortes de 4 μ m de espesor, según se detalla a continuación:

- ✓ Se colocaron 10 minutos los cortes en la estufa a 60°C.
- ✓ Desparafinización en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 minutos cada uno.

- ✓ Hidratación en una serie de alcoholes de graduación decreciente, a partir de etanol absoluto (dos pasajes de 2 minutos), etanol 96° (un pasaje de 2 minutos) y finalmente etanol 70° (un pasaje de 2 minutos).
- ✓ Hidratación en PBS pH 7,2 durante 5 minutos.
- ✓ Tratamiento de recuperación antigénica. Se realizaron distintos tipos de tratamiento de acuerdo al anticuerpo primario, detallados en la tabla 1.

Recuperación antigénica:

Intensa en microondas: en horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 800W). Como solución de recuperación se usó buffer citrato 0,01M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en un recipiente de coplin sumergido en un baño con agua, y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación: 5 minutos a 100% de potencia, recarga del coplin con agua destilada, 5 minutos a 100% de potencia, recarga del coplin con agua destilada, 6 minutos al 40%, recarga del coplin con agua destilada, 6 minutos al 40 % y 20 minutos dentro del microondas apagado.

Proteinasa k: Esta recuperación antigénica se realizó luego del bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos en agua destilada. Como solución de recuperación se usó proteinasa K (Dako S3004, North America Inc.) en buffer tris-HCl 50 mM pH 7,5 en una proporción de una gota de proteinasa K cada 2 ml de dicho buffer. Se cubrió el corte con la dilución de la enzima, se incubó durante 3 minutos a 25°C en cámara húmeda, luego se realizaron dos lavados con PBS de 5 minutos.

Olla a presión: Se colocó el coplin con buffer EDTA 1 mM pH 8,0 con 0,05% de Tween y precalentó en una olla a presión durante 20 minutos. Luego se colocaron los preparados en el coplin con el buffer precalentado, cerrando la tapa de la olla correctamente, durante 20 minutos. Finalmente se dejó enfriar 20 minutos dentro de la olla destapada con el fuego apagado.

-
- ✓ Se realizó un lavado en PBS de 5 minutos.
 - ✓ Bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa, sumergiendo 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 a los 10 minutos.
 - ✓ Se realizaron tres lavados en PBS durante 5 minutos.

- ✓ Bloqueo de los sitios de unión no-específicos incubando 15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda con una solución de suero normal de cabra al 10% o suero normal de burro 10%, según corresponda (detallado en la tabla 1).
- ✓ Incubación con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C (en heladera) o 25°C (en estufa), según corresponda, en las diluciones adecuadas para las proteínas a detectar (detallado en la tabla 2) en cámara húmeda. Para los controles de especificidad (controles negativos) se sustituyó el anticuerpo primario por PBS-BSA.
- ✓ Se realizaron dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- ✓ Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado monoclonal o policlonal (según corresponda y en la dilución apropiada), o con el anticuerpo secundario universal del kit Cytoscan HRP Detection System, durante 30 minutos a temperatura ambiente (detallado en la tabla 3) en cámara húmeda.
- ✓ Se realizaron dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- ✓ Incubación con complejo streptavidina (Cytoscan HRP Detection System Cell Marque) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- ✓ Se realizaron tres lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.
- ✓ Revelado de la reacción con 3-3'-diaminobencidina (Kit DAB Plus, Invitrogen). Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y estandarizarlo.
- ✓ Se realizaron dos lavados con agua destilada, de 5 minutos cada uno. Luego se realizó la coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur®), deshidratación y montaje con bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur®) y cubreobjetos apropiados.

Tabla 3: Detalle de los anticuerpos secundarios utilizados y las condiciones de uso en la técnica de inmunohistoquímica.

<i>Anticuerpo Secundario</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Dilución</i>
Goat anti-mouse IgG Biotinilado	Santa Cruz sc-2039	1/100
Goat anti-rabbit IgG Biotinilado	Santa Cruz sc-2040	1/100
Donkey anti-goat IgG Biotinilado	Santa Cruz sc-2042	1/100
Secundario Universal	(Cytoscan-HRP-Detection System-Cell Marque)	Listo para usar

En aquellos ensayos donde se empleó como anticuerpo primario a IL-1 α , IL-1RII, L-6 y TNF- α se realizó una modificación a la técnica de rutina, omitiéndose la recuperación antigénica.

Para la evaluación de IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI, IL-1RII, IL-4, IL-6, IL-8 y TNF- α en los grupos de COD espontánea, persistencia folicular y controles, se digitalizaron imágenes de cada una de las capas de la pared folicular de folículos primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales, atrésicos (en todos los grupos), dominantes (grupo control), folículos persistentes (en los grupos P0, P5, P10 y P15) y folículos quísticos (en el grupo de COD espontánea).

3.4.2. *Western blot*

Esta técnica fue utilizada para la determinación de la especificidad de los anticuerpos utilizados.

Se realizó la electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida, 29:1) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). El tamaño del poro para el gel de resolución se correspondió con una concentración de acrilamida de 10% (IL-1 β e IL-1RA), de 12% (IL-1 α , IL-1RI, IL-1RII, IL-6 y TNF- α) y de 17% (IL-4 e IL-8). Se utilizaron homogeneizados de pared folicular de folículos antrales controles y quísticos (Parrott y Skinner, 1998).

Se prepararon las muestras, procesadas de acuerdo a lo desarrollado en el apartado anterior (3.2.2), diluyendo 1:2 con buffer de muestra en condiciones reductoras para SDS-PAGE, y posteriormente se incubaron en baño termostático a 95°C por 5 minutos. Se utilizó una cuba vertical y el buffer de corrida Tris-Glicina con 0,1 % de SDS, pH 8,3. Según los valores obtenidos de la cuantificación mediante el método fluorimétrico (Quant-iT Protein Assay Kit, Qubit, Invitrogen), se sembraron 40 u 80 μ g de proteínas según el caso (80 μ g para IL-4 e IL-8 y 40 μ g para el resto de los anticuerpos). Luego se realizó la electroforesis a 25 mA para el gel de apilamiento, y se continuó a 50 mA hasta la visualización del frente de corrida en el borde inferior del gel de resolución. El marcador de peso molecular (PM) que se utilizó se detalla en la figura 23. Para la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de las proteínas separadas en el gel, se empleó el buffer de transferencia Towbin modificado, compuesta por Tris-Glicina y 20% de metanol. Dicha transferencia se realizó en frío, a 100V durante 1 hora, condiciones utilizadas para todos los casos. Al término de este periodo se

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



Figura 23: Marcadores de PM para SDS-PAGE, amplio espectro (Rainbow™, RPN800E, GE Healthcare).

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

- ✓ Bloqueo los sitios de unión inespecíficos con tris buffer salino-tween 20 (TBS-T) leche 5%, 5 horas a temperatura ambiente y en agitación.
- ✓ Lavado a temperatura ambiente en agitación (agitador orbital BOECO OS-10, Alemania) con TBS-T:
 - Dos lavados rápidos
 - Cinco lavados de 5 minutos
- ✓ Incubación con el anticuerpo primario (tabla 4) durante toda la noche a 4°C (en heladera). Para la dilución del anticuerpo primario se utilizó TBS-T BSA 2,5%.
- ✓ Lavado a temperatura ambiente con TBS-T:
 - Dos lavados rápidos
 - Cinco lavados de 5 minutos
- ✓ Incubación con el anticuerpo secundario durante una hora y media a temperatura ambiente en agitación. Para la dilución se utilizó TBS-T BSA 2,5%. Los datos y las condiciones de uso de los anticuerpos están descriptos en la tabla 4.

- ✓ Lavado a temperatura ambiente en agitación con TBS-T:
 - Dos lavados rápidos
 - Cinco lavados de 5 minutos
- ✓ Preparación el reactivo quimioluminiscente (ECL Plus, GE Healthcare), incubación del reactivo por 5 min sobre la membrana depositada en un recipiente.
- ✓ Escurrir la membrana y colocarla entre dos hojas de papel celofán.
- ✓ 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).
- ✓ Lavado con agua destilada.
- ✓ Secado de la placa a temperatura ambiente.

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

<i>Anticuerpo</i>	<i>Clon</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Dilución</i>
Primarios			
IL-1 α	Policlonal	Endogen (P420A)	1/50
IL-1 β	Monoclonal	Serotec (MCA1658)	1/50
IL-1RA	Policlonal	Santa Cruz (sc-8481)	1/500
IL-1RI	Monoclonal	Novus Biologicals (NBP1-50304)	1/150
IL-1RII	Policlonal	Santa Cruz (sc-292522)	1/100
IL-4	Polyclonal	R&D Systems (AF2469)	1/100
IL-6	Monoclonal	R&D Systems (MAB 686)	1/50
IL-8	Monoclonal	Abcam (ab34100)	1/50
TNF- α	Policlonal	Serotec (AHP852Z)	1/100
Secundarios			
Goat anti-mouse IgG HRP	Monoclonal	Santa Cruz (sc-2005)	1/6.000
Goat anti-rabbit IgG HRP	Policlonal	Santa Cruz (sc-2004)	1/10.000
Donkey anti-goat IgG HRP	Policlonal	Santa Cruz (sc-2020)	1/20.000

Las diferentes citoquinas fueron identificadas en base a sus diferentes pesos moleculares (tabla 5).

Tabla 5: Peso molecular (PM) de las citoquinas evaluadas.

<i>Anticuerpo</i>	<i>PM</i>
IL-1 α	17 kDa
IL-1 β	17 kDa (forma madura) 35 kDa (pro-IL-1 β)
IL-1RA	22 kDa
IL-1RI	66 kDa
IL-1RII	45 kDa (forma soluble) 68 kDa (de membrana)
IL-4	15 kDa
IL-6	26 kDa
IL-8	11 kDa
TNF- α	17 kDa (forma madura) 26 kDa (pro-proteína)

3.4.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Las concentraciones de IL-1 β , IL-4, IL-6 e IL-8 en suero y LF en todas las vacas se cuantificaron usando kits de ELISA comerciales (IL-1 β bovina, IL-4 bovina, IL-6 bovina, Thermo Scientific Inc., Rockford, USA; IL-8 bovina, LifeSpan BioSciences, Inc., Washington, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Previo a la realización del ensayo, todas las muestras fueron procesadas de acuerdo a lo desarrollado en el apartado anterior (3.2.3). La placa se sensibilizó durante la noche con el anticuerpo de captura y se bloqueó con una solución de BSA 4%, sacarosa 5% en D-PBS. Todas las muestras de LF y suero, provenientes de folículos persistentes (P0, P5, P10 y P15), de folículos dominantes controles y de quistes espontáneos, se utilizaron sin diluir. Se colocaron muestras de LF, suero y patrones por duplicado en los pocillos de la placa y se

incubaron a temperatura ambiente durante una hora (IL-1 β e IL-6) o una hora y media (IL-4). Una placa sensibilizada es provista por el fabricante en el caso de la IL-8, el estándar y las muestras fueron incubadas por dos horas a 37°C. Las muestras se lavaron y se añadió el anticuerpo de detección (anticuerpo conjugado con biotina) y se incubó durante 1 h. Después de lavados apropiados, se añadió estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa y se realizó la incubación durante 30 min. La reacción fue evidenciada mediante el revelado con una solución de TMB como cromógeno, el cual fue incubado durante 20 minutos para IL-1 β , IL-4 e IL-6 y 30 minutos para IL-8. La reacción se detuvo con solución de H₂SO₄ 0,16 M y se realizaron lecturas a 450 nm en un lector de ELISA (Microplate Reader, SPECTROstarNano, BGM / LABTECH, Ortemberg, Alemania). El límite inferior de detección fue de 7,8 pg/ml para IL-1 β e IL-8, 15,6 pg/ml para IL-4 y 19,5 pg/ml para IL-6.

3.4.4. *Análisis digital de imágenes*

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

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

Las placas obtenidas del revelado por quimioluminiscencia fueron escaneadas con un escáner de oficina (EPSON L555) con alta resolución (1200 dpi) y formato JPG.

3.4.5. *Evaluación semicuantitativa de la expresión génica de IL-1 α , IL-6 y TNF- α*

La evaluación de la expresión génica se realizó mediante PCR en tiempo real sobre muestras de células proveniente de los aspirados de LF de quistes espontáneos provenientes de animales con COD y folículos de animales controles.

Como gen de referencia se evaluó la expresión de β -actina, siendo un gen de expresión constitutiva.

3.4.5.1. Cebadores

Basados en secuencias publicadas en Genbank para *Bos taurus* se diseñaron cebadores específicos (*forward* y *reverse*) para amplificar ARNm de *IL-6* y *TNF- α* , utilizando el software Primer-Quest (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Inicio/Índice>). Los cebadores para *IL-1 α* y β -actina fueron descritos por Riollet y col. (2001). La especificidad de los cebadores y productos de amplificación se verificaron *in silico* utilizando el programa BLAST (del inglés: *Basic Local Alignment Search Tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Con el fin de identificar las poblaciones celulares se emplearon cebadores específicos para amplificar las secuencias codificantes de los genes *CYP19A1* (específico de células de la granulosa, correspondiente a la enzima P450arom) y *CYP17A1* (específico de células de la teca, correspondiente a la enzima P450c17), los mismos fueron diseñados por Lagaly y col. (2008). Las secuencias de los distintos cebadores se muestran en la Tabla 6.

3.4.5.2. Procesamiento de ADN copia (ADNc)

La técnica de obtención de ADNc fue descrita en el punto 3.2.4.2. La concentración de ADNc fue obtenida mediante un método fluorimétrico (QubitTM, Invitrogen). Brevemente, se incubó una alícuota de cada muestra de ADNc con las cantidades correspondientes de buffer de reacción y reactivo de color (Invitrogen) a 25°C, y luego se realizó la lectura de la concentración en el equipo Qubit.

3.4.5.3. Análisis de las poblaciones foliculares

Se realizaron reacciones de amplificación por PCR de punto final utilizando los cebadores específicos para *CYP19A1* y *CYP17A1* descritos en la tabla 6, que permiten confirmar las poblaciones celulares en las muestras de COD. A través de esta identificación las muestras pudieron ser clasificadas y sólo fueron destinadas a su análisis aquellas muestras de COD espontánea y controles que fueron positivas para *CYP19A1* (células de la granulosa) y *CYP17A1* (células de la teca).

Las PCR se realizaron en un termociclador TC-3000G (Techne Inc., NJ, USA) de acuerdo a las condiciones estandarizadas para cada par de cebadores. Se incluyeron en ambos casos controles negativos (reemplazando el ADNc por agua DEPC) y positivos (utilizando ADNc de pared folicular completa).

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo 10 ng de ADNc, cebadores (20 µM), 2,5 µl de buffer Taq 10X (50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8,4), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP; y 2 U Taq polimerasa (5 U/µl) (todos los reactivos fueron provistos por Invitrogen).

El programa utilizado incluyó un tiempo inicial de desnaturalización de 3 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de: 45 segundos a 94°C para la desnaturalización del ADNc, 30 segundos a 60,8 °C (para *CYP17A1*) o 55,4 (para *CYP19A1*) para la hibridación de los cebadores y 1 minuto 30 segundos a 72°C para la extensión a partir de los mismos. Un último paso a 72°C durante 10 minutos fue necesario para la extensión final de todos los productos amplificados.

Los productos de todas las PCR fueron sembrados en geles de agarosa al 2% conteniendo solución tamponada TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 0,5 mM EDTA, pH 8,0) y colorante de ácidos nucleicos GelRed 1X (Biotium, CA, USA). Paralelamente a las muestras, se sembró 1 µl del marcador de pares de bases (Ladder 100 pb, PBL Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina) con el objetivo de determinar la correspondencia del producto amplificado con el tamaño esperado. La electroforesis se efectuó a voltaje constante (80 V). Las bandas obtenidas se visualizaron en el gel bajo luz UV de un transiluminador (Labnet, Edison, Estados Unidos).

3.4.5.4. Amplificación mediante PCR en tiempo real

Se utilizó un protocolo de PCR en tiempo real optimizado para analizar la expresión de ARNm de los genes de *IL1-α*, *IL-6* y *TNF-α* utilizando SYBR Green I (Invitrogen) (Pfaffl, 2001) y según la guía de MIQE (Bustin y col. 2009). La cantidad relativa del ARNm de las citoquinas se normalizó a una cantidad constante de ARNm de β-actina como gen de referencia (Robinson y col., 2007). Las PCR se realizaron usando concentraciones definidas de cebadores *forward/reverse* específicos como se detalla en la tabla 6.

Cada reacción de PCR se realizó por duplicado en un volumen total de 20 µl que contenía 4 µl de cDNA (500 ng/ml), 4 µl de buffer de reacción Phire 5X, 0,5 µl de cada 10 mM de cebadores, 0,2 mM dNTPs, 1 µl SYBR Green I (Invitrogen), 0,05 µl Phire Taq

polimerasa (Thermo Fisher Scientific Company, Finlandia) y 14 μ l de agua tratada con DEPC estéril.

Los niveles de los transcritos se midieron por cuantificación relativa en un termociclador en tiempo real StepOne (Applied Biosystems, Life technology, CA, USA) y se analizaron mediante el software REST 2009 V2.0.13 (Pfaffl y col., 2002) que determina la diferencia entre muestras de interés y controles, teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción y la normalización con el gen de referencia (β -actina). Se utilizaron las siguientes condiciones térmicas: 40 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 5 segundos, anillado a 58°C (*IL-1 α*), 56°C (*IL-6*), 62°C (*TNF- α*) y 60°C (β -actina) durante 20 segundos y extensión a 72°C durante 25 segundos. Se realizó un único paso de desnaturalización inicial a 98°C durante 3 min y un paso de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

La eficiencia de las PCR y las cantidades relativas se determinaron a partir de una curva estándar de seis puntos. Las curvas estándar se construyeron a partir de una serie de diluciones de un *pool* de ADNc y la eficiencia de PCR se calculó usando el software StepOne v2.2 (Applied Biosystems).

Los niveles de expresión de ARNm de los genes se registraron según los valores de sus Cts (ciclo umbral, del inglés: *cycle threshold*) valor que corresponde al número de ciclos en los que la señal de fluorescencia podría detectarse por encima de un valor umbral y se calculó usando StepOne v2.2. Se incluyeron controles negativos (agua tratada con DEPC) en todos los ensayos. La pureza del producto se estableció mediante curvas de disociación y las muestras (aleatorias) se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para verificar los tamaños de los productos.

Tabla 6: Pares de cebadores (secuencia de cebadores *forward/reverse*, 5'→3') usados para PCR en tiempo real.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	N° de GenBank	Longitud del Producto	Temperatura de anillado	Referencia
<i>IL-1A</i> Forward	TGCAAGCTATGAGCCACTTC	M37210	291 pb	58°C	Riollet y col., 2001
Reverse	GCATTCCTGGTGGATGACTC				
<i>IL-6</i> Forward	GATGCAGTCTTCAAACGAGTGGGT	X57317.1	163 pb	56°C	Este estudio
Reverse	AGGTTTCTGACCAGAGGAGGGAAT				
<i>TNF-α</i> Forward	GTGCCTCAGCCTCTTCTCCTTCCT	Z14137	187 pb	62°C	Este estudio
Reverse	GTGGGCTACCGGCTTGTTACTTGA				
<i>CYP17A1</i> Forward	GGAGGCGACCATCAGAGAAGTGC	NM_174304	319 pb	60.8°C	Lagaly y col., 2008
Reverse	CAGCCGGGACATGAAGAGGAAGAG				
<i>CYP19A1</i> Forward	TAAAACAAAGCGCCAATCTCTACG	BTCYP19	341 pb	55.4°C	Lagaly y col., 2008
Reverse	GGAACCTGCAGTGGGAAATGA				
<i>β-actina</i> Forward	CGGAACCGCTCATTGCC	BT030480	290 pb	60°C	Riollet y col., 2001
Reverse	ACCCACACTGTGCCCATCTA				

IL: Interleuquina. TNF: Factor de necrosis tumoral. *CYP17A1*: citocromo P450 17hidroxilasa/17,20-liasa. *CYP19A1*: citocromo P450 aromataasa. pb: pares de bases.

3.4.5.5. Análisis de la secuencia nucleotídica

La identidad de los productos de PCR se confirmó mediante secuenciación de ADN usando el servicio de secuenciación de MacroGen Sequencing Service (MacroGen, Korea).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando el software *BioEdit Sequence Alignment Editor* y posteriormente fueron evaluadas, mediante la herramienta BLAST, para verificar los porcentajes de similitud con las secuencias depositadas en GenBank.

3.5. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el programa SPSS 15.0.1 para Windows (Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Las pruebas de homogeneidad de la varianza entre grupos se realizó mediante un test de Levene y la normalidad se verificó por el test de Kolmogorov-Smirnov.

Para el análisis morfométrico, se realizó un análisis de la varianza de los datos aplicando pruebas paramétricas para varios grupos (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan.

Las concentraciones séricas y en LF de E2, progesterona, 17-hidroxiprogesterona y testosterona en los animales controles y tratados al momento de la toma de muestras, fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan.

Para evaluar la expresión proteica mediante inmunohistoquímica, se realizó un análisis de la varianza de los datos aplicando pruebas paramétricas para varios grupos (ANOVA), y como análisis posterior se aplicó el post-test de Duncan. Se analizaron por separado las estructuras foliculares análogas (folículos primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales, atrésicos, persistentes y quísticos) de cada grupo en estudio. También se compararon los quistes espontáneos o folículos persistentes (P0, P5, P10 y P15) con los folículos dominantes del grupo control (como estructuras de referencia). Además, se evaluó el comportamiento de la expresión proteica a lo largo de la foliculogénesis dentro de cada grupo en estudio. La comparación entre dos grupos de muestras se realizó mediante la prueba *t-Student*.

Para evaluar la concentración de citoquinas en LF y suero mediante ELISA, se realizó un análisis mediante ANOVA seguido por el análisis posterior del post-test de Duncan para determinar las diferencias entre los grupos de persistencia folicular y animales controles. Se compararon los niveles en suero y LF dentro de cada grupo usando una prueba *t-Student*. Para los grupos COD y controles los datos se analizaron mediante la prueba *t-Student* para determinar las diferencias entre los grupos y dentro de cada grupo.

Para todos los análisis estadísticos, $p < 0,05$ se consideró significativo. Los valores se expresaron como el promedio \pm el desvío estándar (DE) o como el promedio \pm el error estándar de la media (EEM).

4. *RESULTADOS*

4.1. RESULTADOS DE PROCEDIMIENTOS EFECTUADOS CON ANIMALES

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

Se obtuvieron ovarios con quistes espontáneos de 10 vacas de la raza Holando Argentino ($64,8 \pm 24,9$ meses de edad; $3,3 \pm 1,5$ lactancias) de establecimientos de la zona. Los folículos quísticos obtenidos presentaron un diámetro promedio de 35 ± 6 mm con una morfología compatible a la descrita en la bibliografía (Silvia y col., 2002; Wiltbank y col., 2002; Bartolomé y col., 2005; Vanholder y col., 2006). Esto fue definido mediante diagnóstico ecográfico y tacto rectal. Todas las vacas diagnosticadas con COD a campo presentaban folículos únicos o múltiples, pared folicular menor a 3 mm, ausencia de CL y falta de tono uterino. Microscópicamente también se observaron folículos en varios estadios de desarrollo incluyendo folículos primarios, preantrales pequeños, preantrales grandes, antrales y atrésicos y, en todos los casos, ausencia de tejido luteal activo. Las capas granulosa y teca presentaron células aparentemente sanas, sin procesos degenerativos. La persistencia de los folículos quísticos en estas vacas fue imposible de determinar de manera exacta, pero se estimó en más de 10 días debido a la falta de tono uterino a la palpación rectal (Bartolomé y col., 2005). A nivel microscópico, este hecho quedó reflejado en la morfología de las células de la granulosa, donde algunos quistes presentaron ausencia total o parcial de dicha capa debido al envejecimiento folicular como consecuencia de una persistencia muy prolongada. Cabe aclarar que las evaluaciones histológicas e inmunohistoquímicas se realizaron solamente en los folículos quísticos que presentaban células de la granulosa. Parte de estos resultados han sido publicados previamente (Amweg y col., 2013).

Se obtuvo la siguiente información brindada por el personal de los establecimientos que colaboraron con sus animales en el ensayo: edad, número de lactancias, padre, madre, producción de leche, fecha del último parto, producción de la lactancia anterior, fecha del último celo, condición corporal, enfermedades, fecha de diagnóstico del quiste, época del año, intervalo parto-diagnóstico, hallazgos a la ecografía, tratamiento, respuesta al tratamiento y relación energía/proteína de la dieta. Dichos datos fueron destinados a estudios paralelos a la presente tesis. Por otro lado, pudieron obtenerse muestras de LF de quistes foliculares de animales con COD espontánea de 15 animales y muestras de LF de folículos preovulatorios de 10 animales controles. Estas muestras se destinaron a la evaluación de los perfiles hormonales.

4.1.2. Inducción de folículos persistentes mediante dispositivos de progesterona

Parte de las determinaciones hormonales y la caracterización morfológica de los ovarios provenientes del modelo experimental, fueron presentadas en una tesis anterior (Díaz, 2016b). Durante el protocolo descrito en la sección 3.1.2, fue posible evidenciar el desarrollo de folículos de hasta 15 días de persistencia en el 95% de los animales tratados. Los folículos se observaron mediante ultrasonografía, como estructuras esféricas, uniformes, no ecogénicas, con una pared delgada de ≤ 3 mm de espesor, acompañados de ausencia total de tonicidad uterina (figura 24). Además, se comprobó el crecimiento de estas estructuras hasta un diámetro cercano al del folículo ovulatorio e incluso superior, considerándose éstos como quistes cuando presentaron más de 6 días de persistencia y alcanzaron un diámetro mayor a 20 mm. Asimismo, con el análisis de las imágenes ecográficas se verificó la respuesta al protocolo hormonal, en los animales controles y en los animales de los grupos experimentales de persistencia folicular. En todos los animales, al momento de la última inyección de PGF2 α , se detectó un único folículo dominante. El diámetro promedio de los folículos preovulatorios en los animales controles durante el último examen ultrasonográfico antes de la ovulación fue de 17,6 \pm 0,3 mm. En los animales experimentales el tratamiento con progesterona de larga duración permitió la persistencia de los folículos preovulatorios de 12,6 \pm 3,0 mm de diámetro al inicio del proestro y de 15,6 \pm 1,8 mm de diámetro, 24 h antes del día 0 (momento esperado de ovulación en controles). Estos folículos establecieron su persistencia con un tamaño de 16,3 \pm 3,0 mm en el día 0, llegando a 18,3 \pm 2,1 mm a los 5 días y a 18,0 \pm 3,6 mm el día 10 de persistencia. La inducción exitosa de folículos persistentes fue confirmada, por la ausencia de la ovulación del folículo dominante y el incremento en su diámetro a través de los 15 días del tratamiento con progesterona. Un incremento significativo en el diámetro de los folículos persistentes fue detectado en el día 11 y también en los siguientes días del tratamiento con progesterona. En el día 15 de persistencia (15 días posteriores a la ovulación en controles), el diámetro de los folículos persistentes alcanzó un promedio de 23,0 \pm 0,6 mm (figura 24).

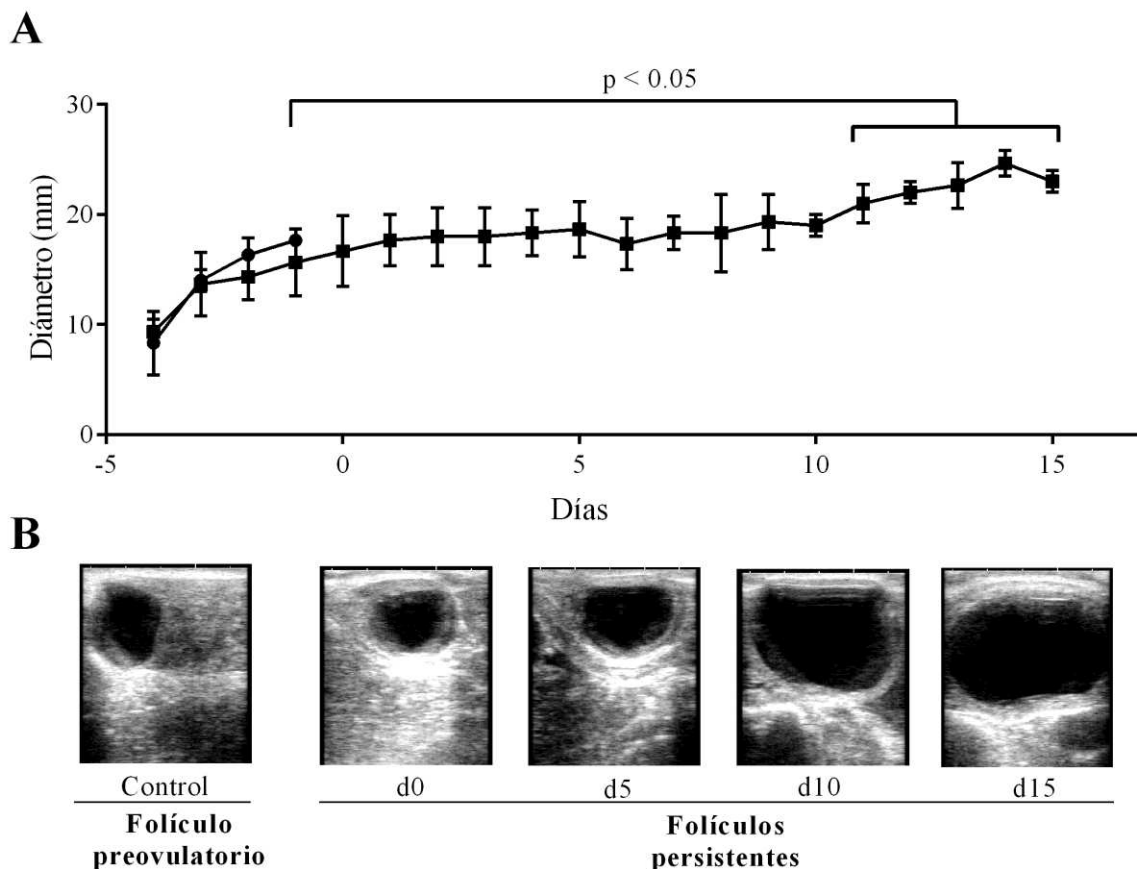


Figura 24: (A) Diámetro máximo de los folículos preovulatorios y persistentes en vacas del grupo control (●) y tratado (■) respectivamente. Media \pm EEM del diámetro folicular interno y diferencias con el correspondiente al folículo preovulatorio en el grupo control. (B). Imágenes ecográficas representativas del folículo preovulatorio y persistentes de 0, 5, 10 y 15 días (Adaptado de Díaz y col., 2015).

Al análisis microscópico de los cortes histológicos de ovarios de los animales controles presentaron folículos normales en todos los estadios de desarrollo y atresia. Los ovarios de las vacas tratadas presentaron estructuras en todos los estadios de crecimiento y desarrollo, incluyendo folículos primordiales, primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales, folículos con diferentes grados de atresia y un único folículo persistente. En los animales tratados, igual que en los controles, el CL estuvo ausente en todos los casos. Todos los folículos persistentes presentaban una capa de células de la granulosa con diferentes grados de conservación, una teca interna muy vascularizada y una teca externa muy rica en colágeno. Microscópicamente, a medida que la persistencia folicular fue progresando, las capas de células de la granulosa mostraron una gran proporción de células con apoptosis y una pérdida de las células cercanas al antrum, las cuales se presentaron frecuentemente separadas de la capa de células de la granulosa, frecuentemente dispersas en la cavidad antral. Sin embargo, una alta proporción de células de la granulosa de la zona basal mantuvieron su integridad y salud. Los pliegues frecuentemente presentes en la pared de este tipo de folículos,

conservaban ambos tipos de células. Además, en algunas áreas de estos folículos, la membrana basal fue poco evidente. Sumado a esto, no se observaron signos de luteinización en las capas de células de la granulosa y teca en ninguno de los folículos persistentes de todos los grupos tratados. Es importante remarcar que el espesor promedio de la capas de células disminuyó con el tiempo de tratamiento, presentándose al día 15 de persistencia menor espesor tanto en la capa de células de la granulosa como de la teca en relación a los folículos preovulatorios controles y persistentes del día 0 de persistencia ($p < 0,05$) (figura 25).

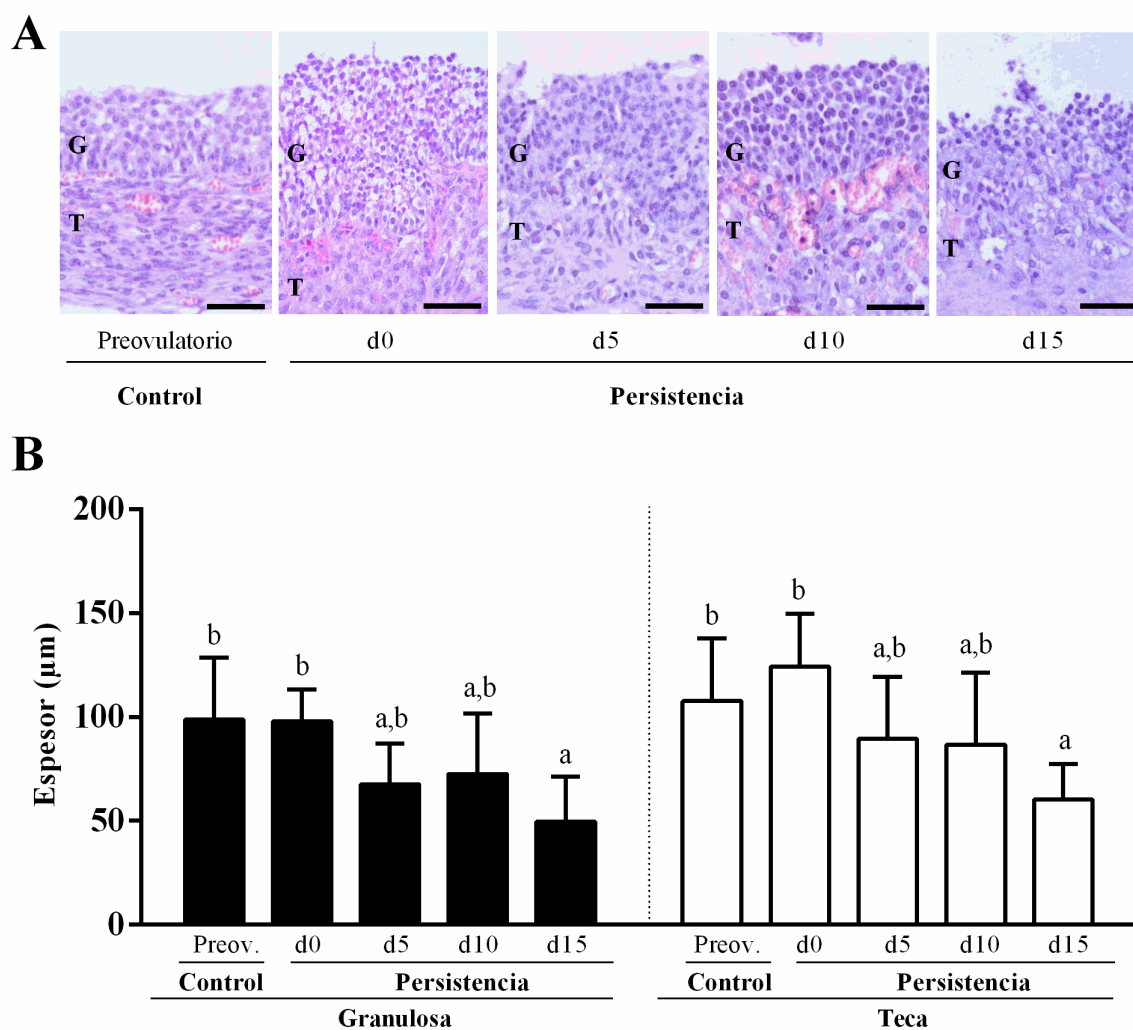


Figura 25: Imágenes microscópicas representativas (A) y análisis histomorfométrico (B) de la pared folicular de los folículos preovulatorios de las vacas control ($n=5$) y folículos con 0, 5, 10 y 15 días de persistencia folicular de vacas tratadas ($n=5$ en cada día). Una disminución en el grosor de las células de la granulosa (G) y de la teca (T) fue observado a los 15 días de persistencia en relación con los folículos preovulatorios ($p < 0,05$). Los valores representan la media \pm EEM. Barras=50 μm (Adaptado de Díaz y col., 2015).

4.1.2.1. Concentración de hormonas esteroides en suero y líquido folicular en animales con folículos persistentes

A continuación, en la figura 26, se esquematiza la concentración de E2, progesterona, 17-hidroxiprogesterona y testosterona en suero y LF obtenido al momento de la ovariectomía de animales control y tratados con progesterona (muestras obtenidas a los 0, 5, 10 y 15 días de persistencia). Los niveles de E2 séricos se incrementaron gradualmente desde el proestro hasta el día 10 de persistencia, para luego reducirse a valores similares a aquellos encontrados en el proestro ($p < 0,05$). Las vacas con 0 y 5 días de persistencia folicular tuvieron una concentración significativamente mayor de progesterona en suero ($p < 0,05$) en comparación a los grupos P10, P15 y controles en proestro. A su vez, la 17-hidroxiprogesterona presentó una reducción significativa a los 5 días de persistencia en relación con el proestro y también con los 0 y 10 días de persistencia ($p < 0,05$), mostrando a los 15 días de persistencia un aumento significativo en sus concentraciones ($p < 0,05$). Los niveles de testosterona mostraron un incremento significativo ($p < 0,05$) desde el proestro hasta el día 15 de persistencia.

Las concentraciones en el LF de E2 fueron relativamente mayores durante la fase folicular y después de 0, 5 y 10 días de persistencia, en comparación a los 15 días de persistencia ($p < 0,05$). Las concentraciones de progesterona fueron mayores en el LF de folículos preovulatorios ($p < 0,05$) que en el de folículos persistentes. Los niveles 17-hidroxiprogesterona se incrementaron progresivamente durante todo el periodo experimental desde la etapa de folículo preovulatorio hasta los 15 días de persistencia ($p < 0,05$), sin observarse diferencias entre el folículo preovulatorio y el día 0 de persistencia. La concentración de testosterona fue relativamente menor en los folículos preovulatorios y se mantuvo baja hasta los 10 días de persistencia, siendo significativamente mayor a los 15 días de persistencia ($p < 0,05$).

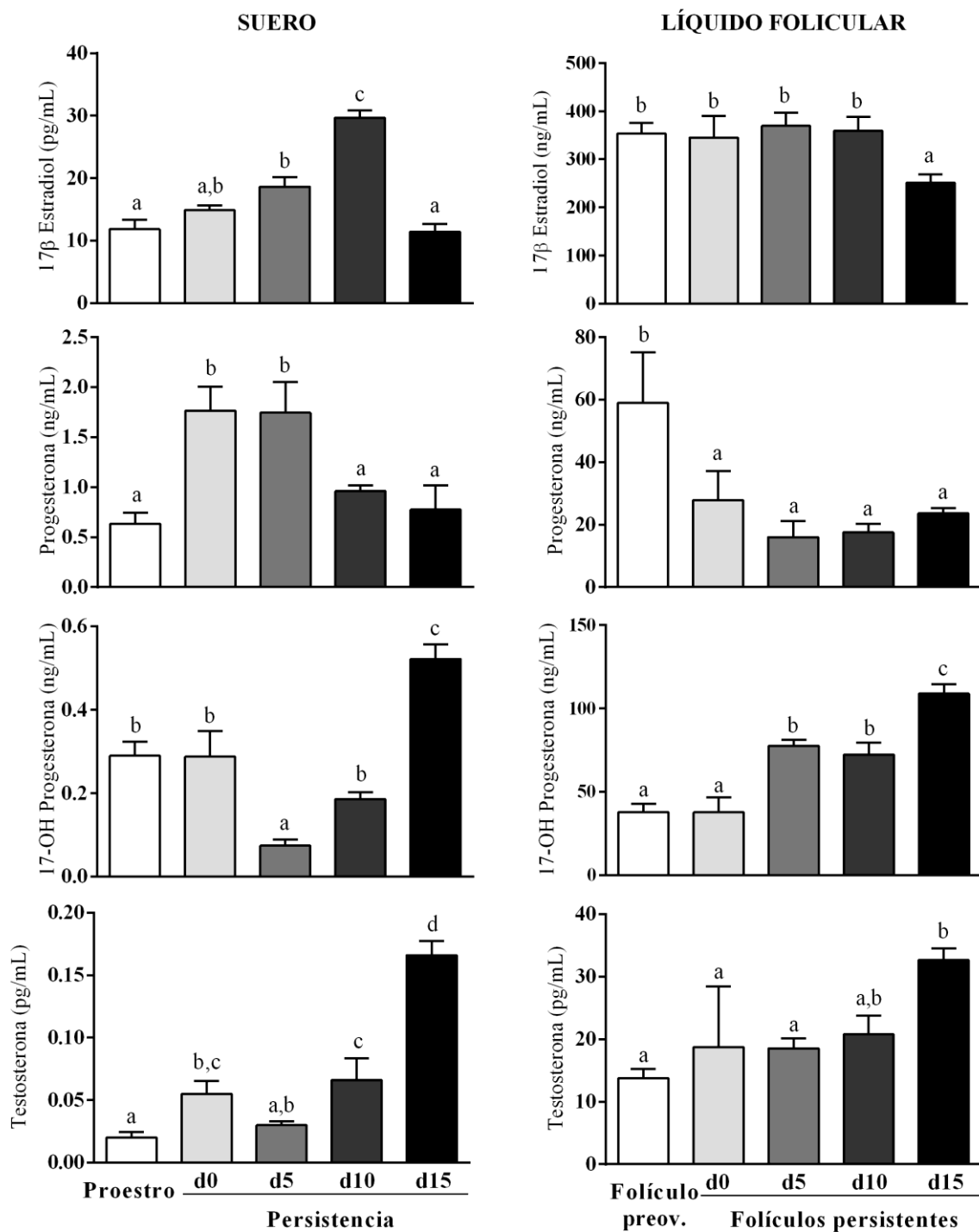


Figura 26: Concentración de hormonas esteroideas en suero y LF en animales con folículos persistentes. Las barras representan las medias \pm EEM para cada hormona en suero o LF. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.2. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE CITOQUINAS EN OVARIOS DE ANIMALES COD ESPONTÁNEA

La expresión génica de *IL-1 α* , *IL-6* y *TNF- α* fue detectada por PCR en tiempo real. Todas las muestras de células foliculares obtenidas por aspiración folicular fueron positivas para el ARNm de *CYP19A1* y *CYP17A1*, confirmando así la presencia de células de la granulosa y teca respectivamente, en todas las muestras analizadas. La identidad de los productos de PCR fue confirmada por secuenciación (rango 97-99% de homología con secuencias de referencia bovina). No se observaron diferencias en la expresión del gen *β -actina* entre los diferentes grupos evaluados ($p > 0,05$).

La expresión proteica de *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-1RA*, *IL-1RI*, *IL-1RII*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8* y *TNF- α* fue detectada y localizada por inmunohistoquímica. Las reacciones fueron negativas en todos los controles negativos. La corroboración de la especificidad de los anticuerpos usados para inmunohistoquímica se realizó mediante western blot. De esta manera se confirmó que los anticuerpos para las citoquinas evaluadas se unieron a específicamente y no generaron reacciones cruzadas, como se muestra en las figuras 32, 37, 43, 48, 53, 58, 65, 71, 78.

4.2.1. *IL-1 α*

4.2.1.1. Expresión génica

IL-1 α se detectó en las células foliculares de los quistes y muestras control. El ARNm de *IL-1 α* sólo fue cuantificable en tres ovarios controles (de un total de quince muestras). Sin embargo, en las muestras cuantificadas, no se observó diferencia significativa entre la expresión de las células de los folículos quísticos y la de los controles (figura 27).

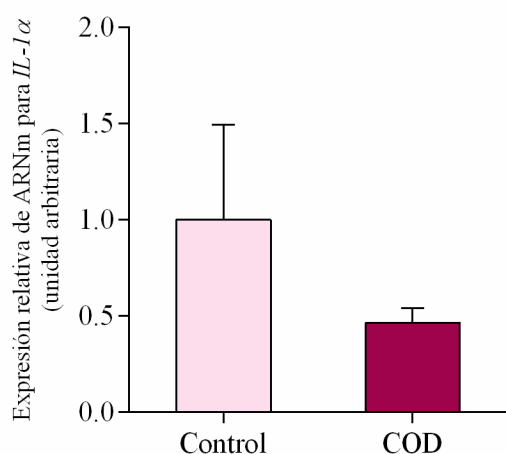


Figura 27: Expresión de ARNm de *IL-1 α* determinado por PCR en tiempo real en células foliculares de casos de COD espontánea en relación a ovarios controles. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.2.1.2. Expresión proteica y localización

La IL-1 α fue localizada por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todos los folículos y grupos analizados. En células de la granulosa del grupo control la expresión fue mayor en los folículos primarios y preantrales en relación a los folículos antrales y atrésicos ($p < 0,05$). Además, en las células de teca, la menor expresión se determinó en folículos preantrales grandes en relación a los folículos antrales ($p < 0,05$), sin diferencias con los folículos atrésicos ($p > 0,05$) (figuras 28 y 32).

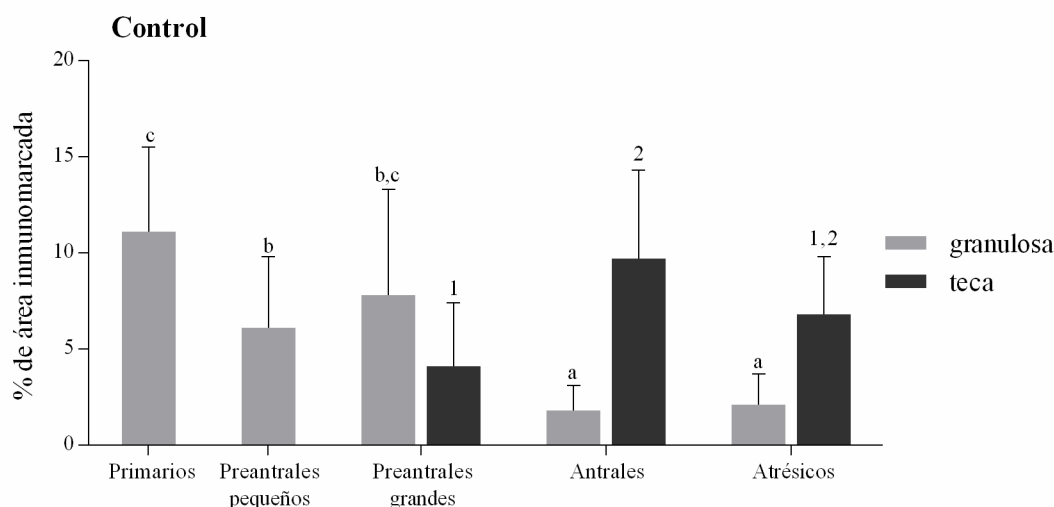


Figura 28: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 α en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) o números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo COD espontánea la expresión fue mayor en células de la granulosa de los folículos primarios, preantrales pequeños y quiste en relación a los folículos antrales y atrésicos ($p < 0,05$). No se observaron diferencias entre las distintas categorías foliculares durante la foliculogénesis a nivel de las células de la teca interna ($p > 0,05$) (figuras 29 y 32).

La comparación entre grupos (control y COD espontánea) no mostró diferencias en la expresión de IL-1 α en células de la granulosa de folículos primarios, preantrales pequeños, preantrales grandes y atrésicos. En los folículos antrales la expresión fue mayor en controles en relación al grupo de COD espontánea. También, se comparó la expresión de IL-1 α en quistes en relación a folículos antrales del grupo control, pudiéndose evidenciar que los quistes espontáneos mostraron mayor expresión con respecto a los folículos antrales del grupo control, tomados como estructuras de referencia (figuras 30 y 32).

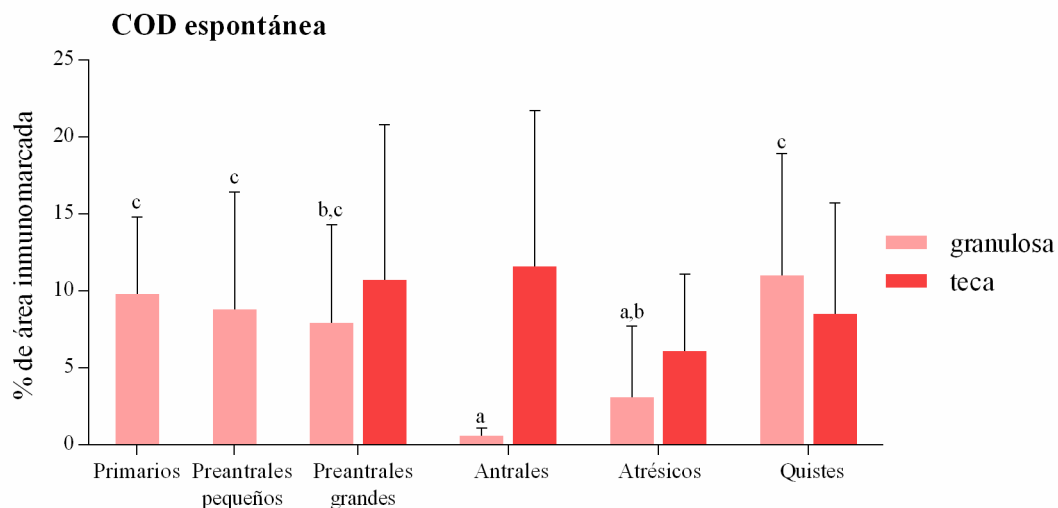


Figura 29: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1 α** en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

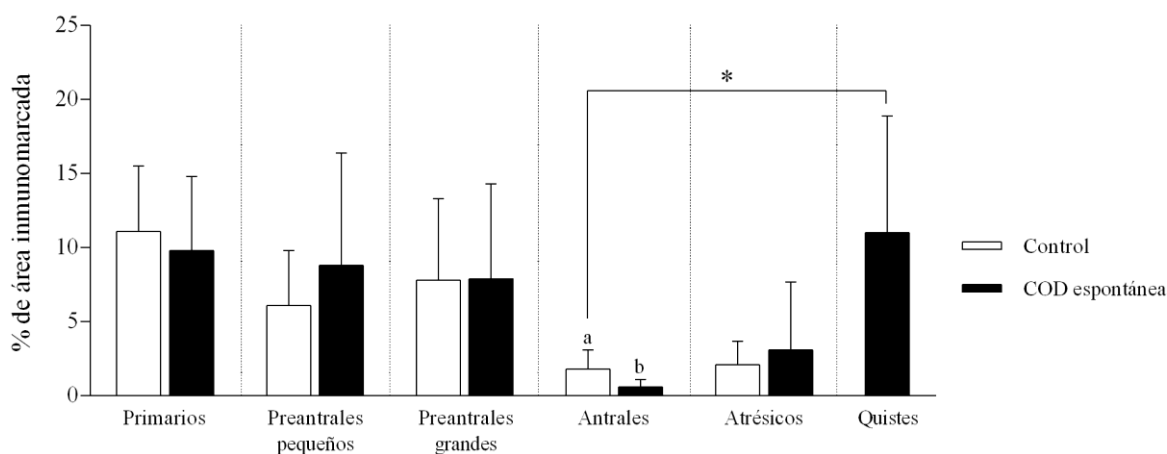


Figura 30: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1 α** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

Los niveles de expresión de **IL-1 α** fueron similares en las células de la teca interna. Además, no se hallaron diferencias cuando se compararon quistes en relación a folículos antrales del grupo control que fueron tomadas como estructuras de referencia ($p > 0,05$) (figuras 31 y 32).

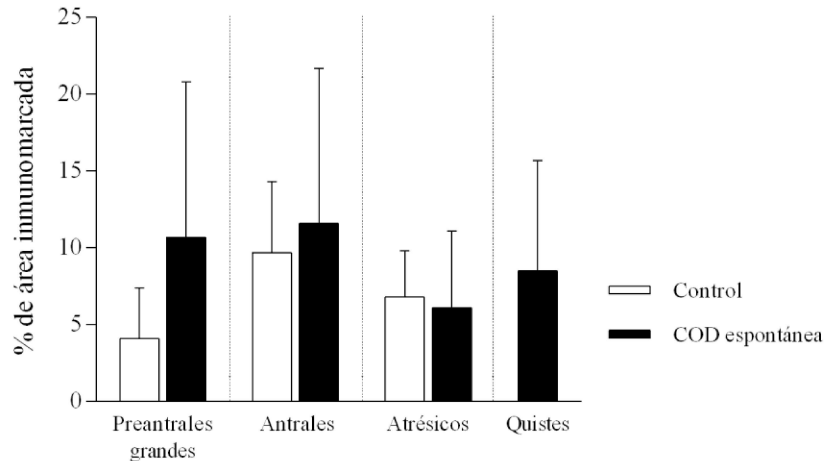


Figura 31: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1 α** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontánea: negro). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

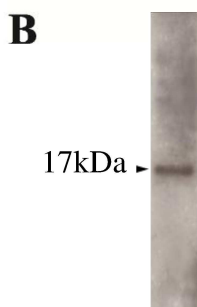
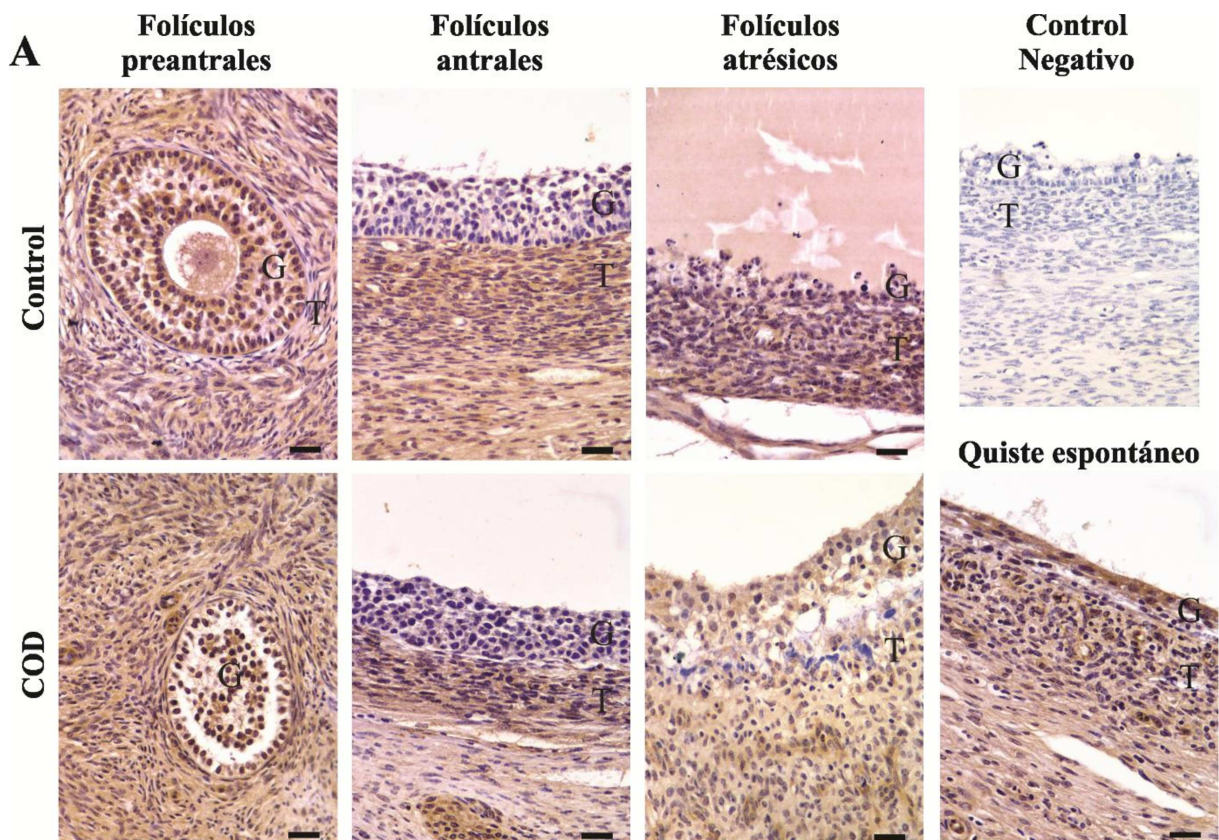


Figura 32: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-1 α** en animales de los grupos control y COD espontánea. Se muestra además un control negativo de la técnica de inmunohistoquímica. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. B. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-1 α (17 kDa).

4.2.2. *IL-1 β* 4.2.2.1. *Expresión proteica y localización*

La IL-1 β fue localizada por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todos los folículos y grupos analizados. Se observó una elevada expresión en las células de la granulosa de todos los grupos evaluados y, por el contrario, se detectó baja expresión en células de teca interna. Al evaluar la expresión proteica a través de la foliculogénesis, tanto en el grupo control como en el grupo COD espontáneo no se encontraron diferencias, a nivel de células de la granulosa ni de la teca (figuras 33, 34 y 37).

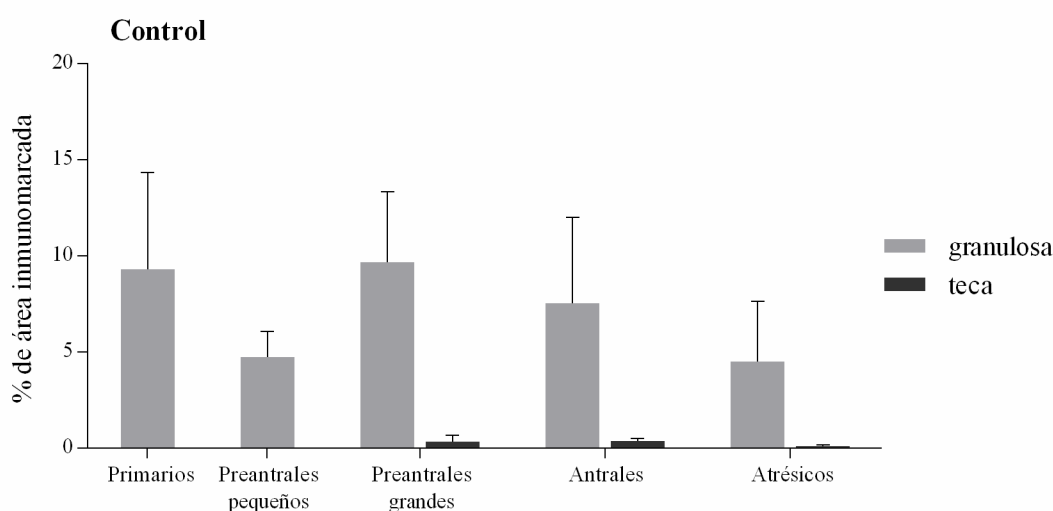


Figura 33: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1 β** en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

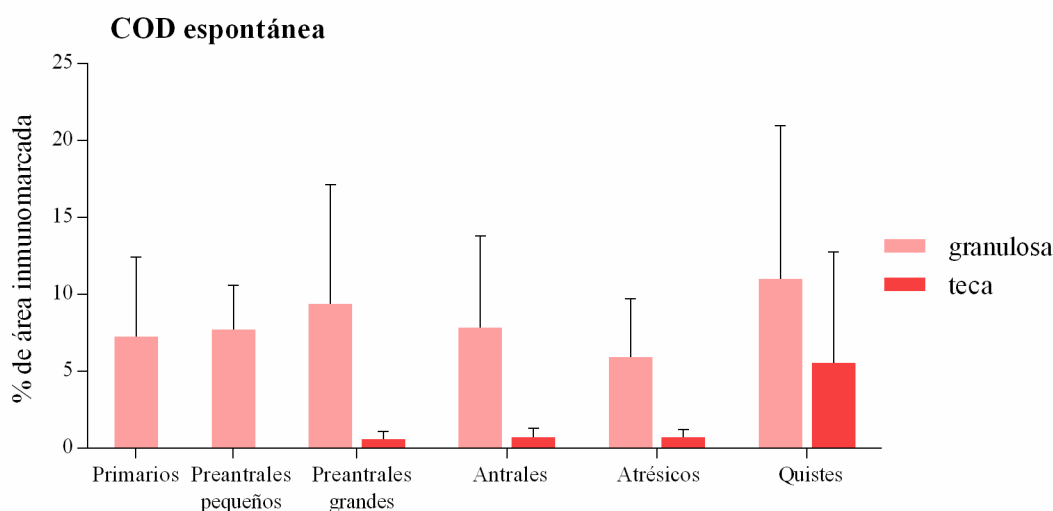


Figura 34: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1 β** en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Cuando cada categoría folicular fue comparada entre los grupos en estudio, se observó que las células de la granulosa del grupo COD espontánea presentaban una mayor expresión en folículos preantrales pequeños que la misma capa de células del grupo control ($p < 0,05$), sin diferencias en las otras categorías foliculares (figuras 35 y 37).

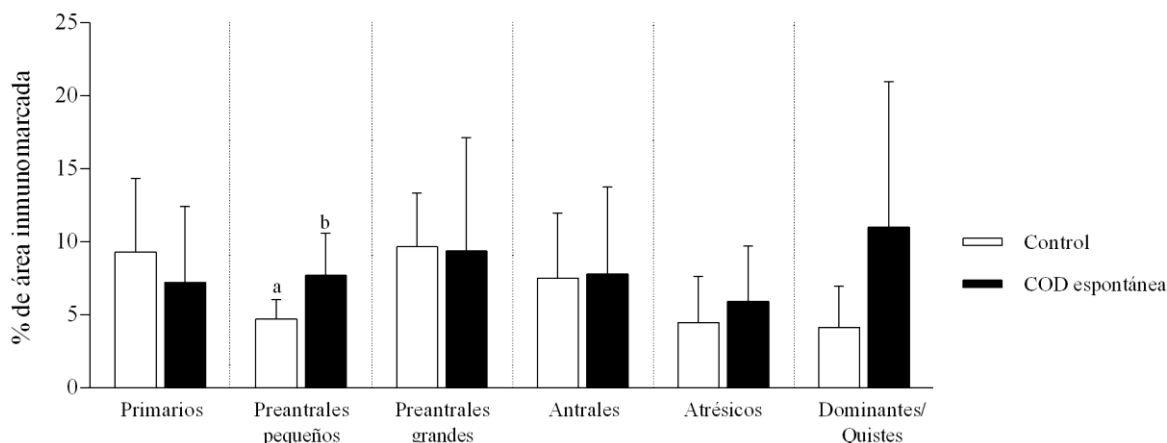


Figura 35: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1 β** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

En las células de la teca interna no se encontraron diferencias significativas tanto a nivel de células de la granulosa como de la teca. Además, no se hallaron diferencias cuando se compararon quistes en relación a folículos antrales del grupo control que fueron tomadas como estructuras de referencia ($p > 0,05$) (figuras 36 y 37).

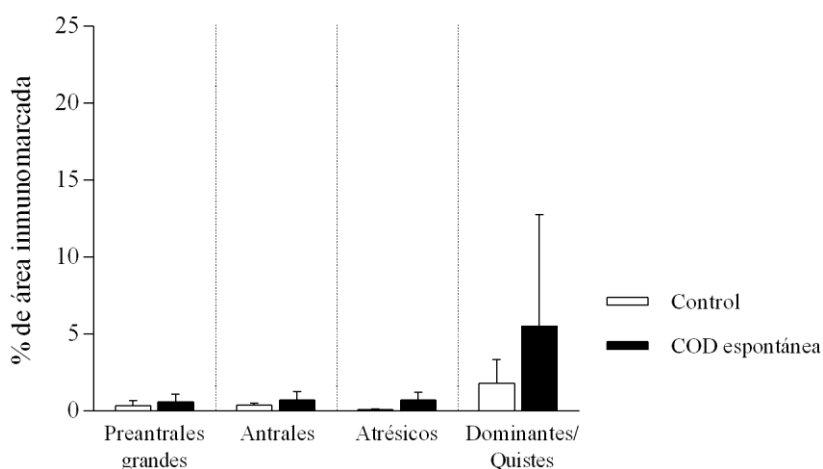


Figura 36: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1 β** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

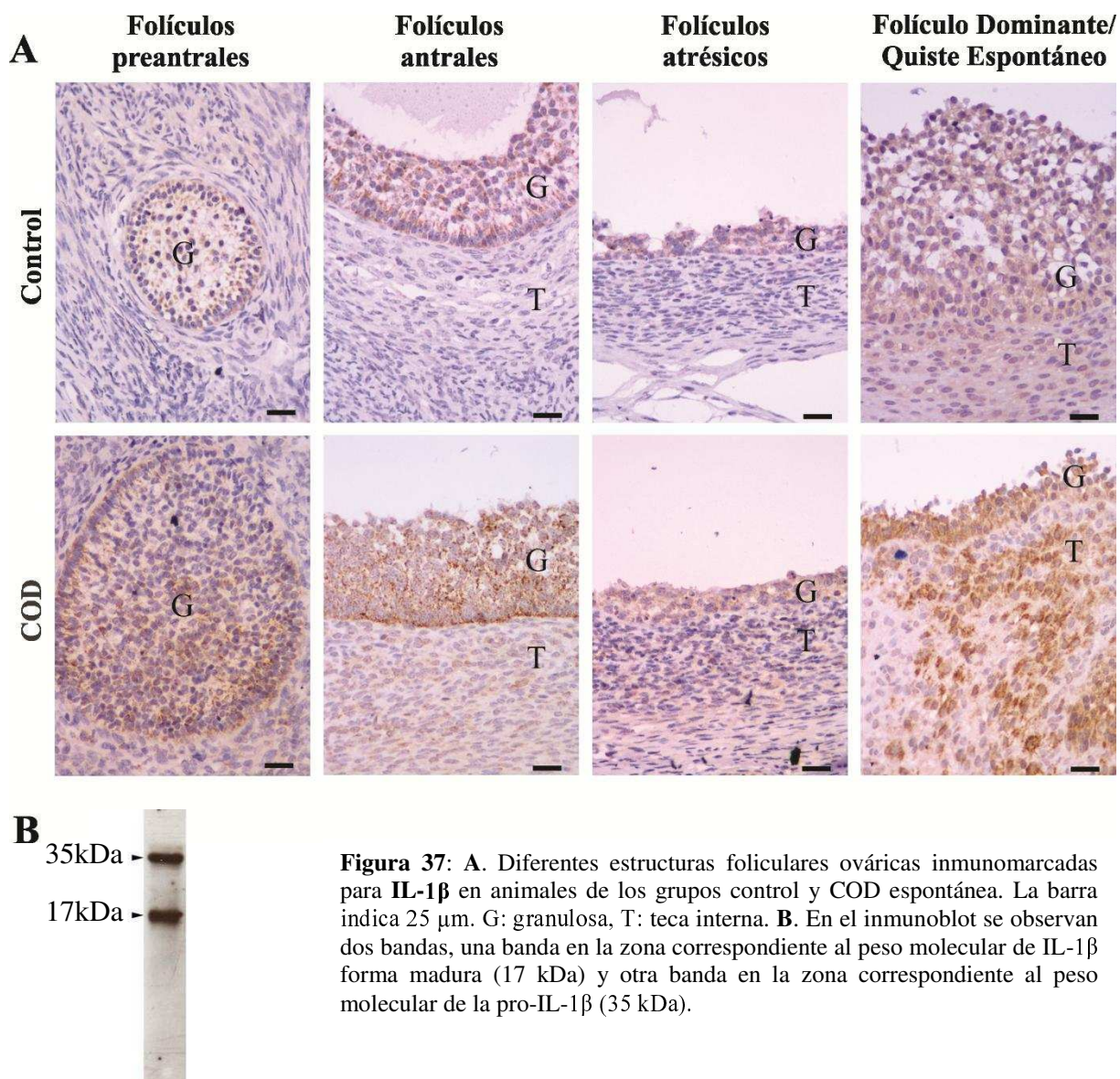


Figura 37: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-1 β** en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. B. En el inmunoblot se observan dos bandas, una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-1 β forma madura (17 kDa) y otra banda en la zona correspondiente al peso molecular de la pro-IL-1 β (35 kDa).

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

Se evaluó la concentración folicular y sérica de IL-1 β en muestras de los grupos control y COD espontánea. Como se puede observar en la figura 38, no se hallaron diferencias en la concentración de IL-1 β entre animales control y con COD. La comparación entre concentración en LF y suero de IL-1 β no mostró diferencias ($p > 0,05$).

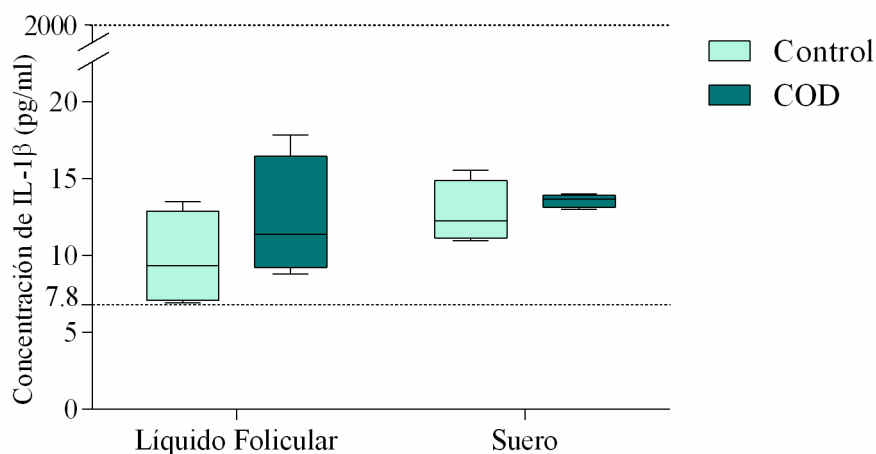


Figura 38: Concentración de **IL-1 β** en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro) y con COD espontánea. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.2.3. *IL-1RA: Expresión proteica y localización*

El IL-1RA fue localizado en el citoplasma de células de la granulosa y teca interna de todos los folículos y grupos analizados. En los animales controles se observó una mayor expresión en la capa granulosa de folículos preantrales grandes con respecto a folículos antrales y atrésicos. Además, los folículos preantrales pequeños mostraron una mayor expresión en relación a los folículos atrésicos. En células de la teca interna, no se encontraron diferencias entre los distintos tipos foliculares estudiados (figuras 39 y 43).

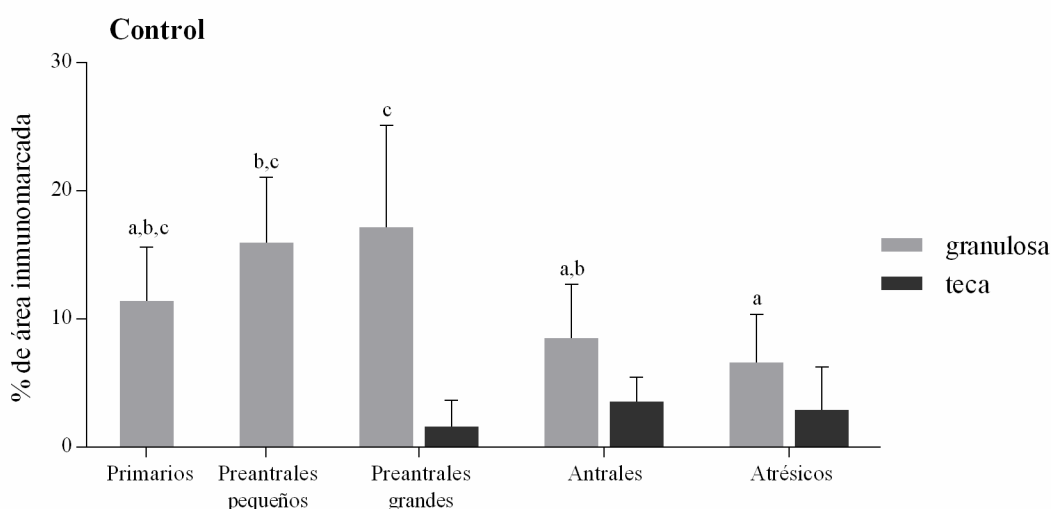


Figura 39: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RA** en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo de COD espontánea, no se observaron diferencias en las células de la granulosa. Por otro lado, en las células de la teca, la expresión en los quistes fue mayor que aquella encontrada en los folículos preantrales grandes y atrésicos ($p < 0,05$), sin mostrar diferencias con los folículos antrales ($p > 0,05$) (figuras 40 y 43).

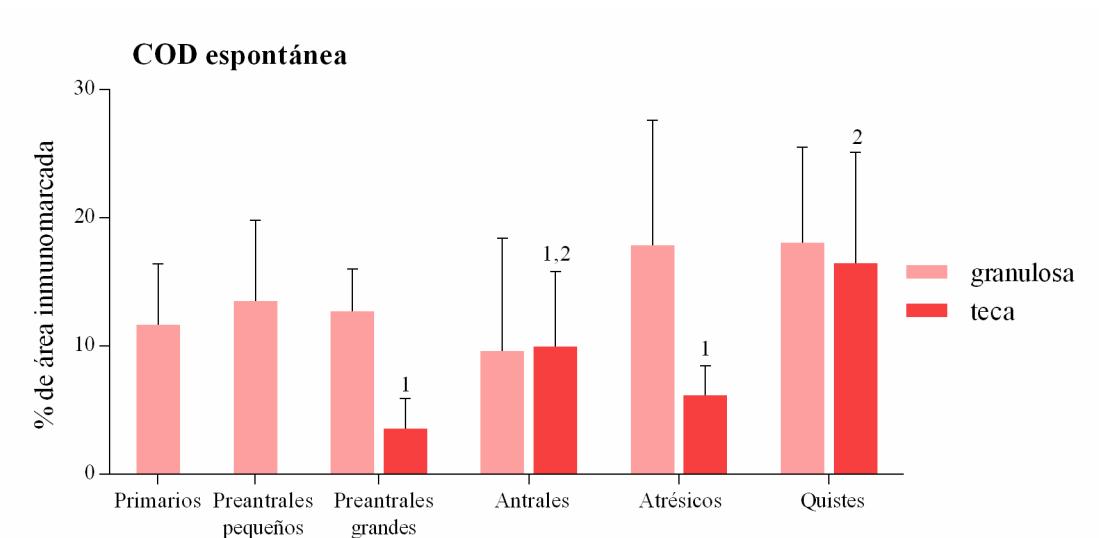


Figura 40: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RA** en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al comparar entre sí, las estructuras foliculares equivalentes de cada grupo, se observaron diferencias en las células de la granulosa de folículos de atrésicos siendo más alta la expresión en el grupo de COD espontánea en relación al grupo control. También, se comparó la expresión de IL-1RA en quistes en relación a folículos dominantes controles (como estructura de referencia), evidenciándose que los quistes mostraron mayor expresión con respecto a los folículos dominantes del grupo control ($p < 0,05$) (figuras 41 y 43).

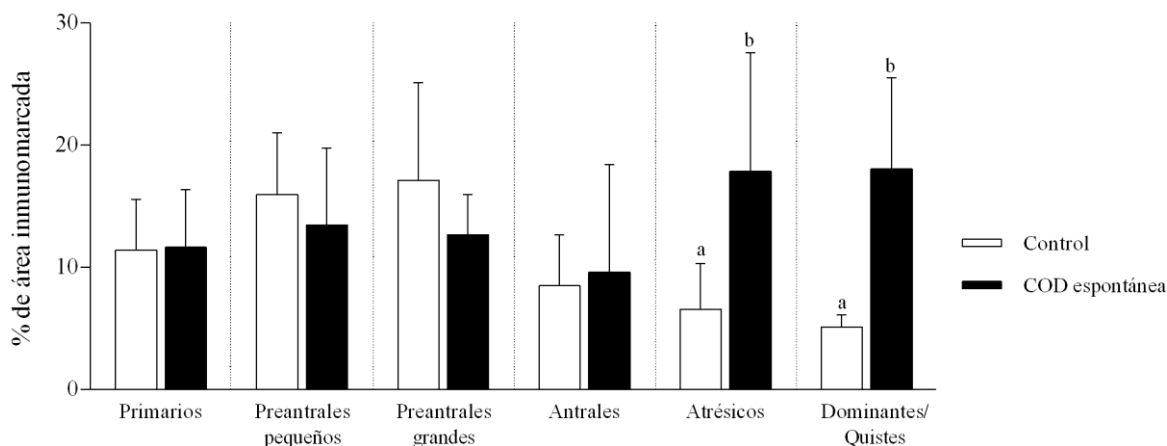


Figura 41: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RA** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontánea: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

En células de la teca fue posible evidenciar una mayor expresión de la proteína en los folículos antrales del grupo COD espontánea con respecto al grupo control. Además, se hallaron diferencias cuando se compararon quistes en relación a folículos dominantes del grupo control tomados como estructuras de referencia, determinándose una mayor expresión de IL-1RA en quistes espontáneos respecto a los folículos dominantes del grupo control ($p < 0,05$) (figuras 42 y 43).

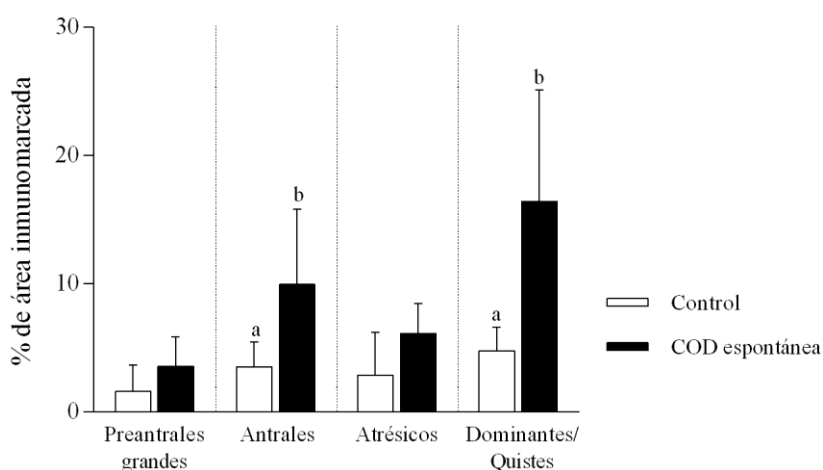


Figura 42: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RA** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

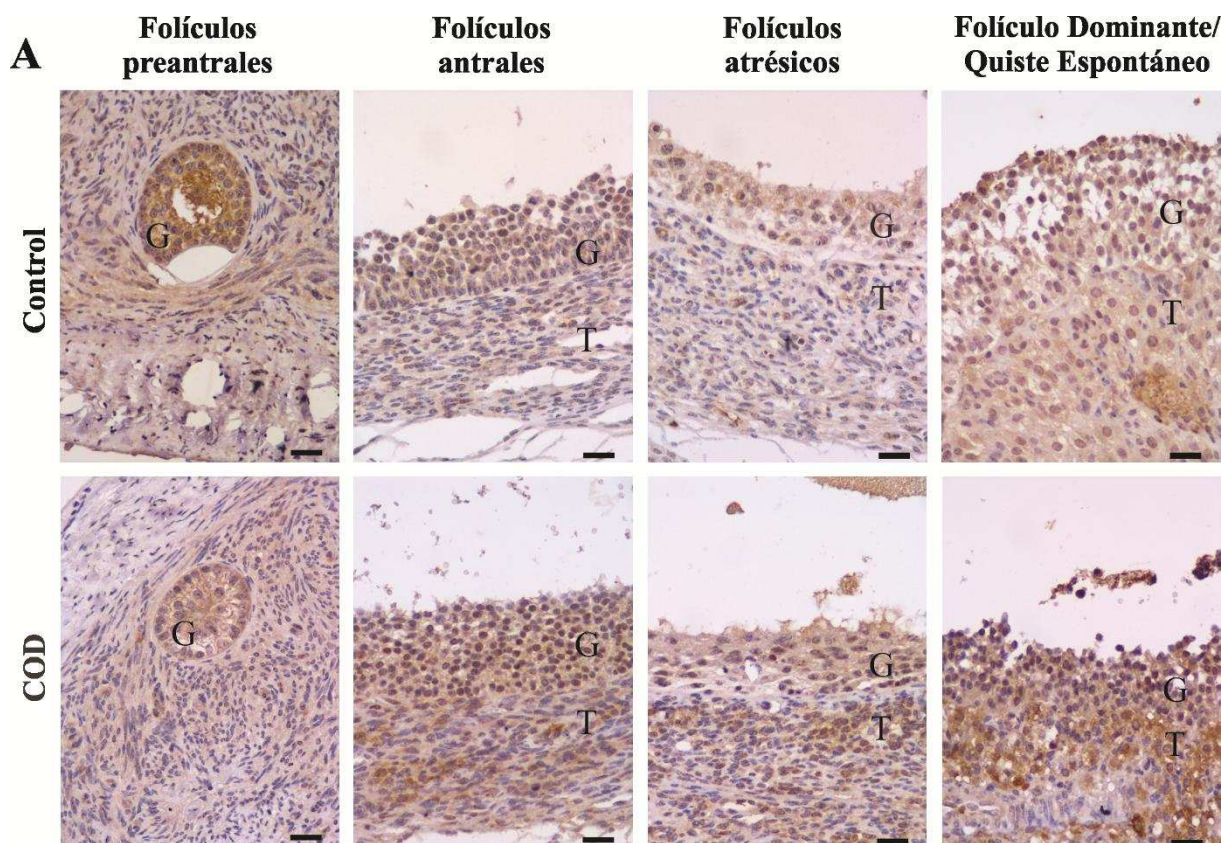
**B**

Figura 43: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-1RA** en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. **B.** En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-1RA (22 kDa).

4.2.4. *IL-1RI: Expresión proteica y localización*

El IL-1RI fue localizado en el citoplasma de células de la granulosa y teca interna de todos los folículos y grupos analizados. Particularmente, en los animales controles no se observaron diferencias entre las distintas categorías foliculares durante la foliculogénesis tanto a nivel de las células de la granulosa como de las células de la teca ($p > 0,05$) (figuras 44 y 48).

En la evaluación de los resultados de los grupos COD espontánea se determinó que las células de la granulosa los folículos primarios y preantrales grandes presentaron una menor expresión del receptor que los quistes ($p < 0,05$), sin mostrar diferencias con los folículos preantrales pequeños, antrales y atrésicos ($p > 0,05$). En la capa de células de la teca, se

determinaron niveles similares de expresión del receptor entre los distintos tipos foliculares en estudio ($p > 0,05$) (figuras 45 y 48).

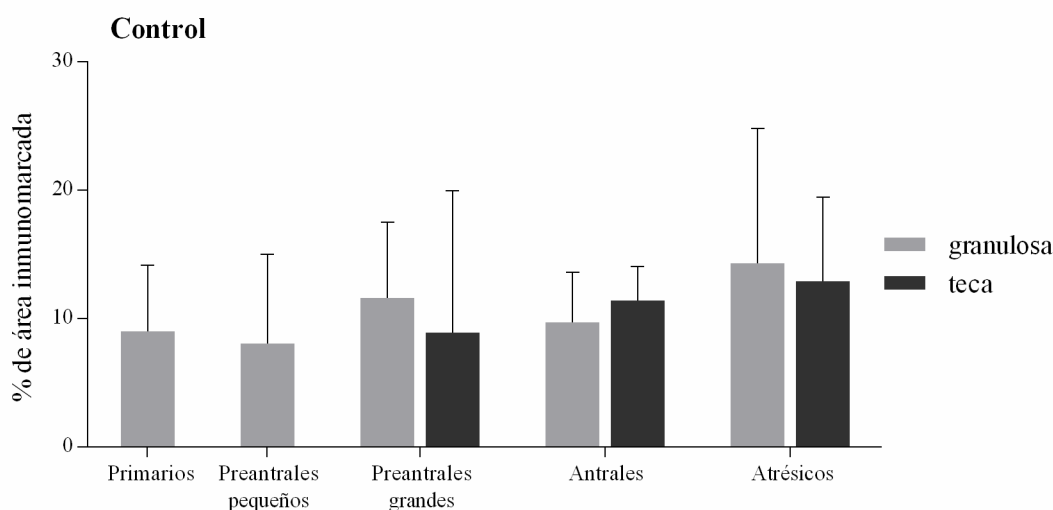


Figura 44: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RI en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

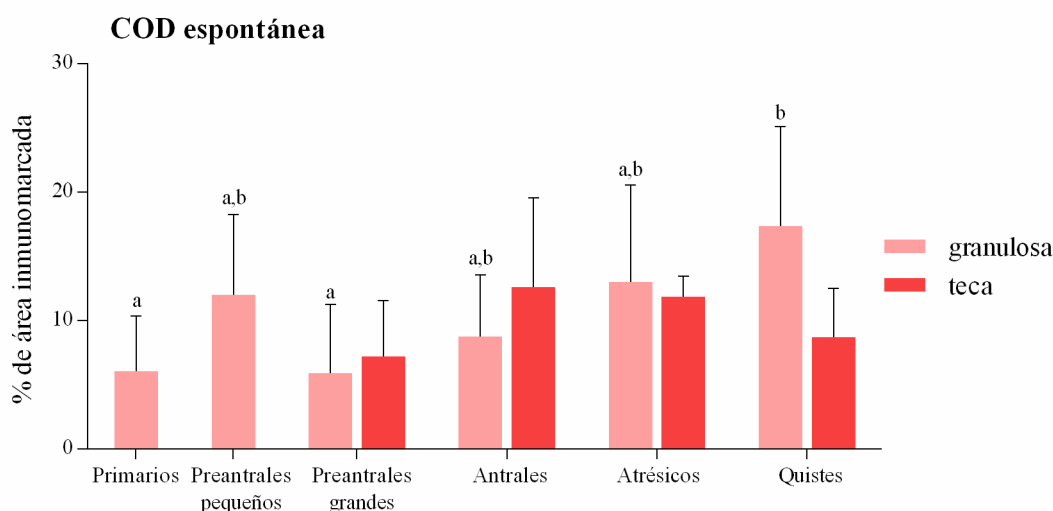


Figura 45: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1RI en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La comparación entre grupos permitió detectar una mayor expresión en los quistes en relación a los folículos dominantes controles ($p < 0,05$) en las células de la granulosa para el IL-1RI sin diferencias en las otras categorías (figuras 46 y 48).

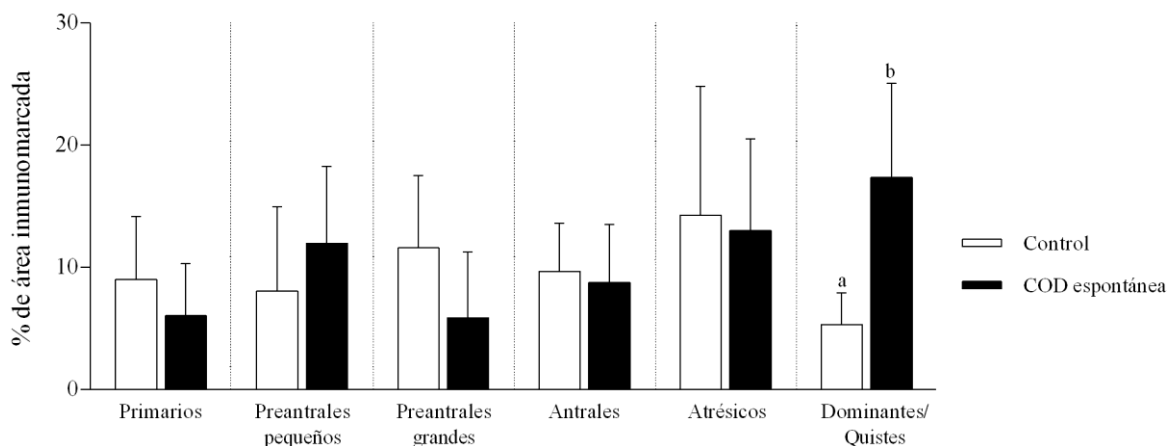


Figura 46: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RI** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

En células de la teca se observaron diferencias en la misma categoría, dónde los quistes pertenecientes al grupo COD espontánea mostraron una mayor expresión en relación a los folículos dominantes controles ($p < 0,05$), sin hallarse diferencias en las otras categorías analizadas ($p > 0,05$) (figuras 47 y 48).

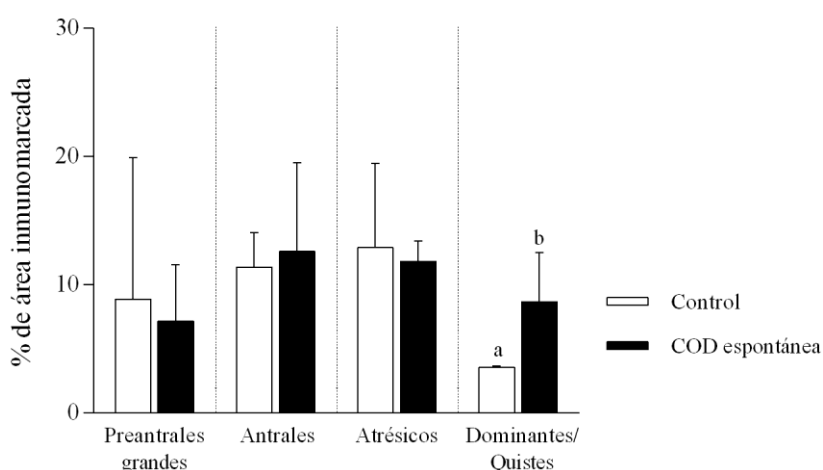


Figura 47: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RI** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

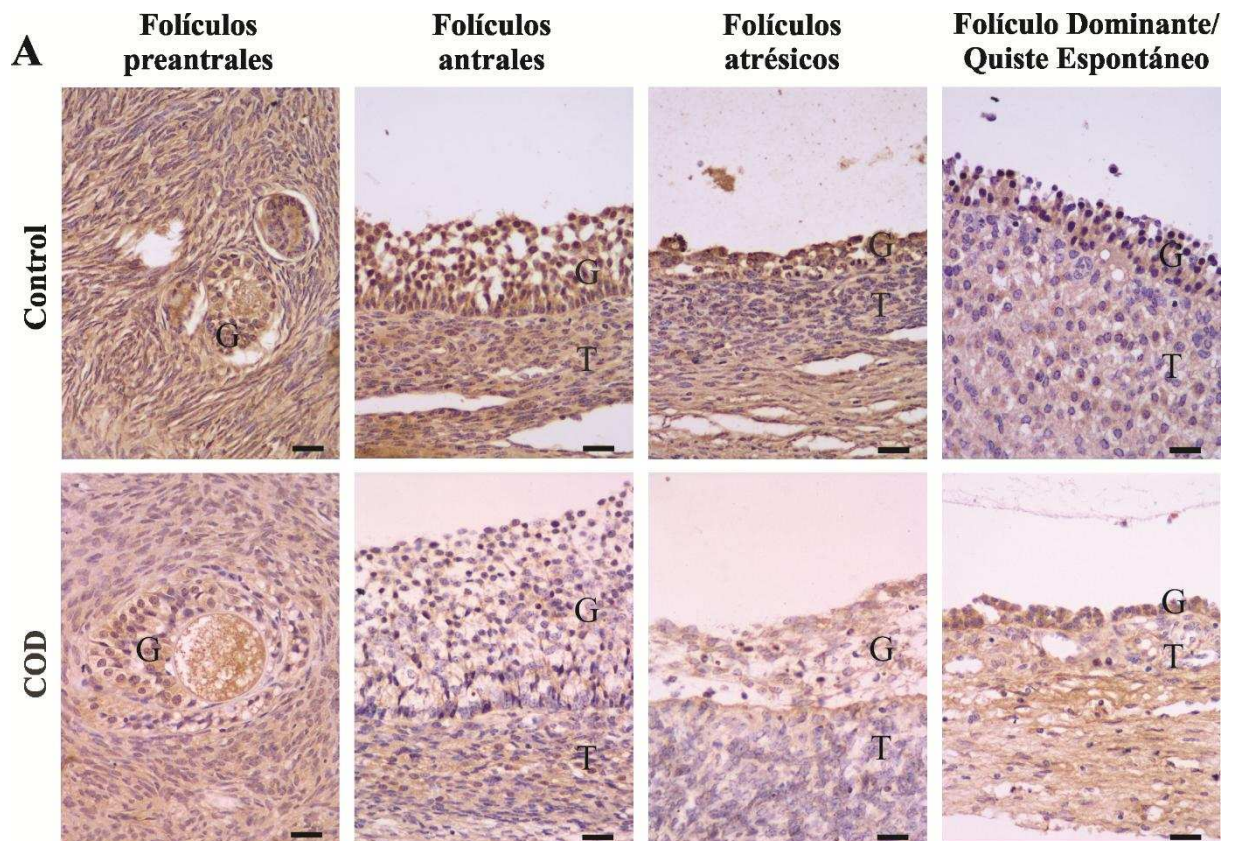


Figura 48: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-1RI** en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μm . G: granulosa, T: teca interna. B. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-1RI (66 kDa).

4.2.5. *IL-1RII: Expresión proteica y localización*

IL1RII fue localizado en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todos los tipos de folículos y grupos analizados. En las células de la granulosa de animales controles, se observó la mayor expresión en los folículos atrésicos en relación a todas las categorías restantes ($p < 0,05$). A su vez los folículos antrales presentaron una menor expresión que los folículos preantrales pequeños ($p < 0,05$). Por otro lado, en las células de la teca no se encontraron diferencias entre los distintos tipos foliculares en estudio ($p > 0,05$), mostrando esta población celular una expresión constante del receptor a través de la foliculogénesis (figuras 49 y 53).

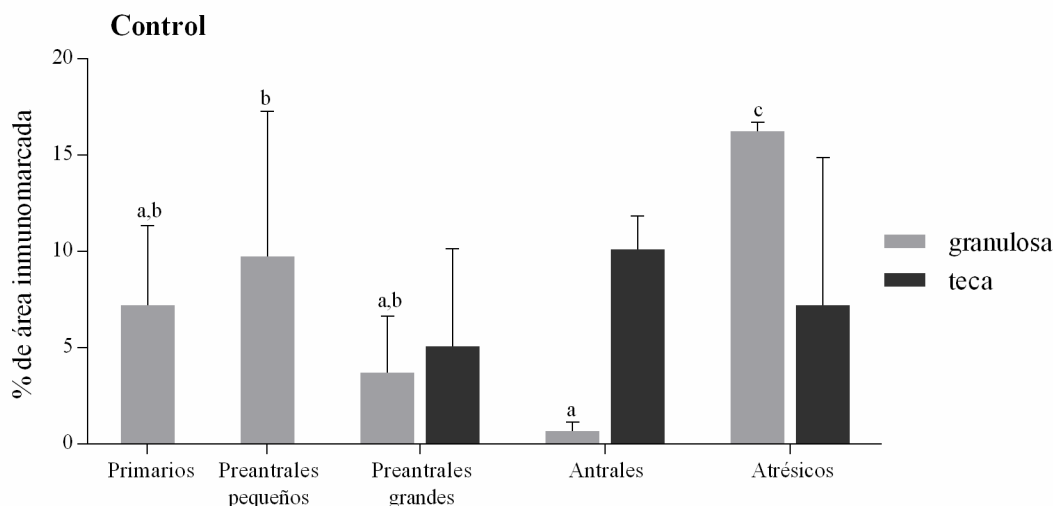


Figura 49: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RII** en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo de COD espontánea, la expresión de IL-1RII fue más alta en células de la granulosa de folículos atrésicos y quistes que en folículos preantrales pequeños, preantrales grandes y antrales ($p < 0,05$), sin presentar diferencias con los folículos primarios ($p > 0,05$). Además, se evidenció una mayor expresión en folículos primarios en relación a los antrales. En las células de la teca interna, no se encontraron diferencias entre los distintos tipos foliculares en estudio ($p > 0,05$) (figuras 50 y 53).

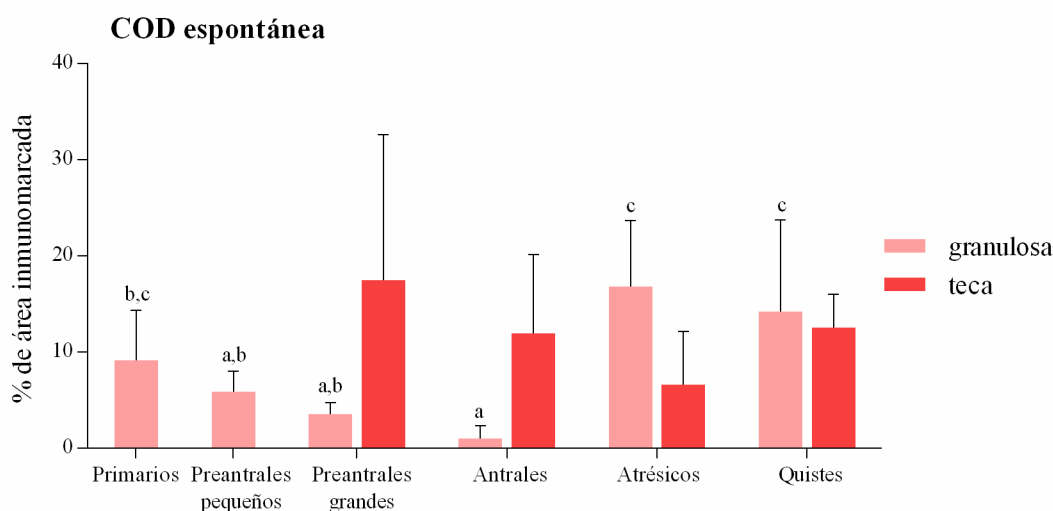


Figura 50: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RII** en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando cada categoría folicular específica fue comparada entre grupos (control y COD espontánea), no se observaron diferencias en células de la granulosa de folículos primarios, preantrales pequeños y grandes, antrales y atrésicos ($p > 0,05$) (figuras 51 y 53).

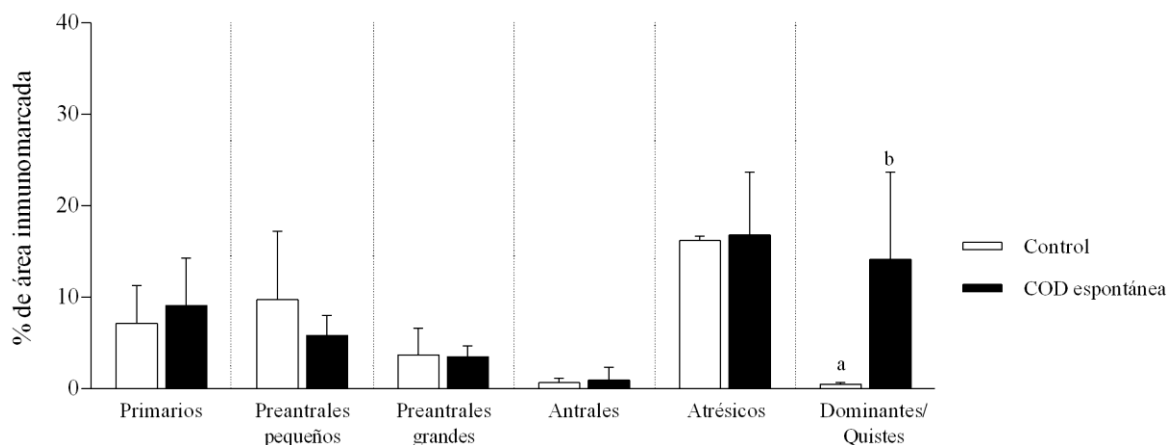


Figura 51: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RII** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

En las células de la teca interna no se observaron diferencias en los folículos preantrales grandes, antrales y atrésicos ($p > 0,05$). Por otro lado, cuando se comparó el quiste con su respectiva estructura de referencia (folículo dominante), el quiste presentó una mayor expresión, tanto a nivel de células de la granulosa como de la teca, en relación al folículo dominante del grupo control ($p < 0,05$) (figuras 51, 52 y 53).

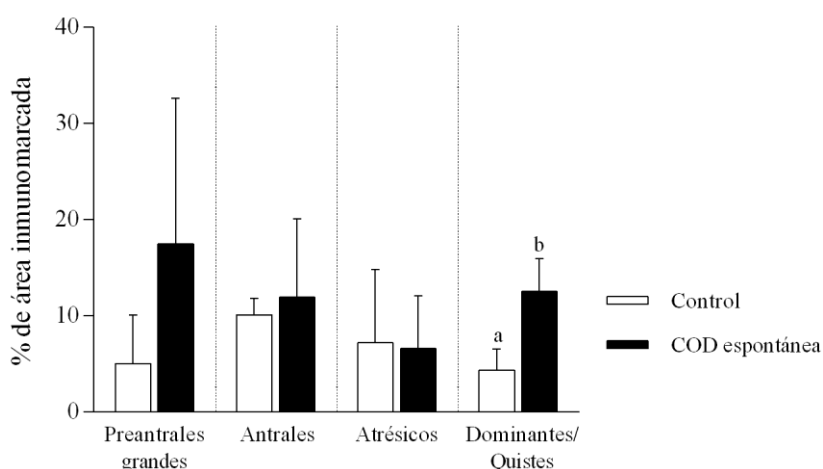


Figura 52: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RII** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

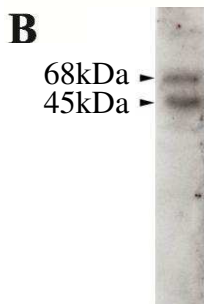
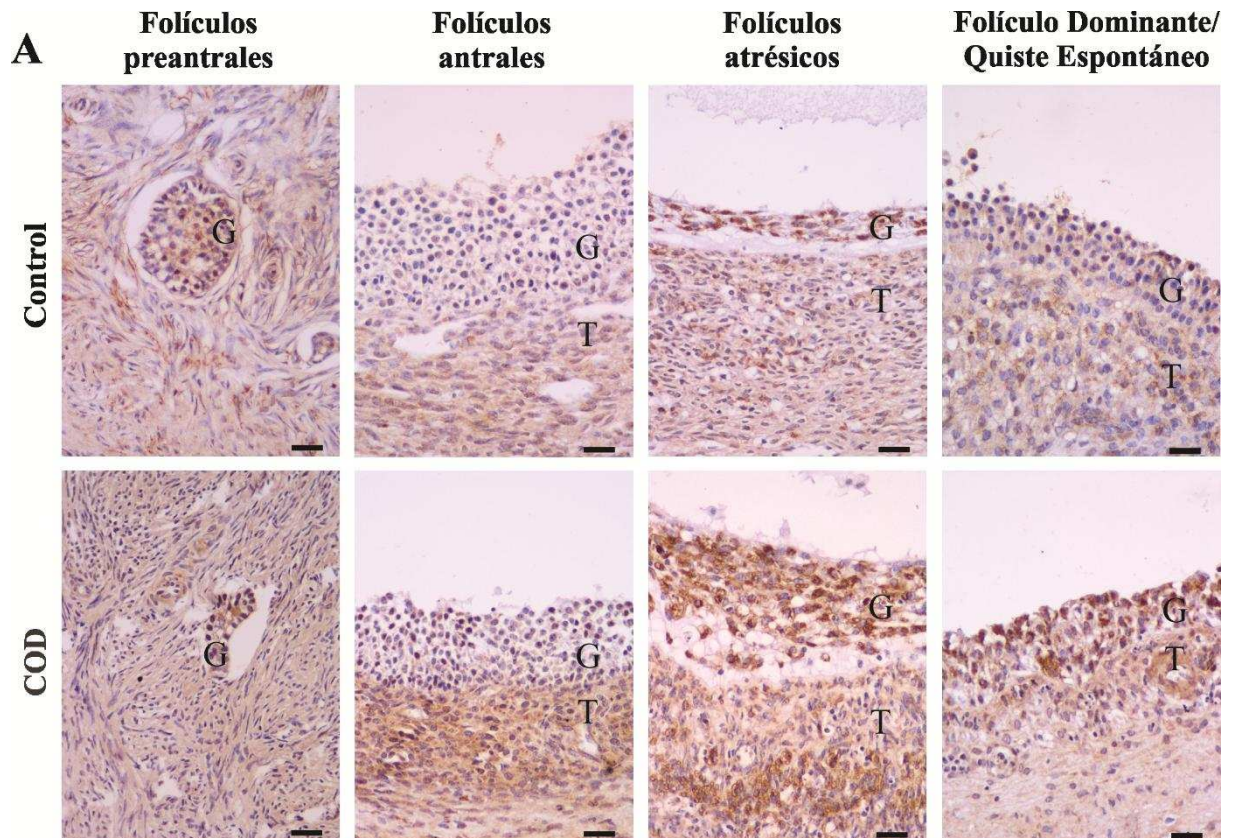


Figura 53: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-1RII** en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μm . G: granulosa, T: teca interna. B. En el inmunoblot se observan dos bandas, una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-1RII forma soluble (45 kDa) y otra banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL1RII de membrana (68 kDa).

4.2.6. IL-4

4.2.6.1. Expresión proteica y localización

La IL-4 fue localizada por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todos los folículos y grupos analizados. En el grupo control se detectó una moderada expresión en las células de la granulosa y baja en la teca interna de todas las categorías foliculares. En células de la granulosa la expresión fue mayor en los folículos atrésicos en relación al resto de las categorías foliculares ($p < 0,05$). En las células de la teca no se detectaron diferencias entre las diferentes categorías foliculares evaluadas ($p > 0,05$) (figuras 54 y 58).

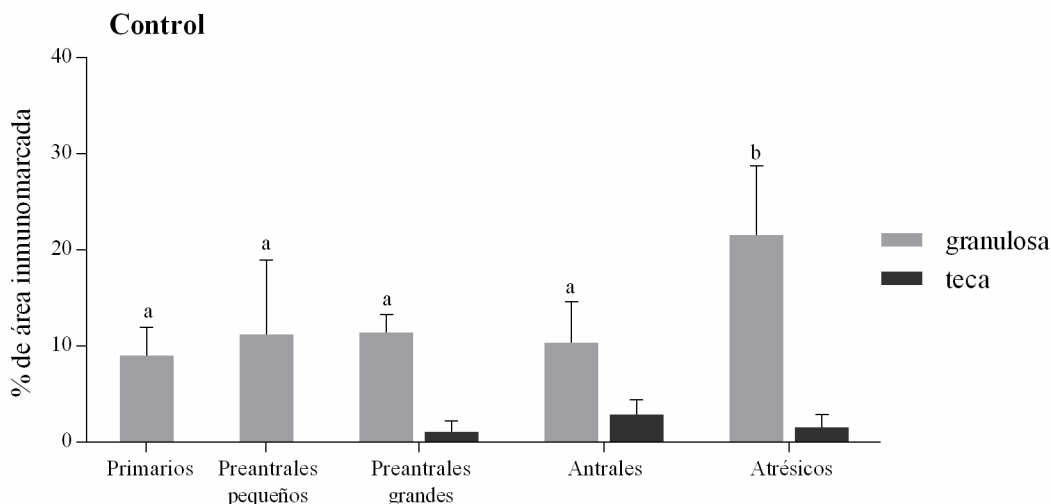


Figura 54: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-4** en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo de COD espontánea, el patrón de expresión fue similar a aquel observado en el grupo control. En las células de la granulosa se detectó una mayor expresión de IL-4 en los folículos atrésicos y quistes en relación a los folículos primarios, preantrales y antrales ($p < 0,05$). A nivel de las células de la teca, no se observaron diferencias entre las distintas categorías foliculares evaluadas ($p > 0,05$) (figuras 55 y 58).

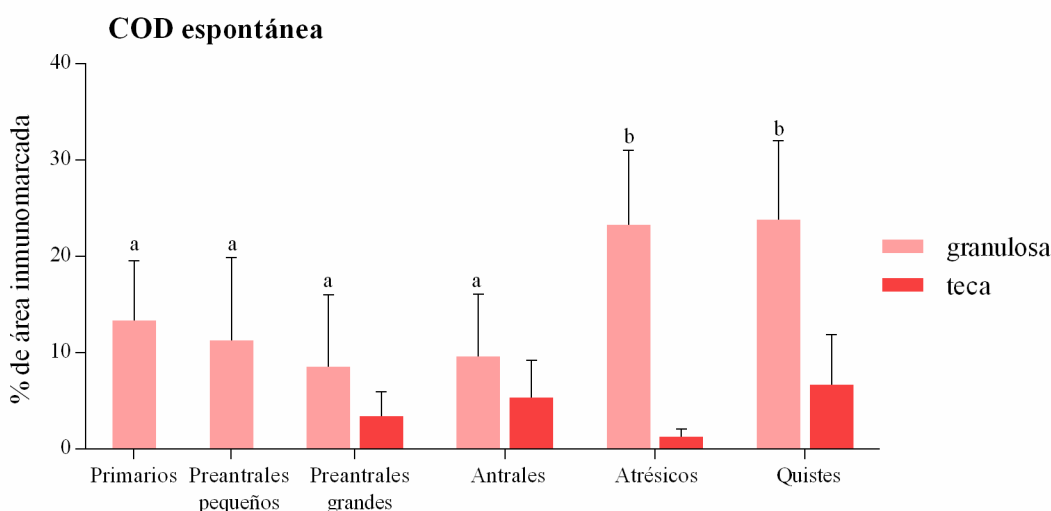


Figura 55: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-4** en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando cada categoría folicular fue comparada entre los grupos en estudio, se observó que las células de la granulosa y de la teca interna (para las cuales corresponda) no evidenciaron diferencias en los folículos primarios, preantrales, antrales y atrécicos ($p > 0,05$). Por otro lado, cuando se comparó la expresión en quistes con las estructuras de referencia (folículos dominantes) se detectó una mayor expresión en los quistes, tanto a nivel de células de la granulosa como de la teca, en relación a los folículos dominantes del grupo control ($p < 0,05$) (figuras 56, 57 y 58).

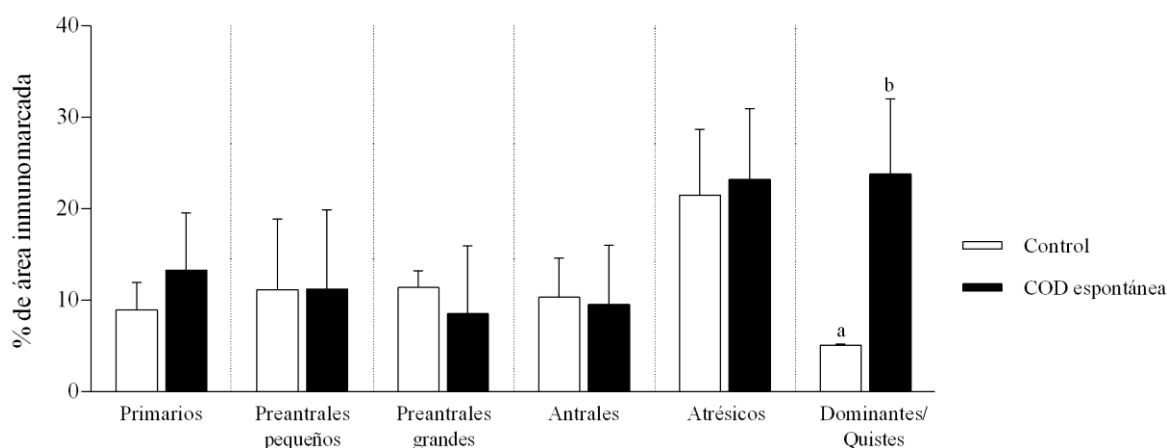


Figura 56: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-4** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

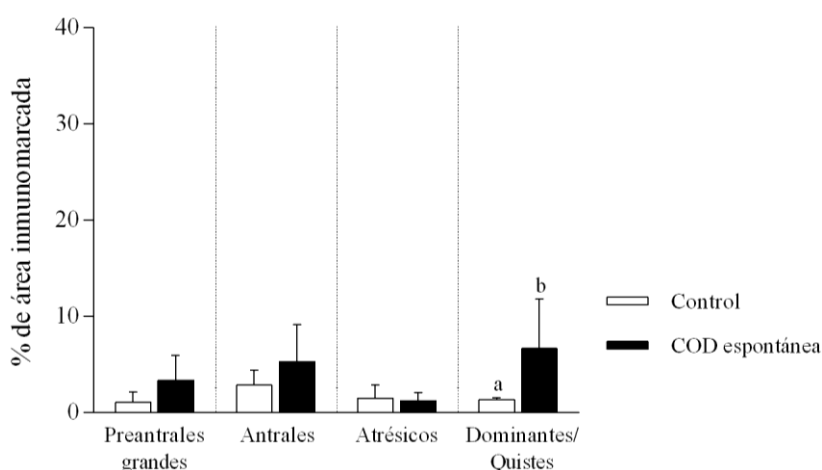


Figura 57: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-4** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

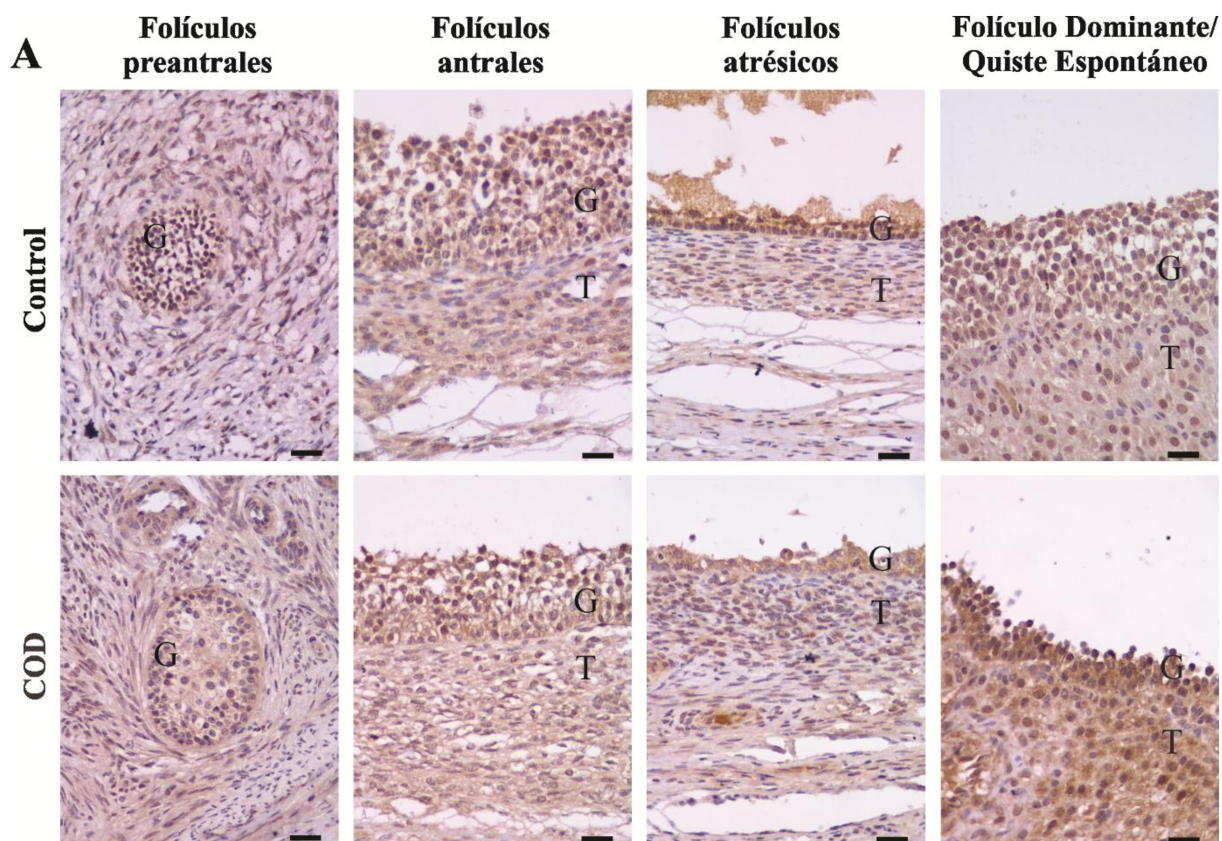
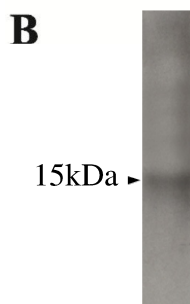


Figura 58: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-4** en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μm . G: granulosa, T: teca interna. B. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-4 (15 kDa).



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

Se evaluó la concentración folicular y sérica de IL-4 en muestras de los grupos control y COD espontánea. Como se puede observar en la figura 59, no se hallaron diferencias en la concentración de IL-4 entre animales control y con COD. Cuando se realizó la comparación entre LF y suero del mismo grupo, los niveles de IL-4 fueron mayores en LF que en el suero en ambos grupos, control y COD espontánea ($p < 0,05$).

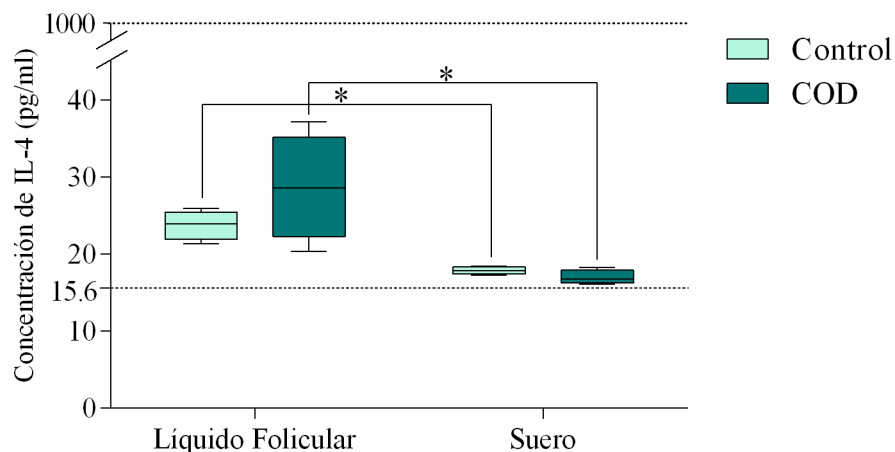


Figura 59: Concentración de **IL-4** en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro) y con COD espontánea. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias entre LF y suero dentro de un mismo grupo (indicadas por corchetes) ($p < 0,05$).

4.2.7. IL-6

4.2.7.1. Expresión génica

La *IL-6* fue detectada en las células foliculares de los quistes y ovarios control. El ARNm de *IL-6* sólo fue cuantificable en tres muestras de ovarios controles (de un total de quince muestras). Sin embargo, en las muestras cuantificadas, no se observó diferencia entre la expresión en las células de los folículos quísticos y controles ($p > 0,05$) (figura 60).

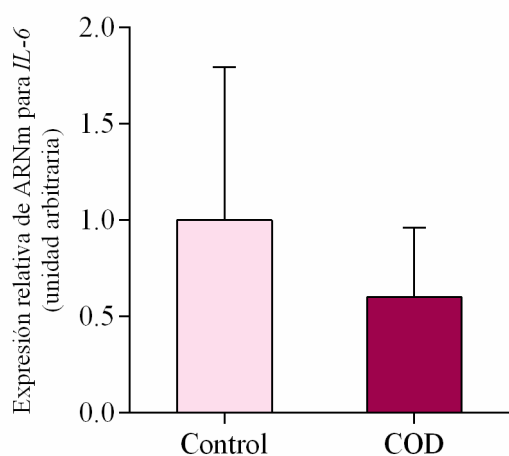


Figura 60: Expresión de ARNm de *IL-6* determinado por PCR en tiempo real en células foliculares de casos de COD espontánea en relación a ovarios controles. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.2.7.2. Expresión proteica y localización

La IL-6 fue localizada en el citoplasma de células de la granulosa y teca interna de todos los folículos y grupos analizados. En los animales controles se observó una expresión constante en la capa de células de la granulosa y teca interna de todas las categorías foliculares ($p > 0,05$) (figuras 61 y 65).

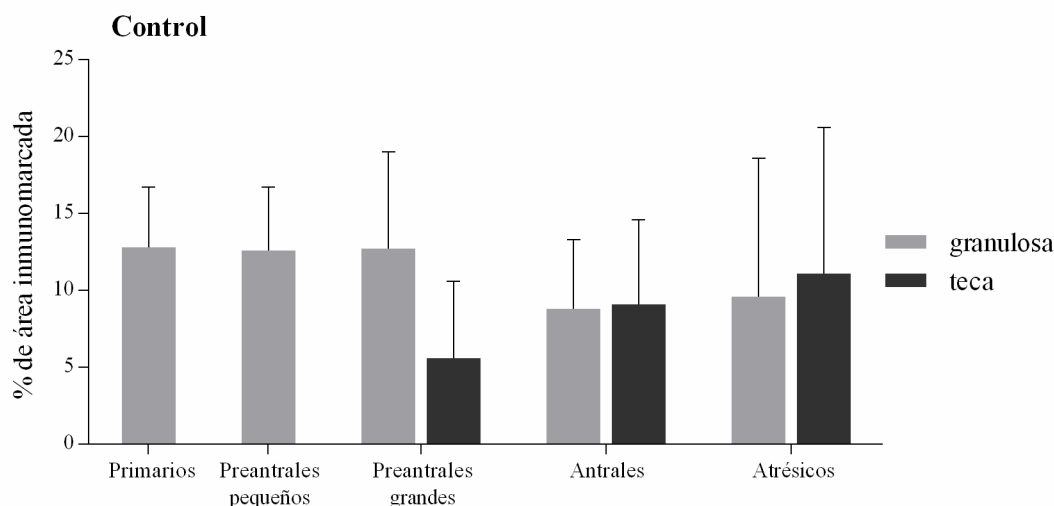


Figura 61: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

En el grupo de COD espontánea, las células de la granulosa de los folículos primarios, preantrales pequeños y quísticos mostraron mayor expresión en relación a los folículos antrales y atrésicos ($p < 0,05$). Además, la expresión en los folículos preantrales grandes fue significativamente menor que la de los folículos primarios. Sumado a esto, no se evidenciaron diferencias en la expresión de esta proteína a nivel de las células de la teca ($p > 0,05$) (figuras 62 y 65).

Al comparar entre sí, las estructuras foliculares equivalentes de cada grupo, se observaron diferencias en las células de la granulosa de folículos primarios, siendo menor la expresión en el grupo control en relación al grupo COD espontánea ($p < 0,05$). Las categorías foliculares restantes no mostraron diferencias al ser analizadas ($p > 0,05$). También, se comparó la expresión de IL-6 en quistes en relación a folículos antrales del grupo control (como estructura de referencia), pudiéndose observar que los quistes espontáneos mostraron mayor expresión con respecto a los folículos antrales del grupo control (figuras 63 y 65).

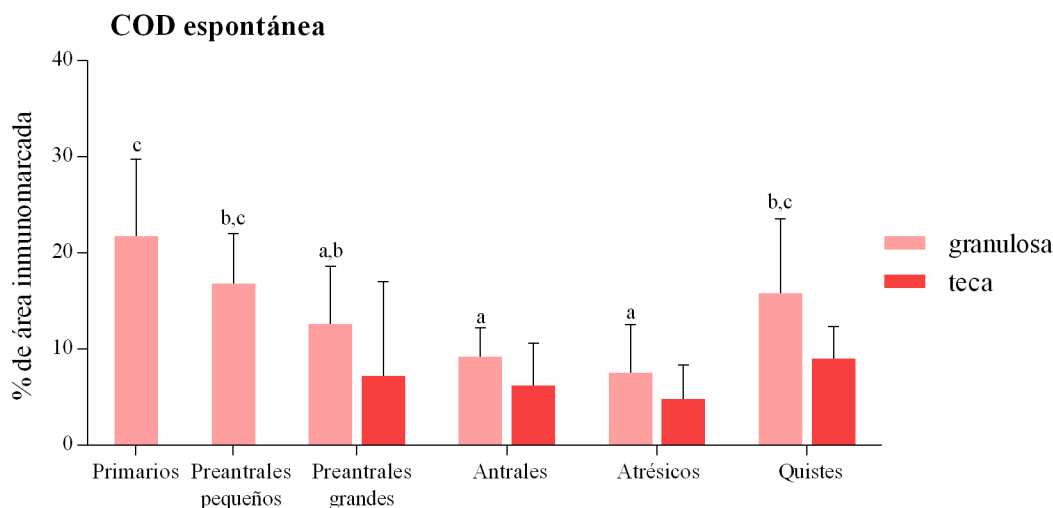


Figura 62: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-6** en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

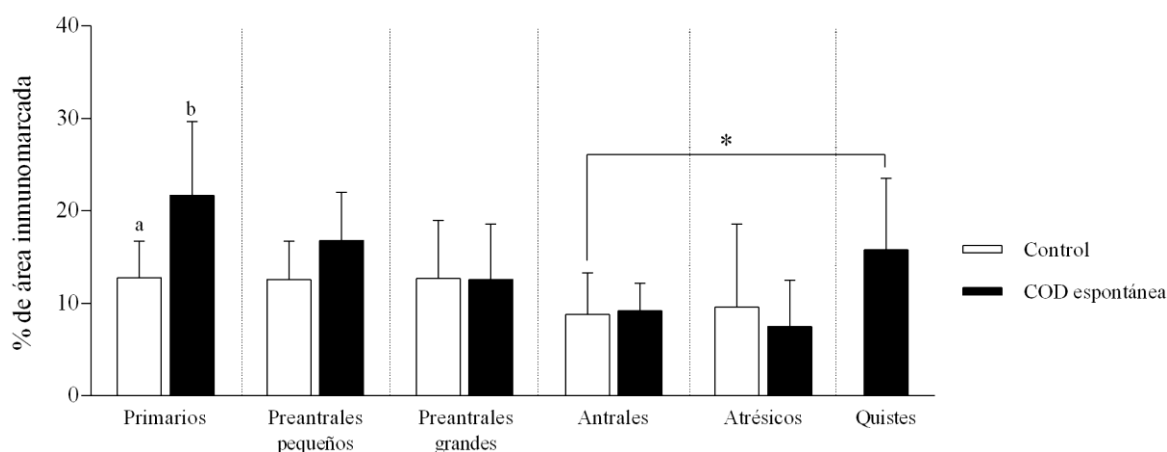


Figura 63: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-6** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

En las células de la teca interna no se encontraron diferencias significativas. Además, no se hallaron diferencias cuando se compararon quistes en relación a folículos antrales del grupo control que fueron tomadas como estructuras de referencia ($p > 0,05$) (figuras 64 y 65).

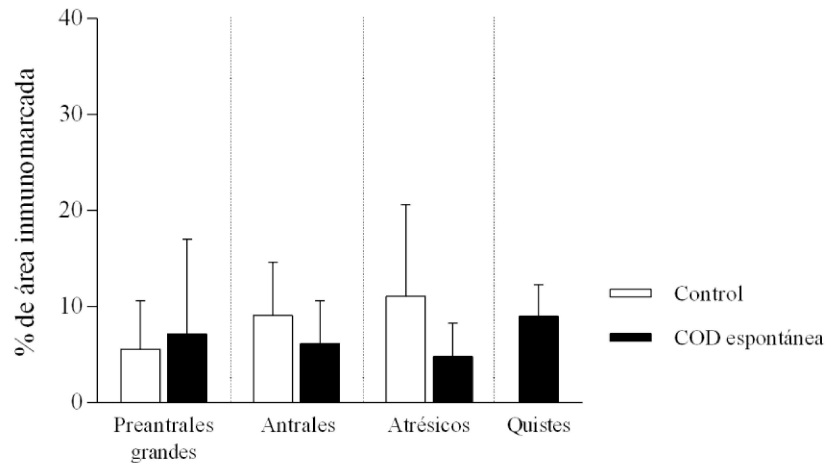


Figura 64: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-6** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontánea: negro). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

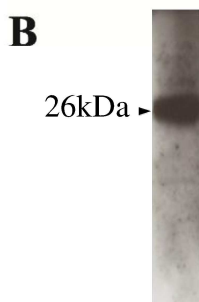
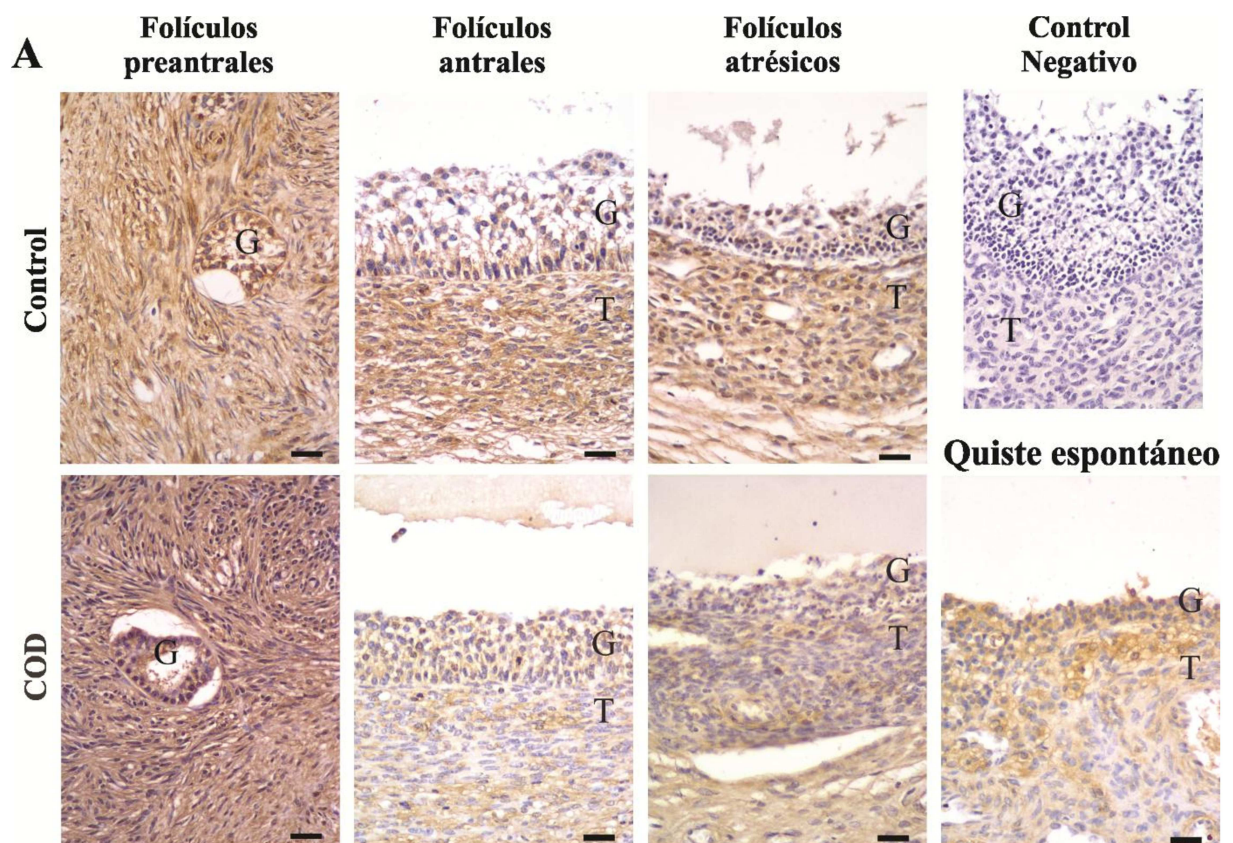


Figura 65: A. Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-6** en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. B. En el inmunoblot se observa una banda en la zona correspondiente al peso molecular de IL-6 (26 kDa).

4.2.7.3. Concentración de IL-6 en líquido folicular y suero

Se evaluó la concentración folicular y sérica de IL-6 en muestras de los grupos control y COD espontánea. Como se puede observar en la figura 66, no se hallaron diferencias en la concentración de IL-6 entre animales control y con COD. La comparación entre concentración en LF y suero de IL-6 no mostró diferencias ($p > 0,05$).

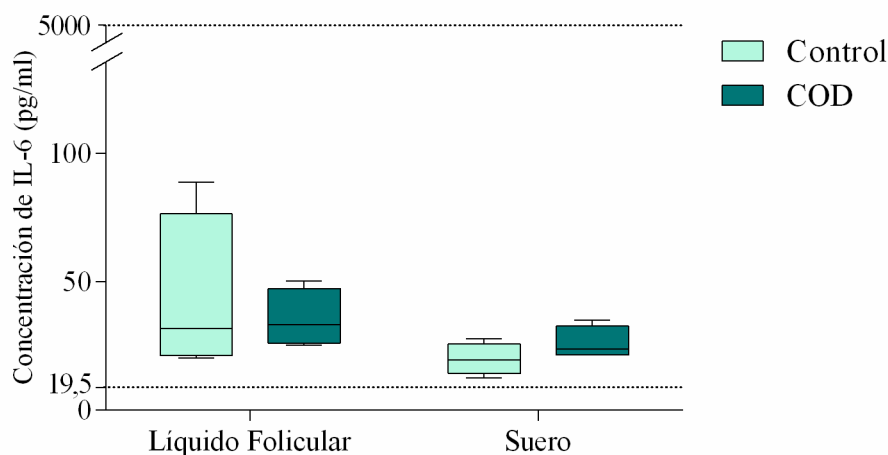


Figura 66: Concentración de **IL-6** en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro) y con COD espontánea. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.2.8. IL-8

4.2.8.1. Expresión proteica y localización

La IL-8 fue localizada en el citoplasma de células de la granulosa y teca interna de todos los folículos y grupos analizados. Particularmente, en los animales controles no se observaron diferencias entre las distintas categorías foliculares durante la foliculogénesis tanto a nivel de las células de la granulosa como de las células de la teca (figuras 67 y 71).

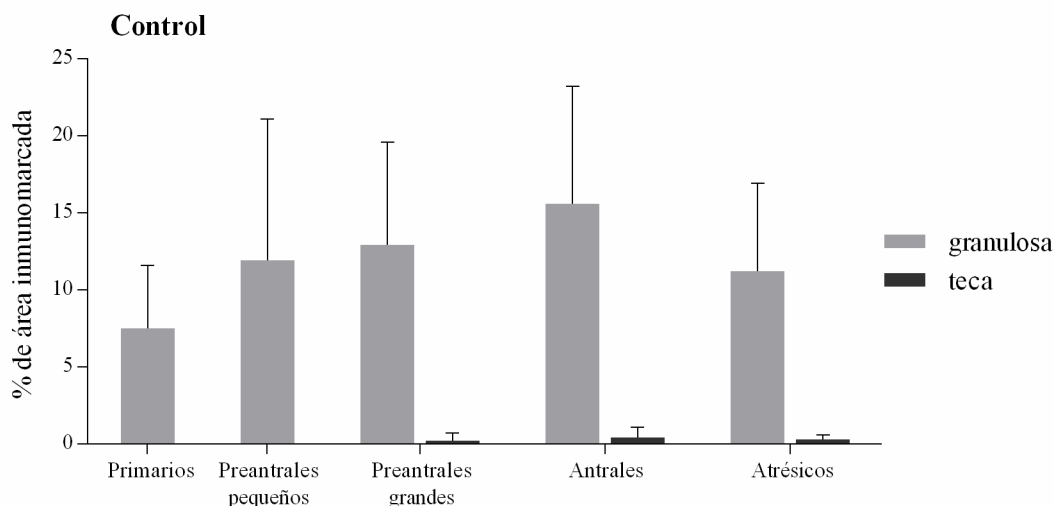


Figura 67: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-8 en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

En el grupo COD espontánea la expresión de IL-8 en células de la granulosa fue mayor en los folículos antrales y atrésicos en relación a los quistes. Además, los folículos primarios evidenciaron una menor expresión en relación a los folículos antrales ($p < 0,05$). Por otro lado, la expresión a nivel de células de la teca no presentó diferencias entre las distintas categorías foliculares (figuras 68 y 71).

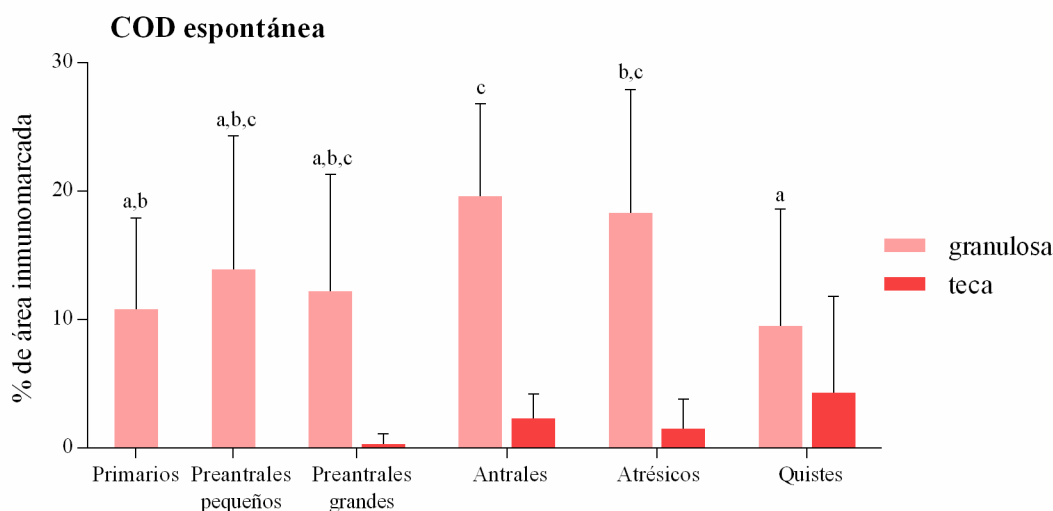


Figura 68: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-8 en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando se realizó la comparación de las categorías foliculares equivalentes entre los diferentes grupos en estudio pudo detectarse expresión constante y sin diferencias para IL-8 en las células de la granulosa (figuras 69 y 71).

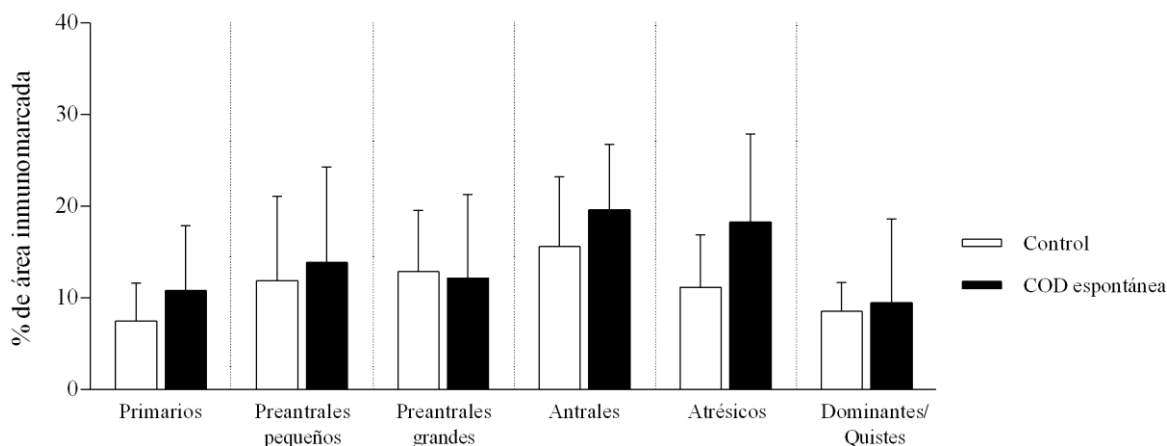


Figura 69: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-8** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

En células de la teca se observaron diferencias en la categoría de folículos antrales, donde el grupo con COD espontánea evidenció mayor porcentaje de marcación que los mismos del grupo control. Además, no se encontraron diferencias entre las otras categorías foliculares evaluadas (figuras 70 y 71).

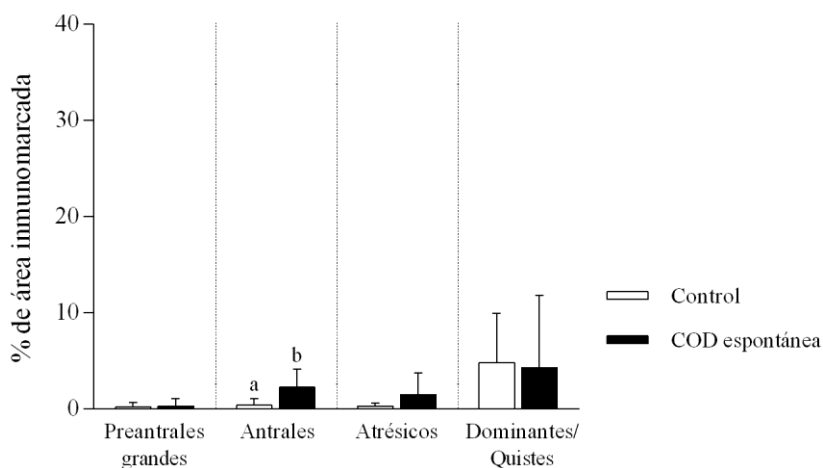
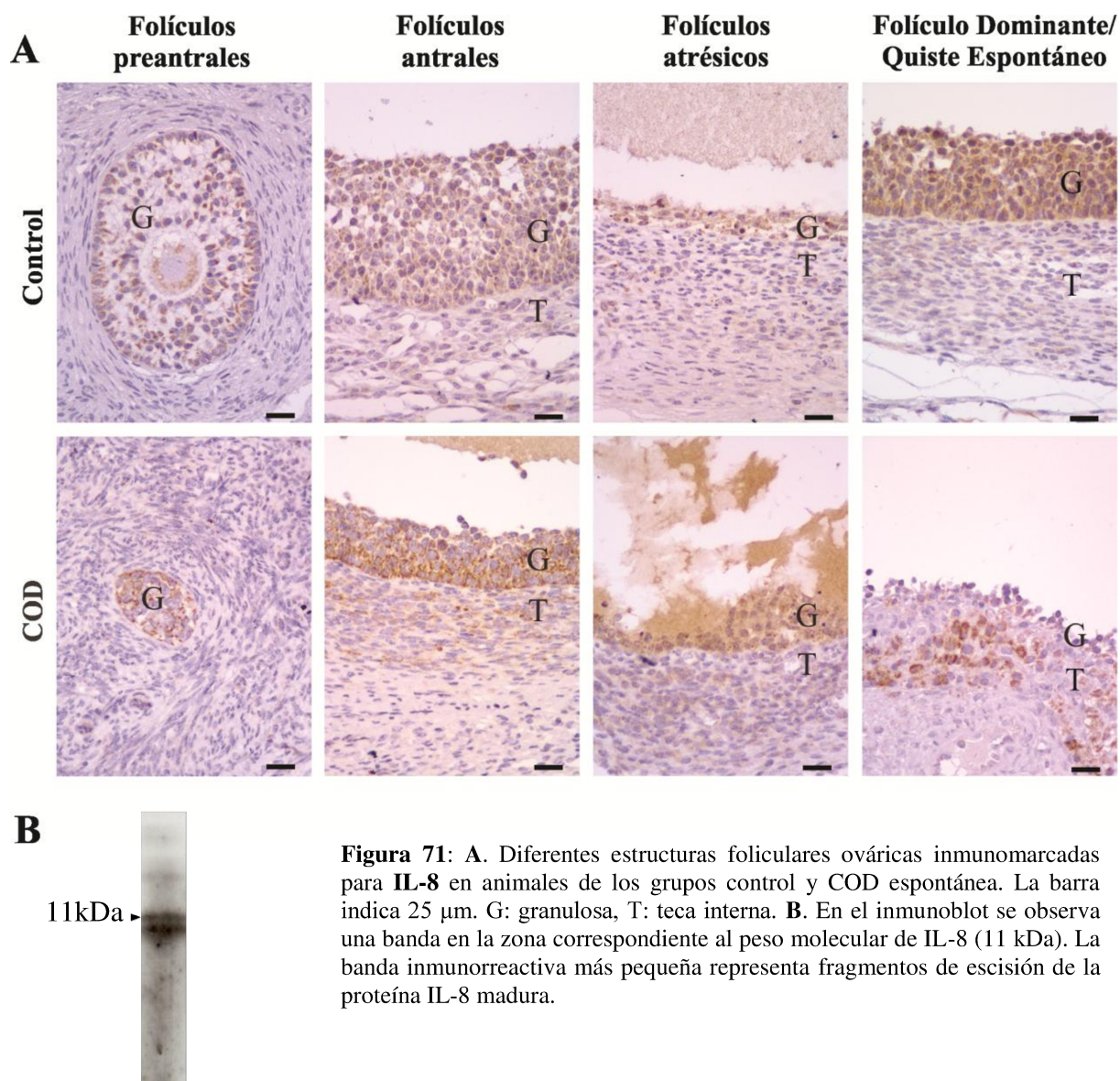


Figura 70: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-8** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).



4.2.8.2. Concentración de IL-8 en líquido folicular y suero

Se evaluó la concentración folicular y sérica de IL-8 en muestras de los grupos control y COD espontánea. Como se puede observar en la figura 72, no se pudo detectar IL-8 en LF de animales controles ($< 7,8$ pg/ml), por lo que no pudimos realizar el análisis estadístico correspondiente. Por otro lado, en LF de animales con COD, la IL-8 fue cuantificable dentro de los límites de detección de la técnica. En suero no se hallaron diferencias en la concentración de IL-8 entre animales control y con COD ($p > 0,05$).

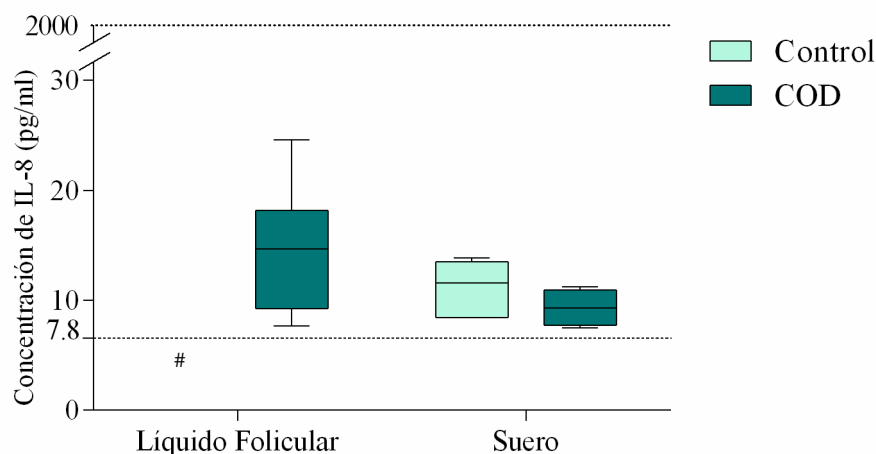


Figura 72: Concentración de **IL-8** en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro) y con COD espontánea. Los valores representan la media \pm DE. # IL-8 en LF de animales controles ($<$ a 7,8 pg/ml). No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.2.9. *TNF- α*

4.2.9.1. Expresión génica

El *TNF- α* fue detectado en las células foliculares de los quistes y muestras control. El ARNm de *TNF- α* sólo fue cuatificable en cuatro muestras de ovarios controles (de un total de quince muestras). Sin embargo, en las muestras cuatificadas, no se observó diferencia significativa entre la expresión en las células de los folículos quísticos y controles (figura 73).

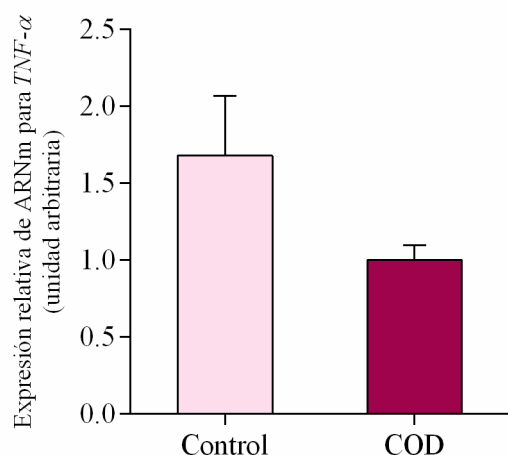


Figura 73: Expresión de ARNm de *TNF- α* determinado por PCR en tiempo real en células foliculares de casos de COD espontánea en relación a ovarios controles. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.2.9.2. Expresión proteica y localización

El TNF- α fue localizado por inmunohistoquímica en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todos los folículos y grupos analizados. En células de la granulosa del grupo control la expresión fue mayor en los folículos primarios y preantrales pequeños y grandes en relación a los folículos antrales y atrésicos ($p < 0,05$). Por otro lado, en las células de teca no se observaron diferencias entre las distintas categorías evaluadas ($p > 0,05$) (figuras 74 y 78).

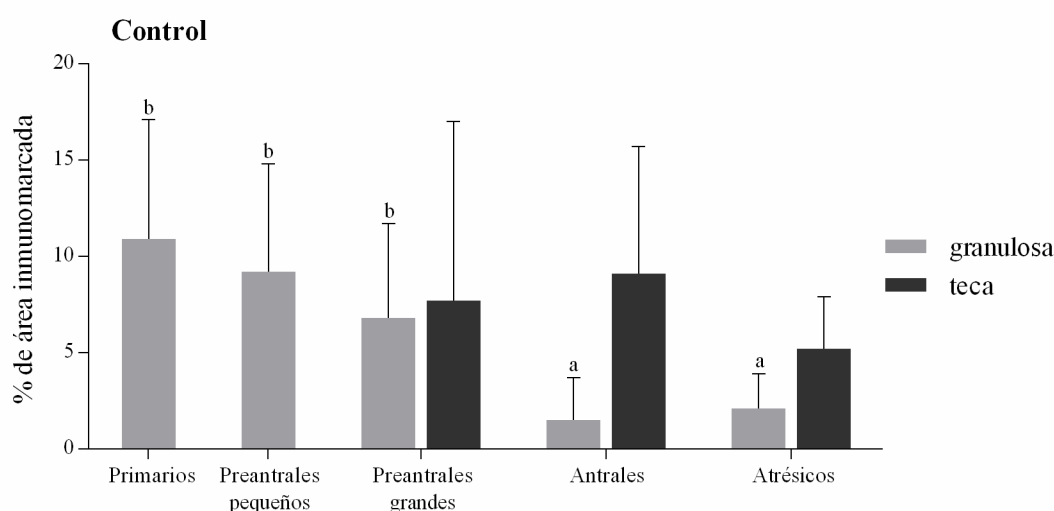


Figura 74: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TNF- α en el grupo control. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la evaluación de los resultados del grupo COD espontánea la expresión fue mayor en células de la granulosa de quistes en relación a los folículos antrales ($p < 0,05$), sin detectarse diferencias con las otras categorías estudiadas ($p > 0,05$). Además, los folículos primarios evidenciaron una mayor expresión en relación a los folículos antrales ($p < 0,05$). Por otro lado, no se observaron diferencias entre las distintas categorías foliculares durante la foliculogénesis a nivel de las células de la teca interna ($p > 0,05$) (figuras 75 y 78).

Cuando cada categoría folicular específica fue comparada entre grupos (control y COD espontánea), no se observaron diferencias en células de la granulosa de folículos preantrales pequeños y grandes, antrales y atrésicos ($p > 0,05$). En los folículos primarios, la expresión fue mayor en controles en relación al grupo de COD espontánea. También, se comparó la expresión de TNF- α en quistes en relación a folículos antrales del grupo control,

detectándose una mayor expresión en quistes con respecto a los folículos antrales del grupo control, tomados como estructuras de referencia ($p < 0,05$) (figuras 76 y 78).

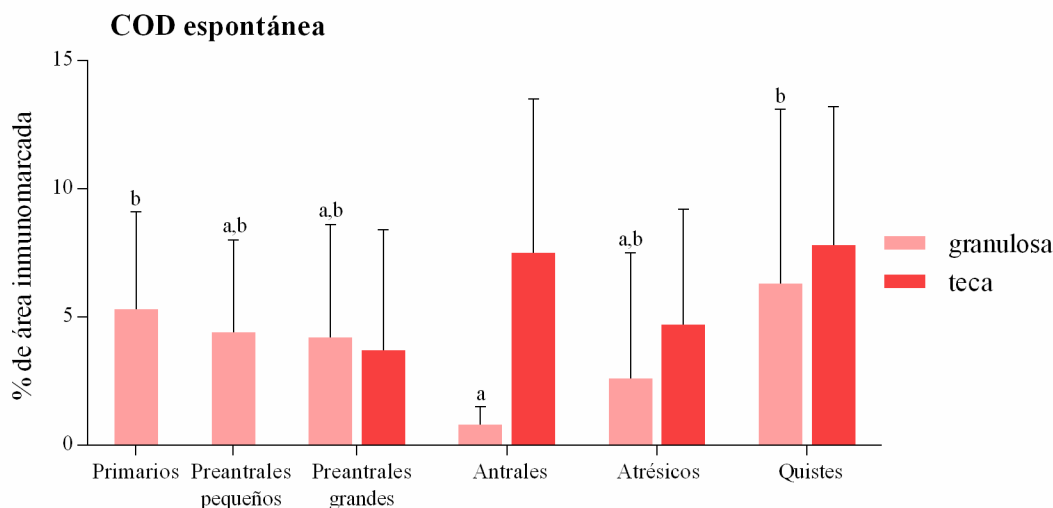


Figura 75: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TNF- α** en el grupo COD espontánea. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares y folículos quísticos. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

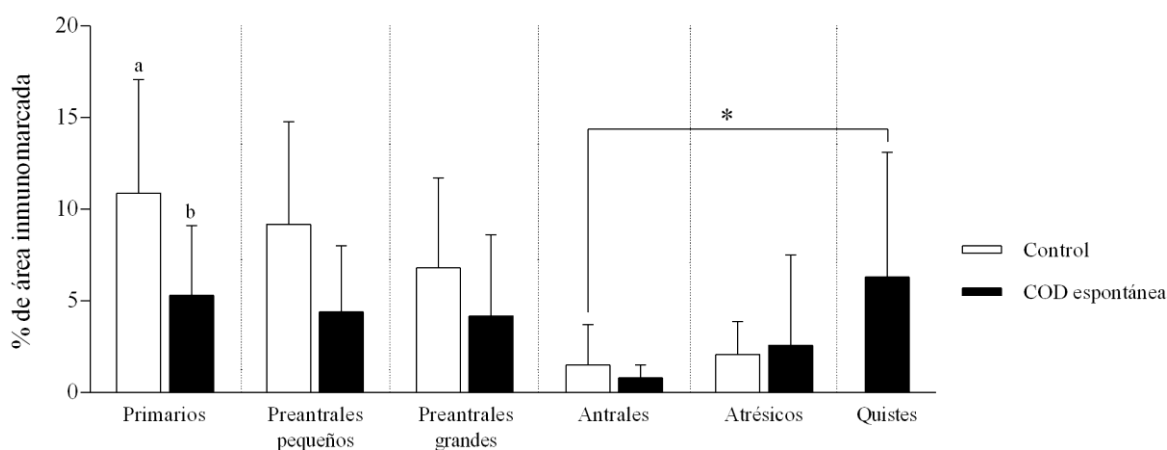


Figura 76: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TNF- α** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontáneo: negro). Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias significativas entre dos categorías foliculares distintas (indicadas por corchetes). Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

En las células de la teca interna no se detectaron diferencias significativas tanto a nivel de células de la granulosa como de la teca. Además, no se hallaron diferencias cuando se compararon quistes en relación a folículos antrales del grupo control que fueron tomadas como estructuras de referencia ($p > 0,05$) (figuras 77 y 78).

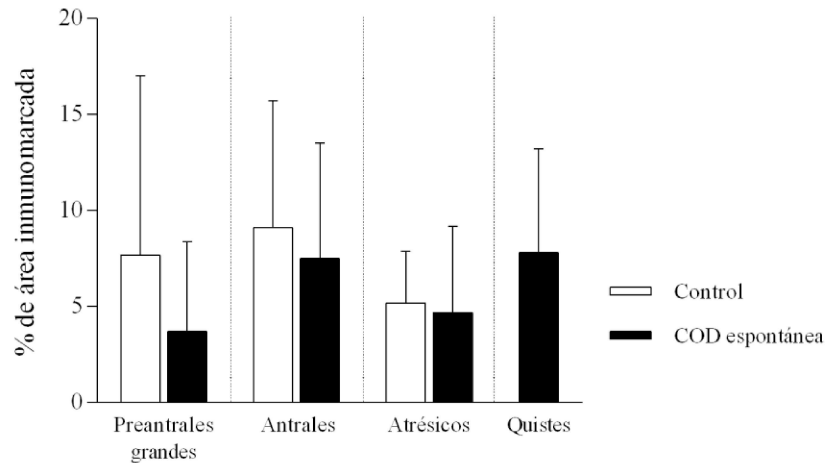


Figura 77: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TNF- α** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (Control: blanco; COD espontánea: negro). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

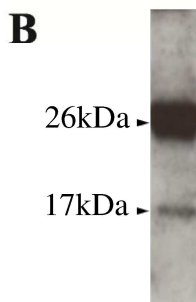
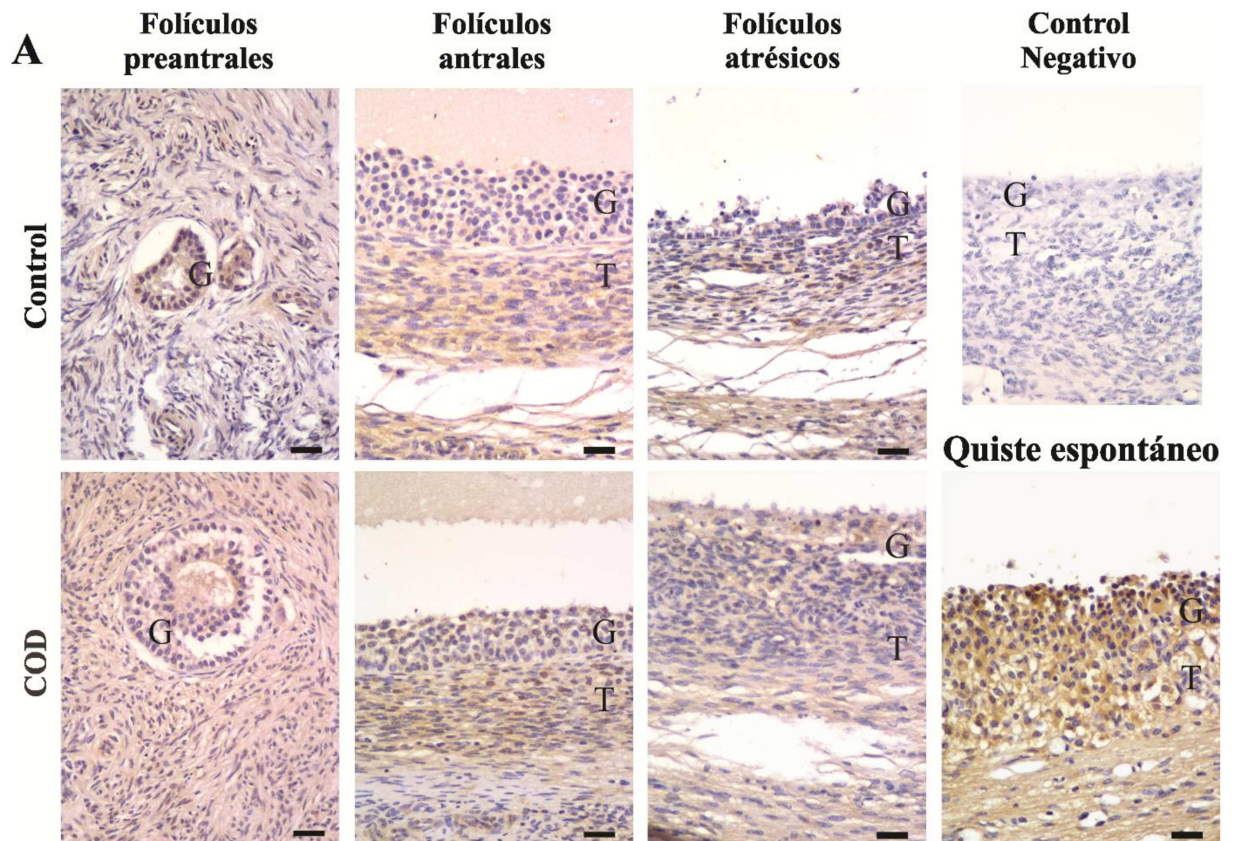


Figura 78: **A.** Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **TNF- α** en animales de los grupos control y COD espontánea. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna. **B.** En el inmunoblot se observan dos bandas, una banda en la zona correspondiente al peso molecular de **TNF- α** forma madura (17 kDa) y otra banda en la zona correspondiente al peso molecular de **TNF- α** pro-proteína (26 kDa).

4.3. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE CITOQUINAS EN ANIMALES CON PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA MEDIANTE PROGESTERONA

En esta sección evaluamos en el modelo de persistencia folicular desarrollado la expresión de todas las citoquinas y receptores evaluados en la COD espontánea. Se analizó la expresión de las proteínas en las categorías de folículos primarios, preantrales pequeños, preantrales grandes, antrales, atrésicos, dominantes (grupo control) y folículos con 0, 5, 10 y 15 días de persistencia.

4.3.1. IL-1 α : Expresión proteica y localización

La IL-1 α fue localizada en el citoplasma de células de la granulosa y teca interna de todos los folículos y grupos analizados. En cada grupo experimental se realizó el análisis de la expresión de esta citoquina a lo largo de la foliculogénesis. En células de la granulosa del grupo P0, la expresión fue mayor en los folículos primarios y preantrales pequeños en relación a los folículos preantrales grandes y antrales ($p < 0,05$). Además, los folículos antrales evidenciaron una menor expresión en relación a los folículos atrésicos y quistes. Por otro lado, en las células de teca, se observó la mayor inmunomarcación en los folículos persistentes en relación al resto de las categorías foliculares evaluadas ($p < 0,05$) (figuras 79 y 85).

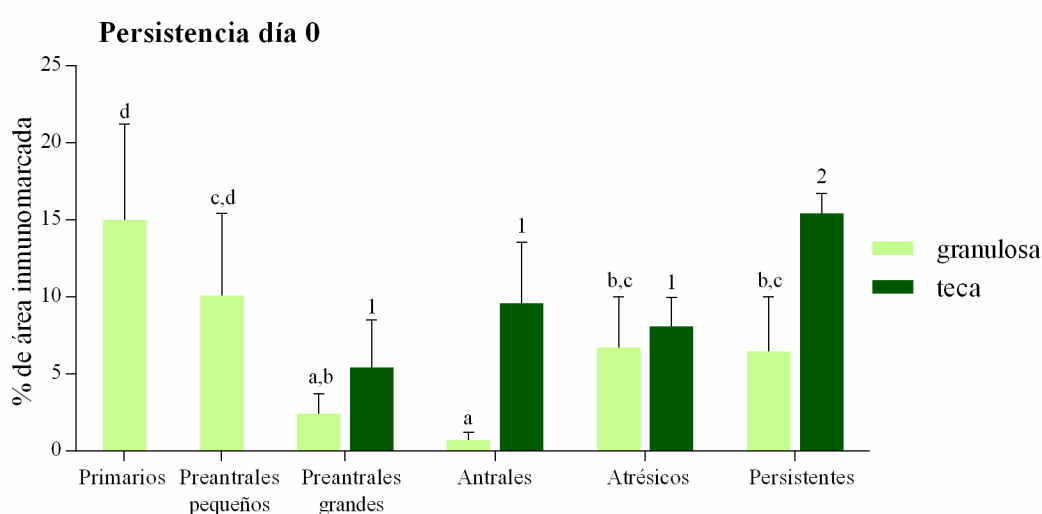


Figura 79: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 α en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo experimental P5, se hallaron similares niveles en la expresión de IL-1 α durante la foliculogénesis, tanto en las células de la granulosa como de la teca (figuras 80 y 85).

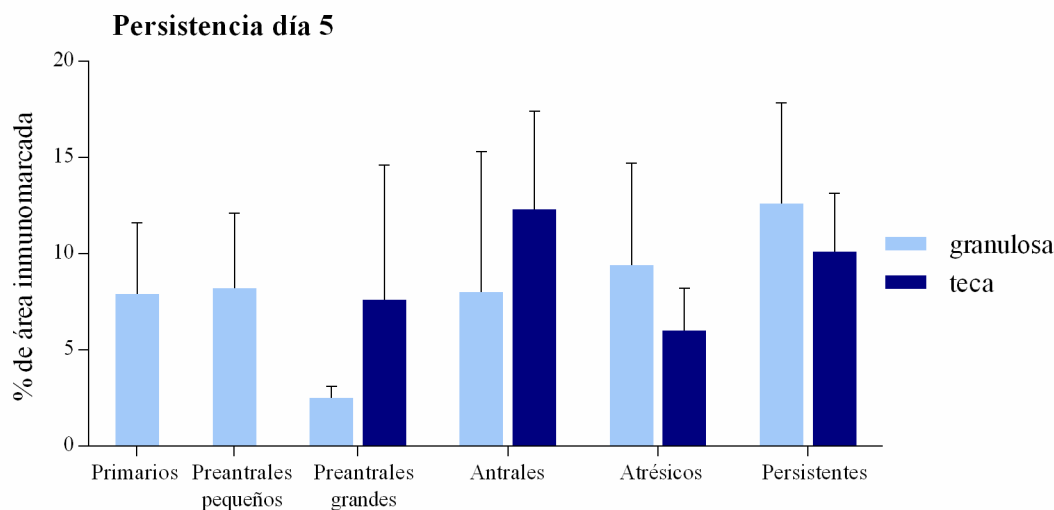


Figura 80: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1 α** en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

La expresión de esta proteína en células de la granulosa del grupo P10, evidenció su mayor marcación en los folículos persistentes en relación al resto de las estructuras evaluadas ($p < 0,05$). Por otro lado, en las células de teca, se observó la mayor inmunomarcación en folículos persistentes en relación a los folículos preantrales grandes y atrésicos ($p < 0,05$), sin diferencias con los folículos antrales ($p > 0,05$) (figuras 81 y 85).

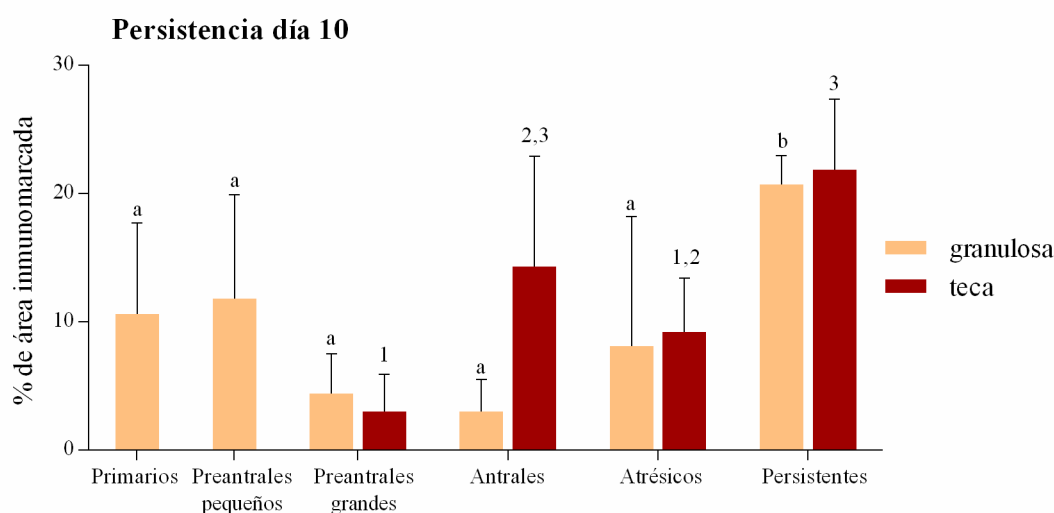


Figura 81: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1 α** en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La expresión de esta proteína en el grupo P15 se comportó de una manera similar a la observada en el grupo P10 (figuras 82 y 85).

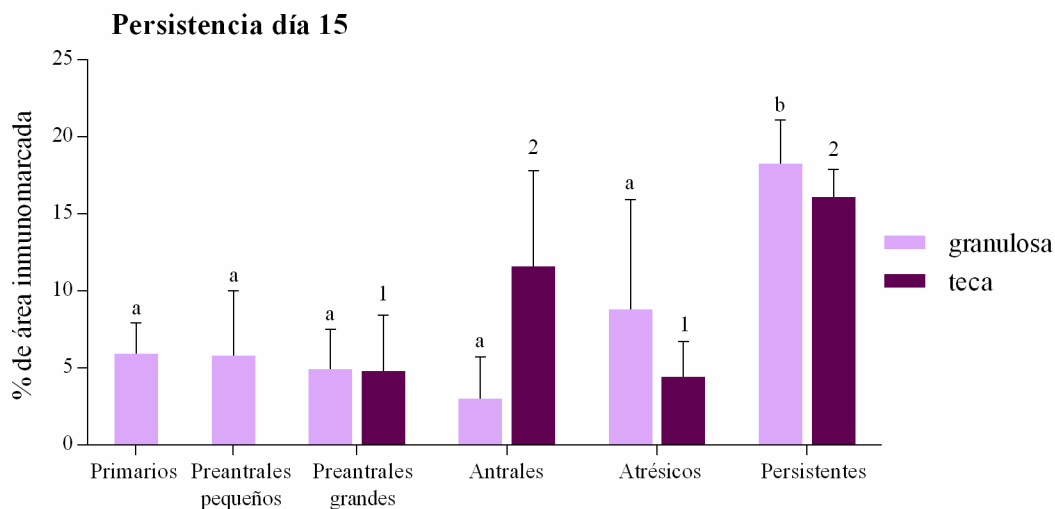


Figura 82: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1 α** en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se comparó la inmunomarcación (células de la granulosa y teca interna por separado) de cada categoría folicular entre los distintos grupos experimentales. La expresión de IL-1 α en células de la granulosa de los folículos primarios fue mayor en el grupo P0 que en los grupos P5 y P15 ($p < 0,05$) sin diferencias con los grupos control y P10. Además, la expresión en los folículos antrales del grupo P5 fue mayor en relación a la misma categoría folicular de los otros grupos ($p < 0,05$). Por otra parte, las células de la granulosa de los folículos dominantes del grupo control (como estructura de referencia) mostraron una menor expresión con respecto a los folículos persistentes de los grupos P5, P10 y P15, mostrando un aumento progresivo a lo largo de los diferentes días de persistencia folicular ($p < 0,05$) (figuras 83 y 85).

En la teca interna, no se encontraron diferencias significativas al comparar las distintas categorías foliculares (figuras 84 y 85).

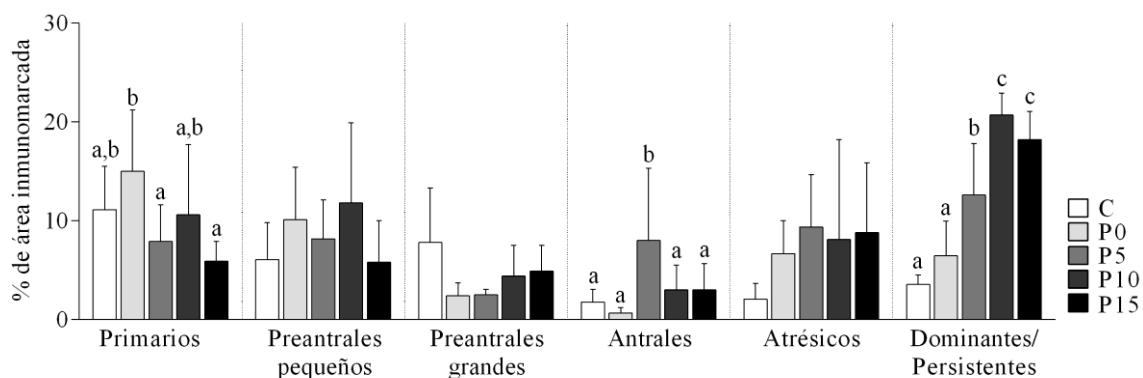


Figura 83: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1 α** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

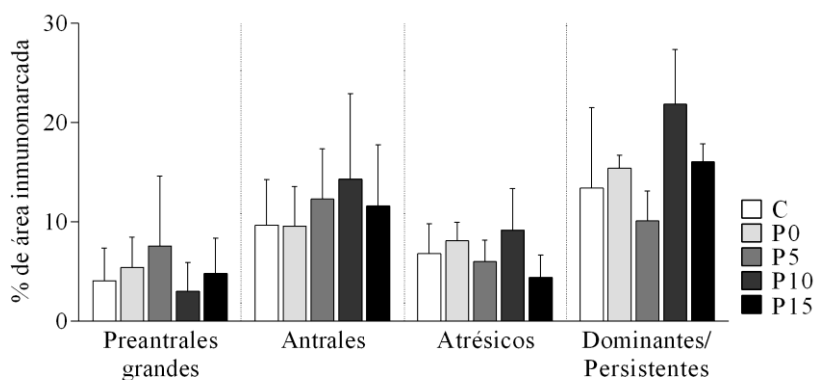


Figura 84: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1 α** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

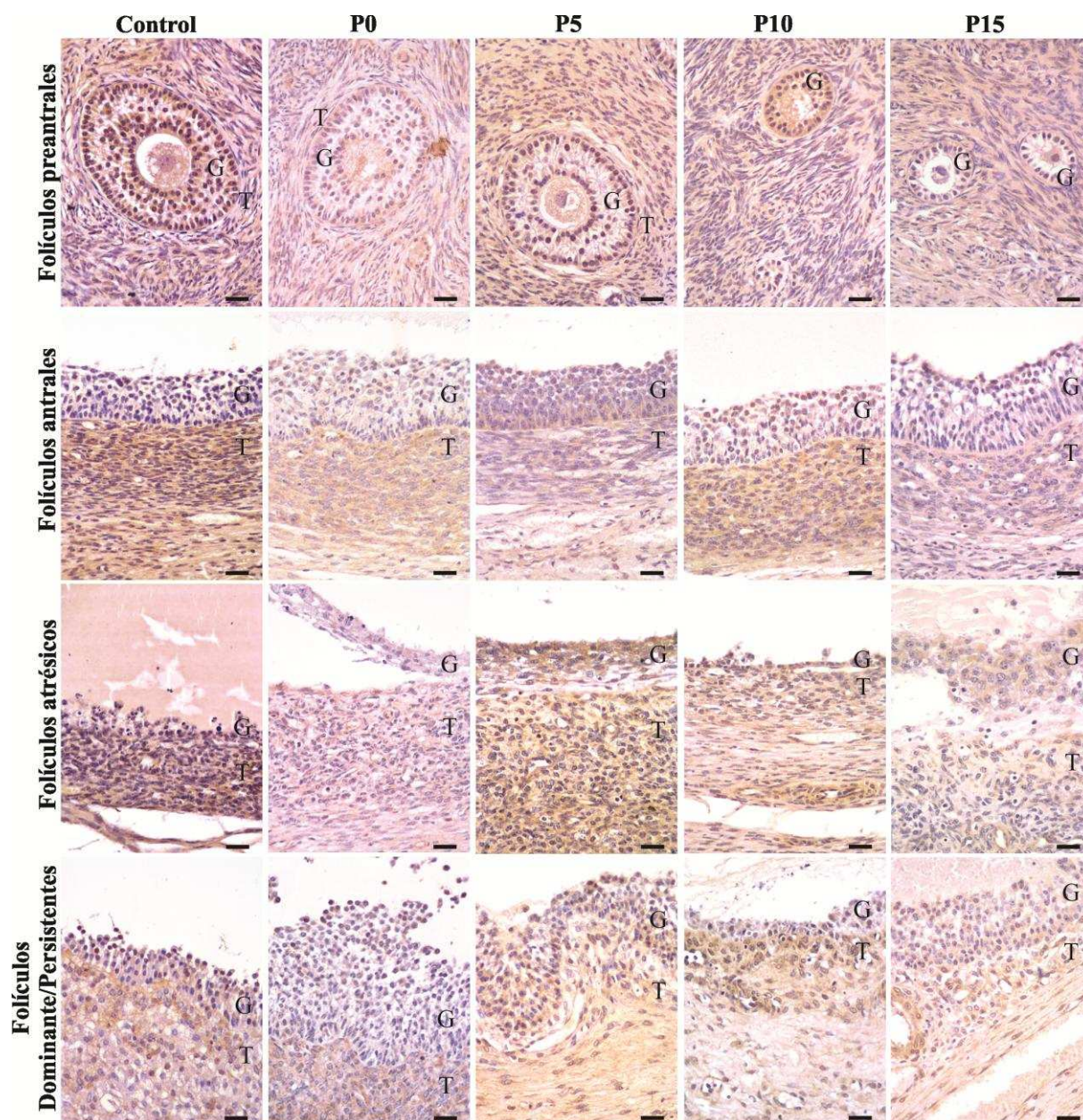


Figura 85: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-1 α** en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μm . G: granulosa, T: teca interna.

4.3.2. *IL-1 β*

4.3.2.1. *Expresión proteica y localización*

Se detectó marcación positiva para *IL-1 β* en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares evaluadas dentro de cada grupo. La *IL-1 β* mostró un patrón de expresión característico a nivel de las células de la granulosa, siendo mayor en éstas últimas en relación a las células de la teca (figura 92).

La evaluación de *IL-1 β* a través de la foliculogénesis dentro de cada grupo en estudio, evidenció que la expresión en células de la granulosa en el grupo P0 fue significativamente

mayor en la categoría de los folículos preantrales pequeños, antrales y persistentes en relación a los folículos atrésicos ($p < 0,05$), sin mostrar diferencias con el resto de las estructuras evaluadas ($p > 0,05$). Sumado a esto, la expresión en las células de la teca interna fue significativamente mayor en los folículos persistentes en relación a las demás estructuras evaluadas (figuras 86 y 92).

A los 5, 10 y 15 días de persistencia no se evidenciaron diferencias en la expresión de IL-1 β a través de la foliculogénesis, tanto en células de la granulosa como en células de la teca interna (figuras 87, 88, 89 y 92).

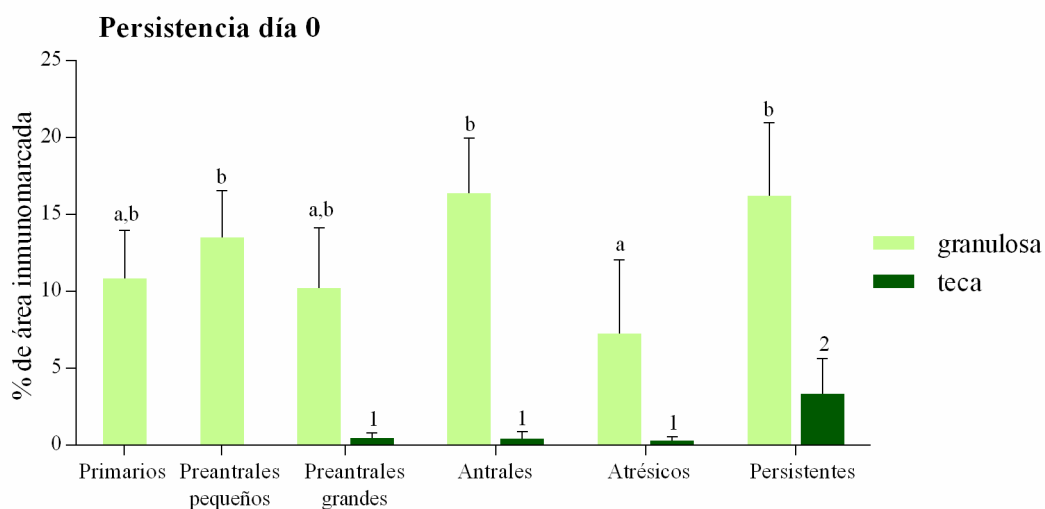


Figura 86: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 β en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

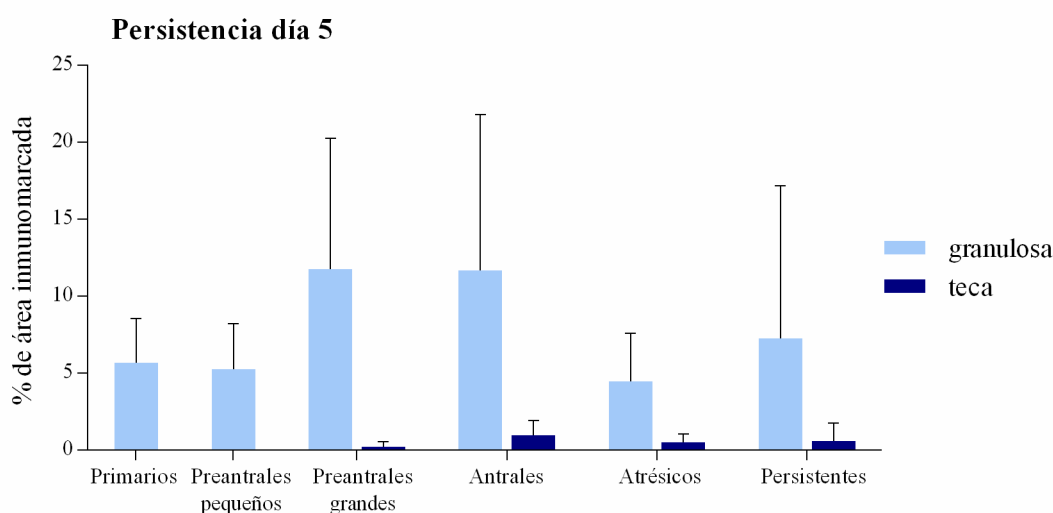


Figura 87: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-1 β en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

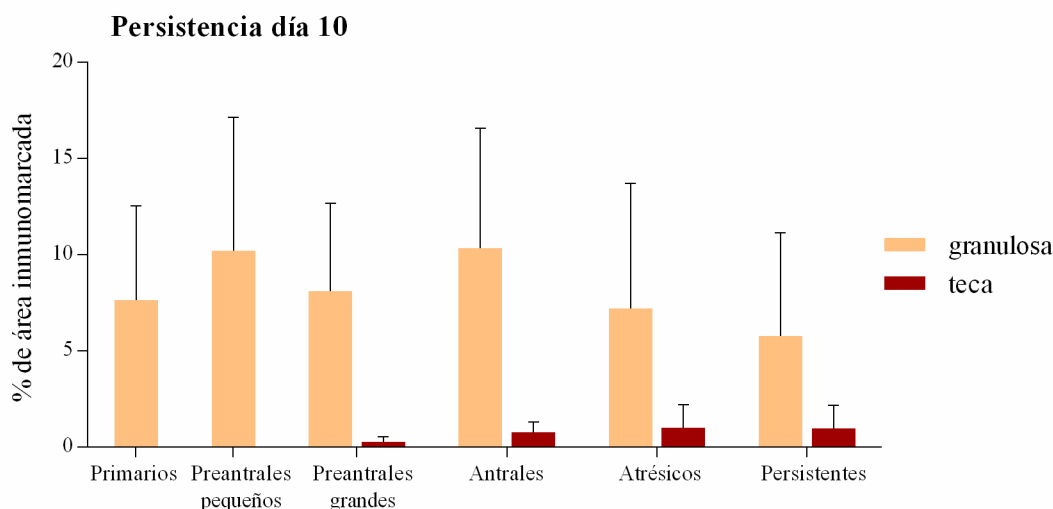


Figura 88: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1 β** en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

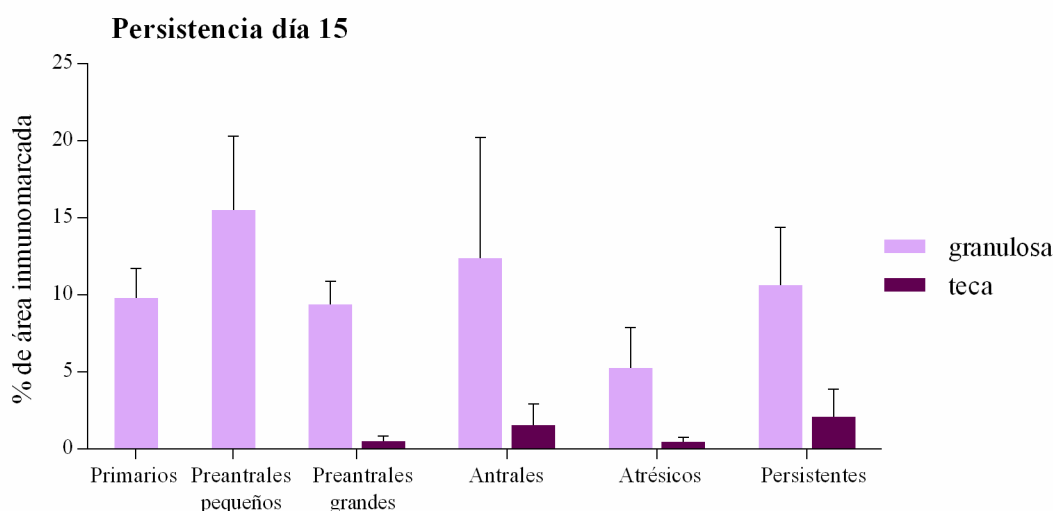


Figura 89: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1 β** en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

El análisis de la expresión entre grupos en estudio permitió detectar, en células de la granulosa una disminución en la expresión de **IL-1 β** en los folículos preantrales pequeños de los grupos control y P5 en relación a los de los grupos P0 y P15 ($p < 0,05$) sin diferencias con el grupo P10 ($p > 0,05$) (figuras 90 y 92).

En la teca interna, no se encontraron diferencias significativas al comparar las distintas categorías foliculares (figuras 91 y 92).

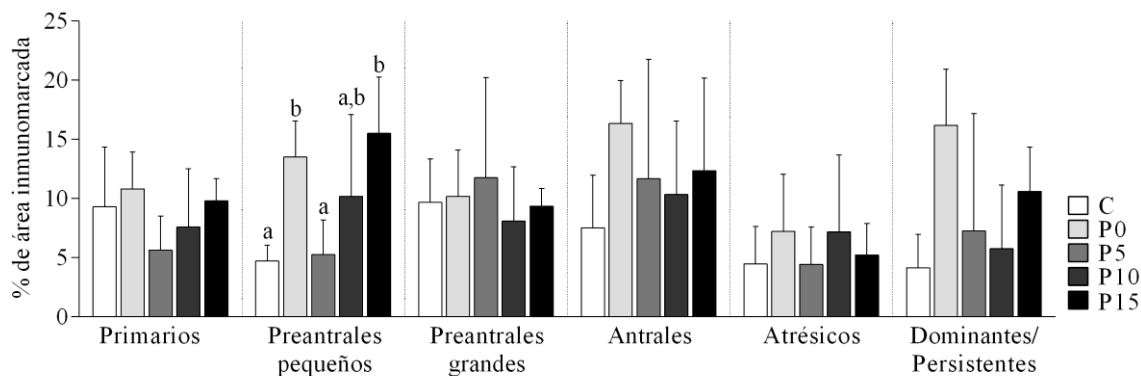


Figura 90: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de $IL-1\beta$ en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

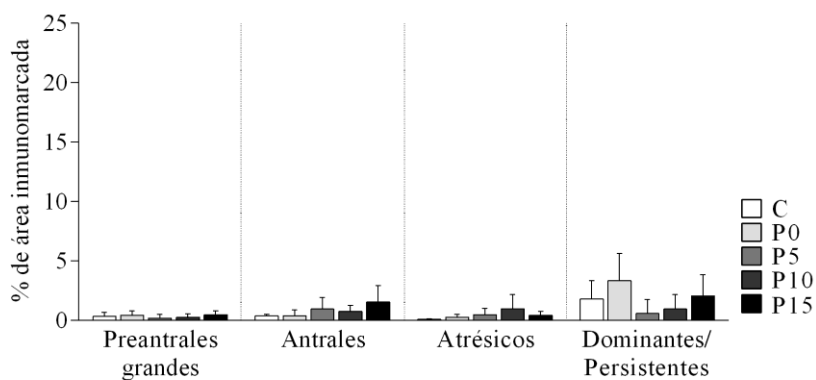


Figura 91: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de $IL-1\beta$ en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

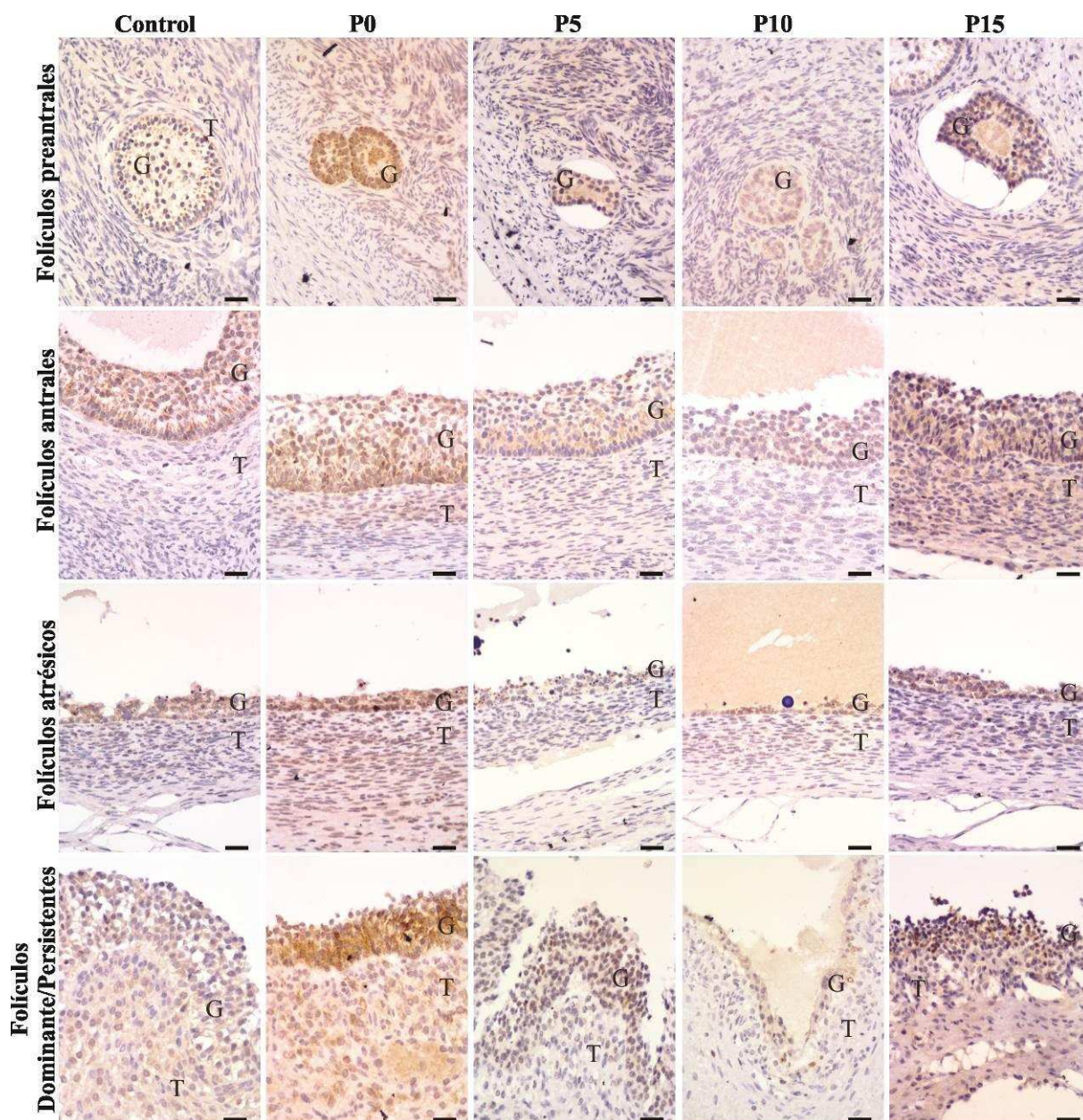


Figura 92: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-1 β** en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna.

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

Se evaluó la concentración folicular y sérica de *IL-1 β* en muestras de los grupos control y de persistencia folicular. Como se puede observar en la figura 93, la concentración de *IL-1 β* fue similar en animales control y tratados. La comparación entre concentración en LF y suero no mostró diferencias significativas en los grupos control, P5, P10 y P15. Sin embargo, en el grupo P0, los niveles de *IL-1 β* fueron mayores en suero que en LF ($p < 0,05$).

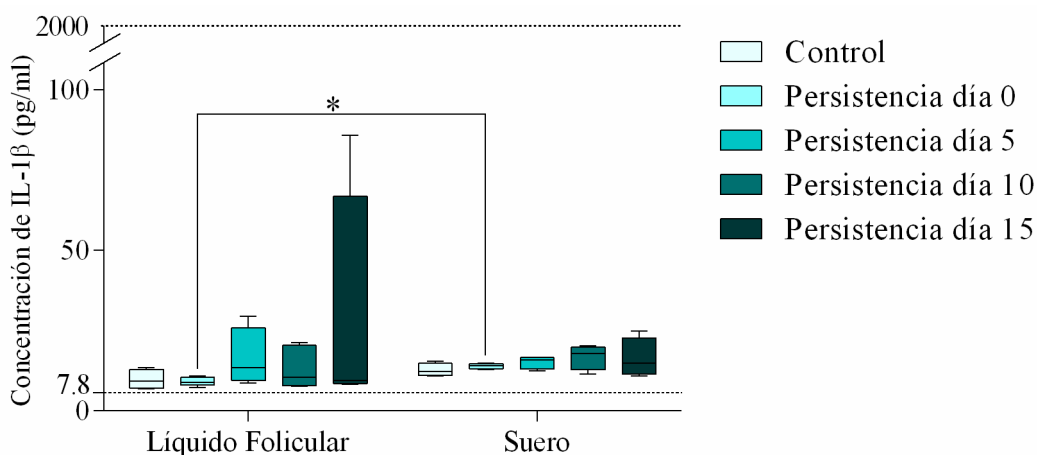


Figura 93: Concentración de **IL-1β** en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro), P0, P5, P10 y P15. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias entre LF y suero dentro de un mismo grupo (indicadas por corchetes) ($p < 0,05$).

4.3.3. *IL-1RA: Expresión proteica y localización*

Se detectó marcación positiva para IL-1RA en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares evaluadas dentro de cada grupo. Al realizar el análisis de la expresión de IL-1RA a través de la foliculogénesis, en células de la granulosa del grupo P0, la expresión fue mayor en los folículos preantrales pequeños en relación a los folículos primarios, preantrales grandes, antrales y persistentes ($p < 0,05$), sin diferencias con los folículos atrésicos ($p > 0,05$). En las células de la teca interna el nivel de expresión fue significativamente mayor en los folículos persistentes respecto a las restantes estructuras evaluadas (figuras 94 y 100).

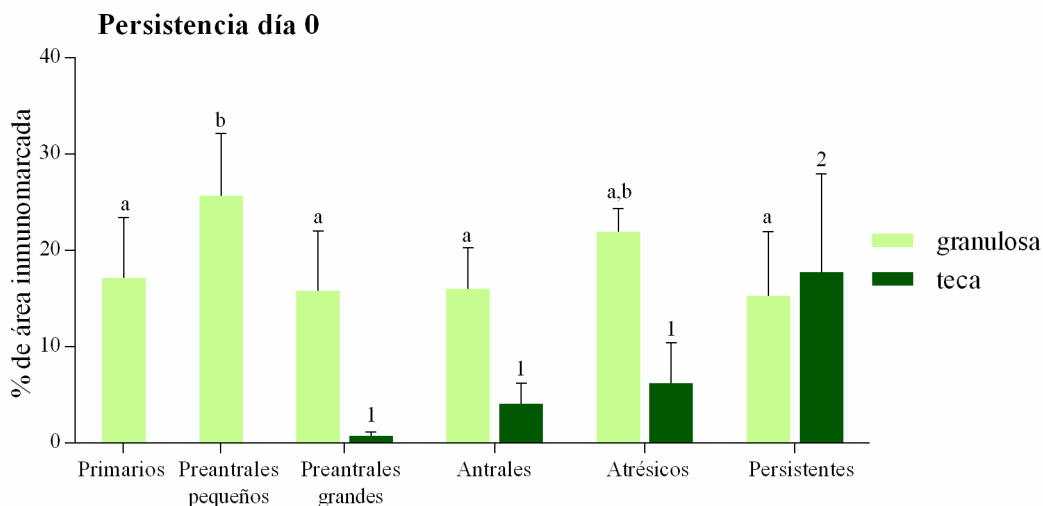


Figura 94: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RA** en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A los 5 y 10 días de persistencia no se evidenciaron diferencias en la expresión de IL-1RA a través de la foliculogénesis, tanto en células de la granulosa como en células de la teca interna (figuras 95, 96 y 100).

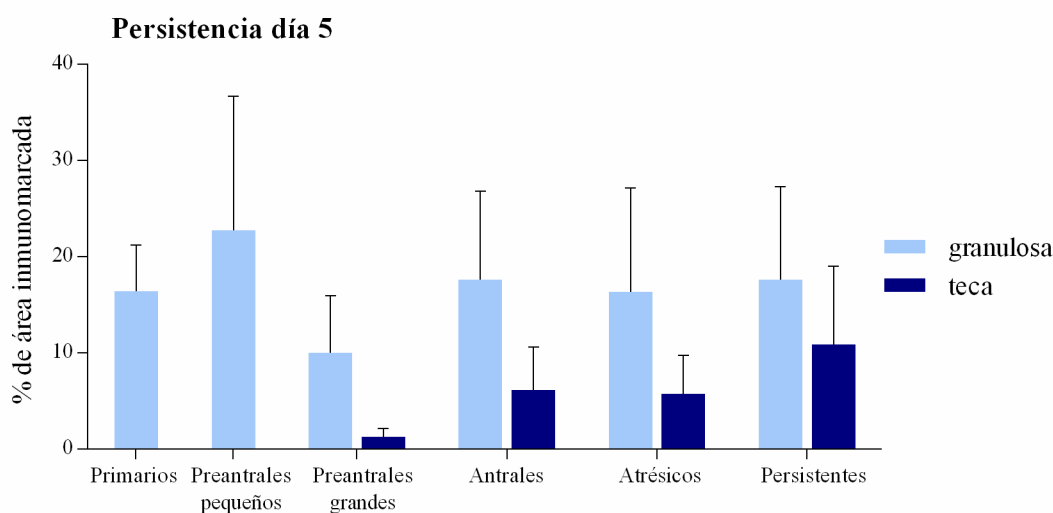


Figura 95: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RA** en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

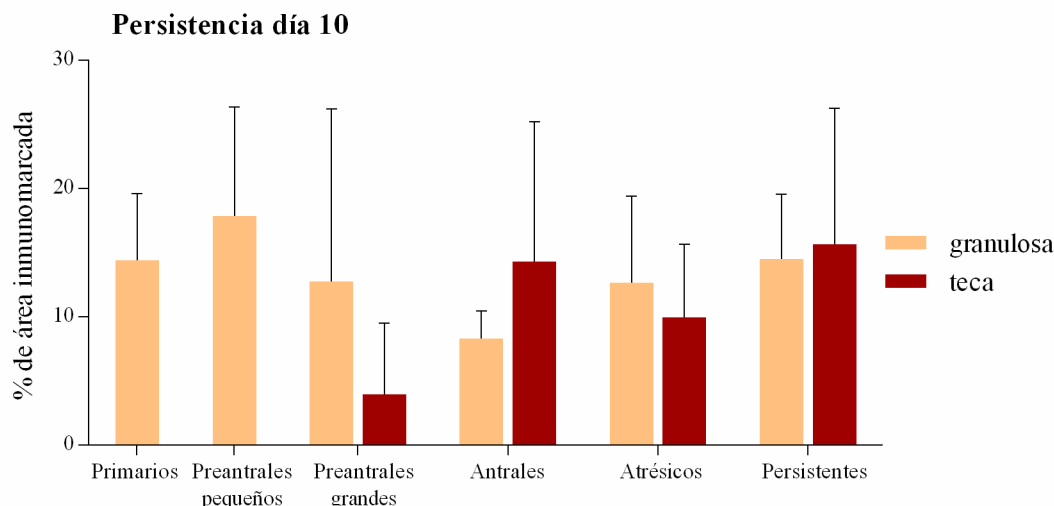


Figura 96: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RA** en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

En células de la granulosa del grupo P15, la expresión fue mayor en los folículos persistentes en relación a los folículos primarios, preantrales y antrales ($p < 0,05$), sin diferencias con los folículos atrésicos ($p > 0,05$). En las células de la teca interna el nivel de expresión fue significativamente mayor en los folículos persistentes respecto a las restantes estructuras evaluadas (figuras 97 y 100).

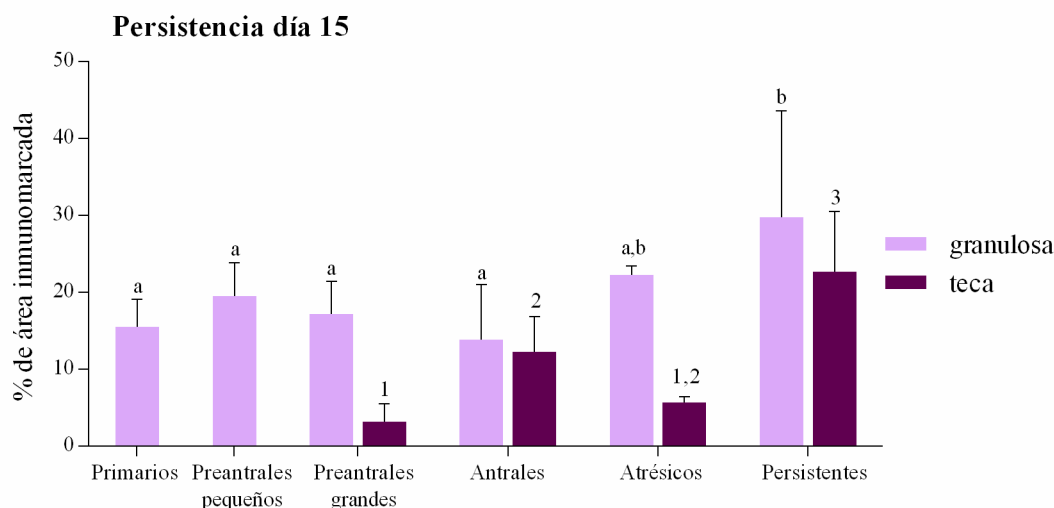


Figura 97: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RA** en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado, en el análisis entre grupos pudo detectarse que en células de la granulosa los folículos antrales del grupo P5 mostraron mayor expresión que los de los grupos control y P10 ($p < 0,05$), sin diferencias con los grupos P0 y P15 ($p > 0,05$). Los folículos atrésicos la

expresión de IL-1RA fue mayor en los grupos P0 y P15 que en el grupo control ($p < 0,05$), sin diferencias con los grupos P5 y P10 ($p > 0,05$). Por otra parte, las células de la granulosa de los folículos persistentes del grupo P15 evidenciaron una mayor expresión que los folículos dominantes del grupo control (como estructura de referencia) y que los folículos persistentes de los grupos P0 y P10 ($p < 0,05$) (figuras 98 y 100).

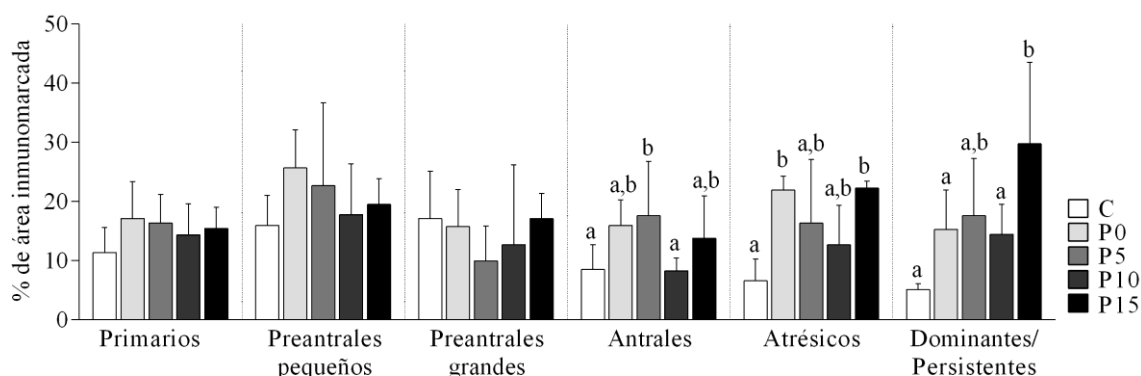


Figura 98: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RA** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

En las células de la teca interna, los folículos atrésicos evidenciaron que la expresión de IL-1RA fue menor en el grupo control que en los grupos P10 y P15 ($p < 0,05$), sin diferencias con los otros grupos ($p > 0,05$) (figuras 99 y 100).

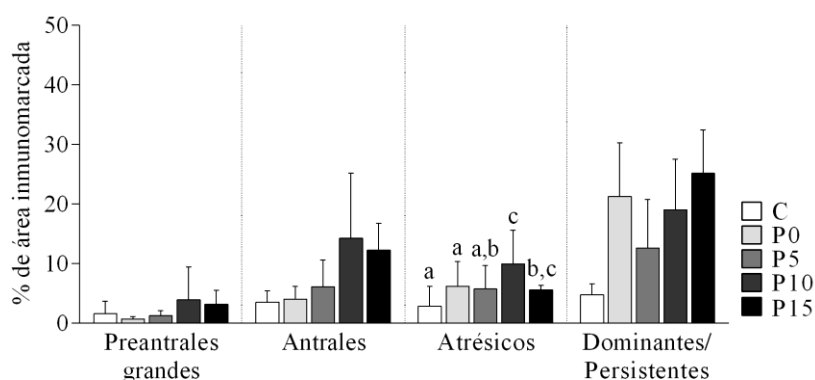


Figura 99: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RA** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

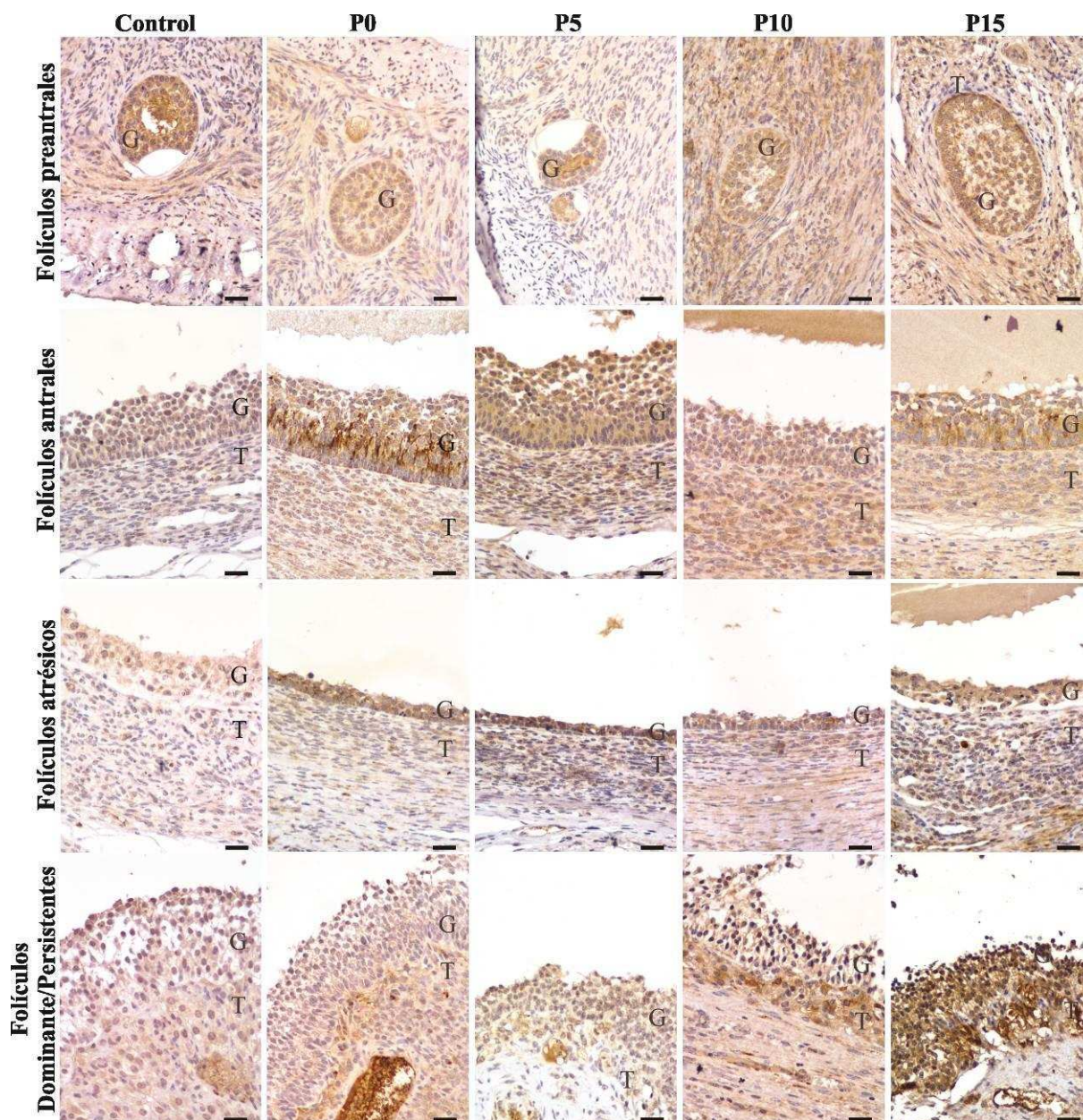


Figura 100: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-1RI** en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μm . G: granulosa, T: teca interna.

4.3.4. *IL-1RI: Expresión proteica y localización*

El IL-1RI fue localizado en el citoplasma de células de la granulosa y teca interna de todos los folículos y grupos analizados.

En la evaluación de IL-1RI a través de la foliculogénesis no se evidenciaron diferencias en la expresión dentro de cada grupo en estudio, tanto en células de la granulosa como en células de la teca interna (figuras 101, 102, 103, 104 y 107).

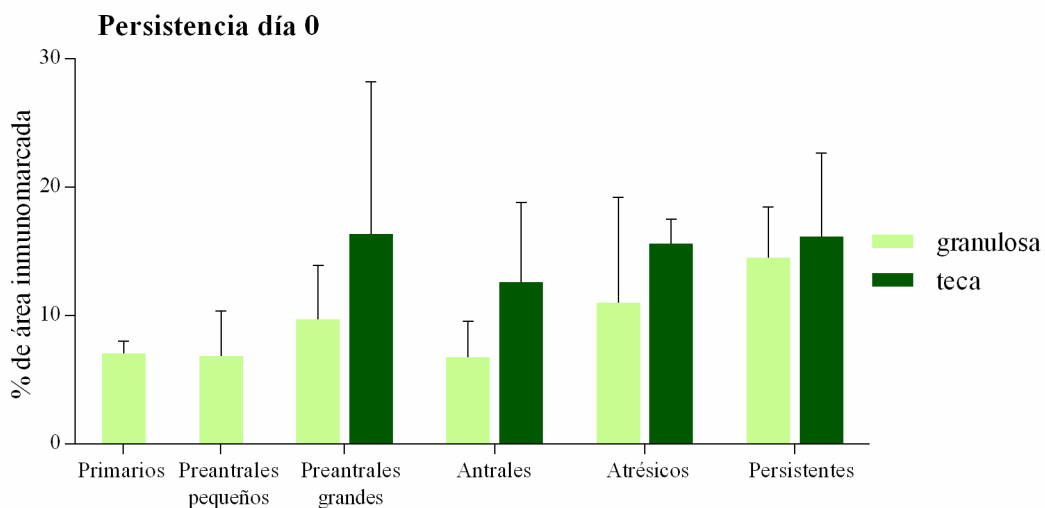


Figura 101: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RI** en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

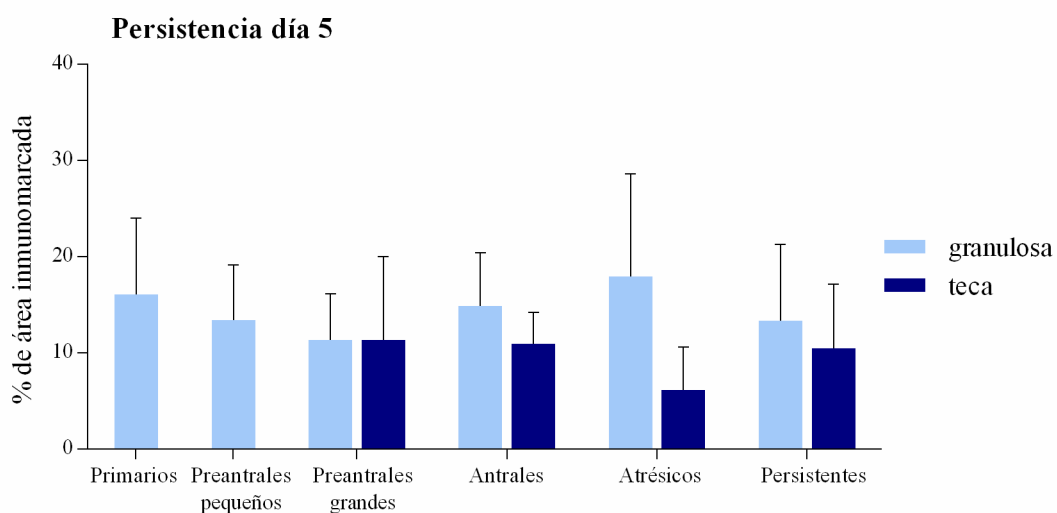


Figura 102: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RI** en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

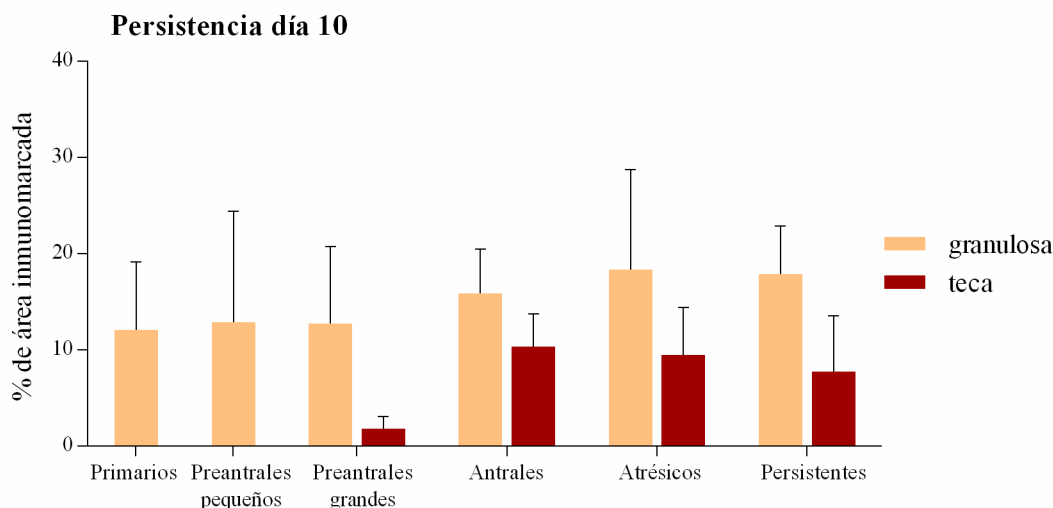


Figura 103: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RI** en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

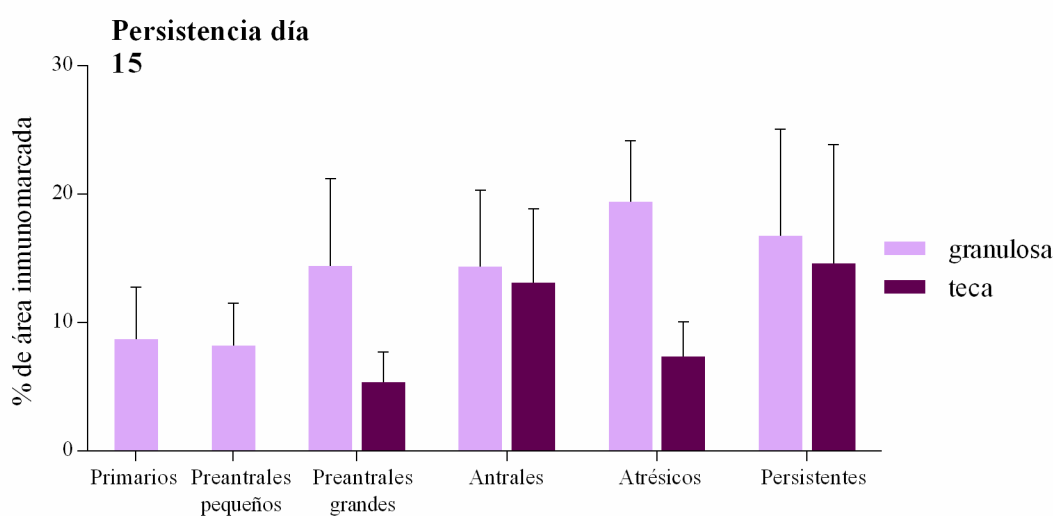


Figura 104: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RI** en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Se realizó un análisis de la expresión en células de la granulosa y de la teca interna por categoría folicular entre los distintos grupos. En células de la granulosa, la expresión de IL-1RI fue menor en los folículos antrales del grupo P0 que en los de los grupos P5, P10 y P15 ($p < 0,05$) sin diferencias con el grupo control ($p > 0,05$) (figuras 105 y 107).

En la teca interna, no se evidenciaron diferencias significativas al comparar las distintas categorías foliculares (figuras 106 y 107).

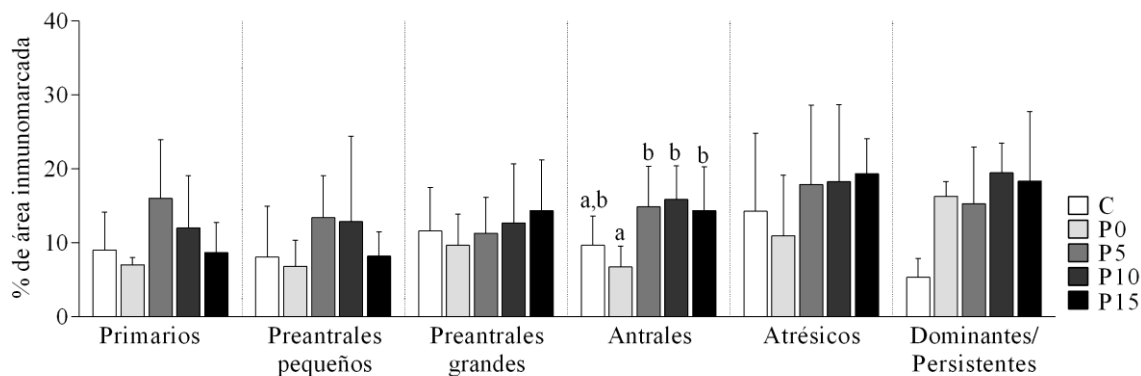


Figura 105: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RI** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

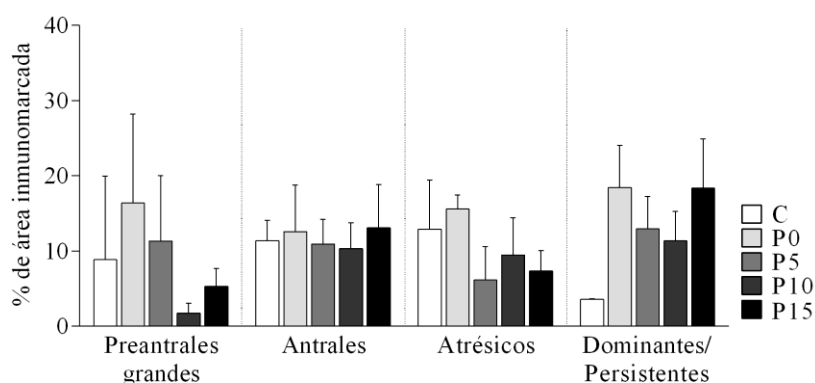


Figura 106: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RI** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

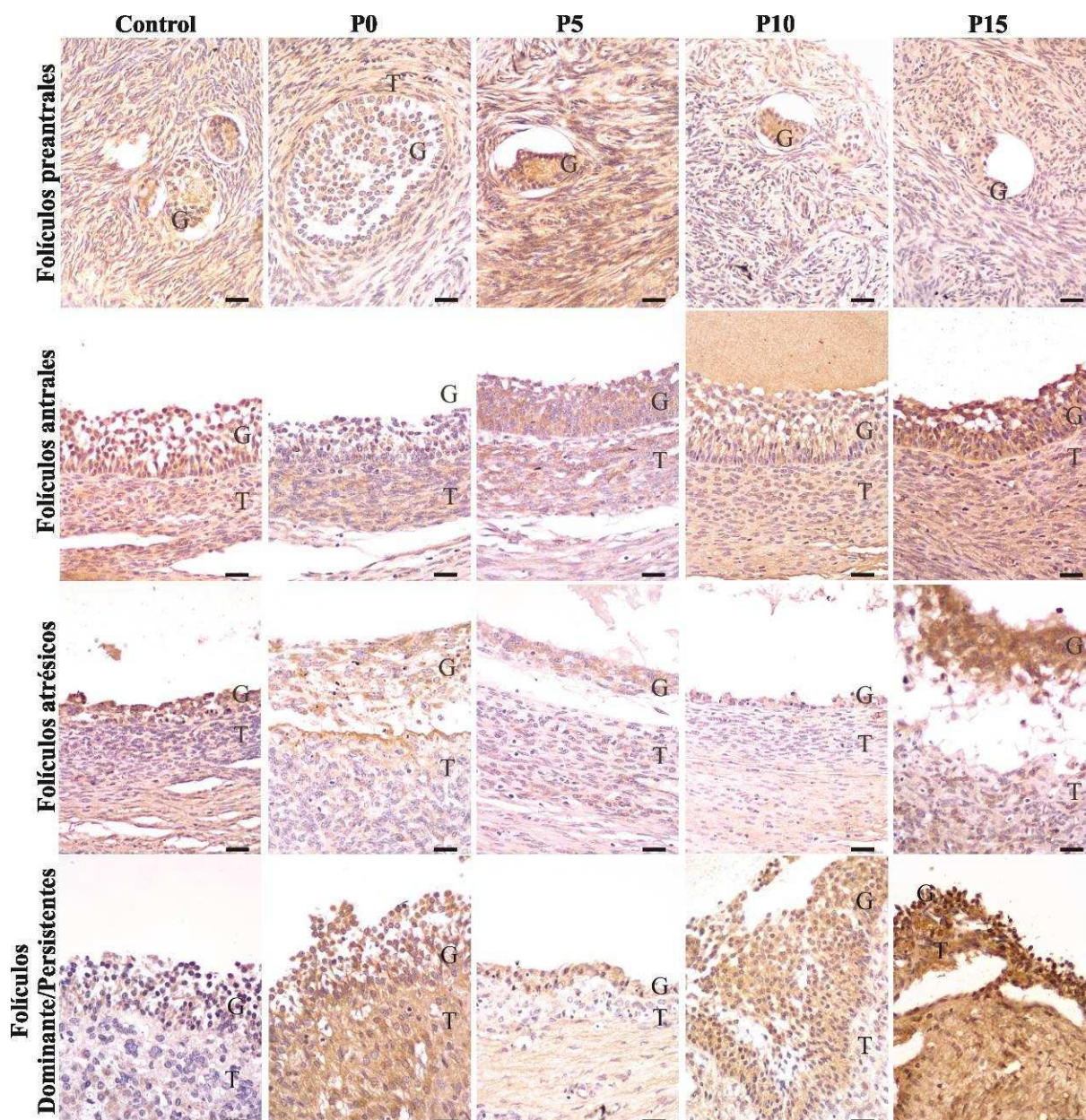


Figura 107: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-1RI** en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μm . G: granulosa, T: teca interna.

4.3.5. *IL-1RII: Expresión proteica y localización*

Se detectó marcación positiva para IL-1RII en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares evaluadas dentro de cada grupo. La expresión en células de la granulosa en el grupo P0 fue significativamente mayor en la categoría de los folículos primarios, preantrales pequeños y atrésicos en relación a los folículos antrales ($p < 0,05$), sin diferencias con los folículos preantrales grandes y persistentes ($p > 0,05$). No se detectaron diferencias en la expresión en las células de la teca interna del grupo P0 (figura 108).

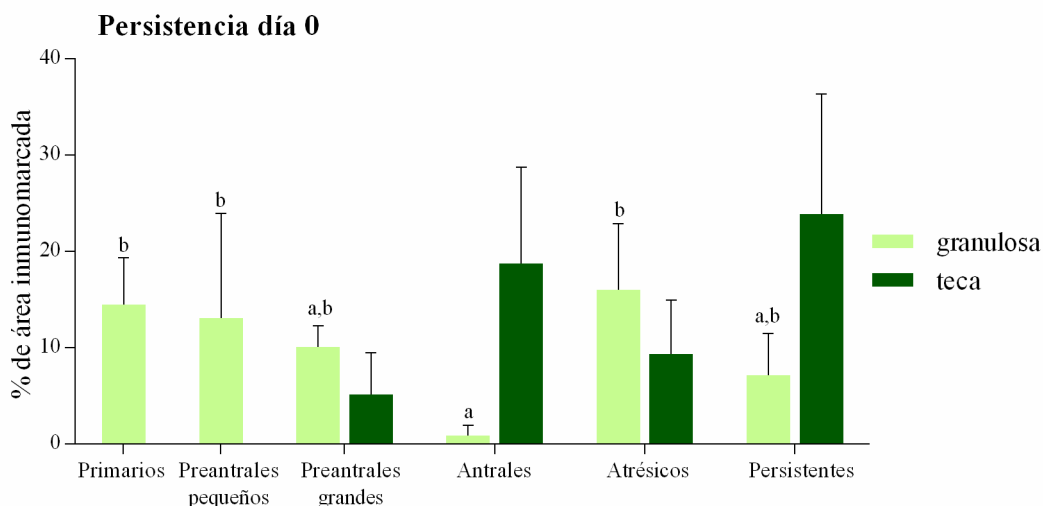


Figura 108: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RII** en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La expresión en células de la granulosa en el grupo P5 fue mayor en los folículos atrésicos en relación al resto de las categorías evaluadas ($p < 0,05$) (figuras 109 y 114). No se encontraron diferencias en la expresión en las células de la teca interna del grupo P5 (figura 109).

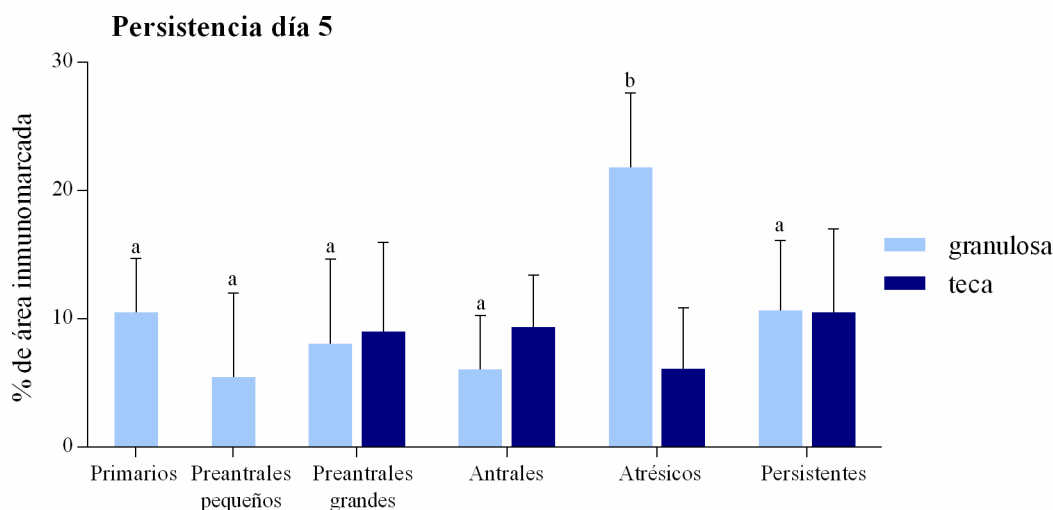


Figura 109: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RII** en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo P10, detectamos que las células de la granulosa de los folículos persistentes evidenciaron una expresión mayor en relación a los folículos preantrales

(pequeños y grandes) y antrales ($p < 0,05$), sin mostrar diferencias con los folículos atrésicos y primarios (figuras 110 y 114). No se encontraron diferencias en la expresión en las células de la teca interna del grupo P10 (figura 110).

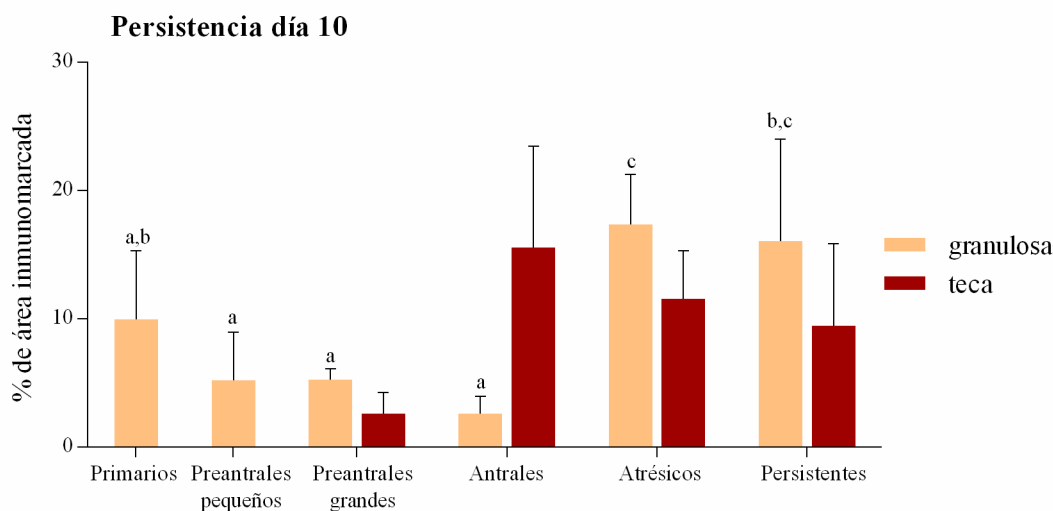


Figura 110: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RII** en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A los 15 días de persistencia, en células de la granulosa durante el desarrollo folicular se determinó una mayor expresión en folículos atrésicos y persistentes en comparación con los folículos primarios, preantrales y antrales ($p < 0,05$). Además, en las células de la teca interna, los folículos antrales presentaron mayor expresión en relación a los folículos preantrales grandes y atrésicos ($p < 0,05$) (figuras 111 y 114).

Se realizó un análisis de la expresión en células de la granulosa y de la teca interna por categoría folicular entre los distintos grupos en estudio. En las células de la granulosa de folículos antrales, la expresión fue mayor en los grupos P5 y P15 que en el resto de los grupos ($p < 0,05$). Además, en los folículos persistentes, la expresión fue mayor en los grupos P5, P10 y P15 que en los folículos dominantes del grupo control (como estructura de referencia). A su vez, la expresión de IL-1RII fue mayor en los folículos persistentes del grupo P15 en relación a la misma estructura de los grupos P0 y P5 ($p < 0,05$) (figuras 112 y 114).

En las células de la teca de los folículos persistentes, la expresión de IL-1RII fue mayor en el grupo P0 en relación a los otros grupos ($p < 0,05$), sin diferencias en el resto de las categorías foliculares en estudio ($p > 0,05$) (figuras 113 y 114).

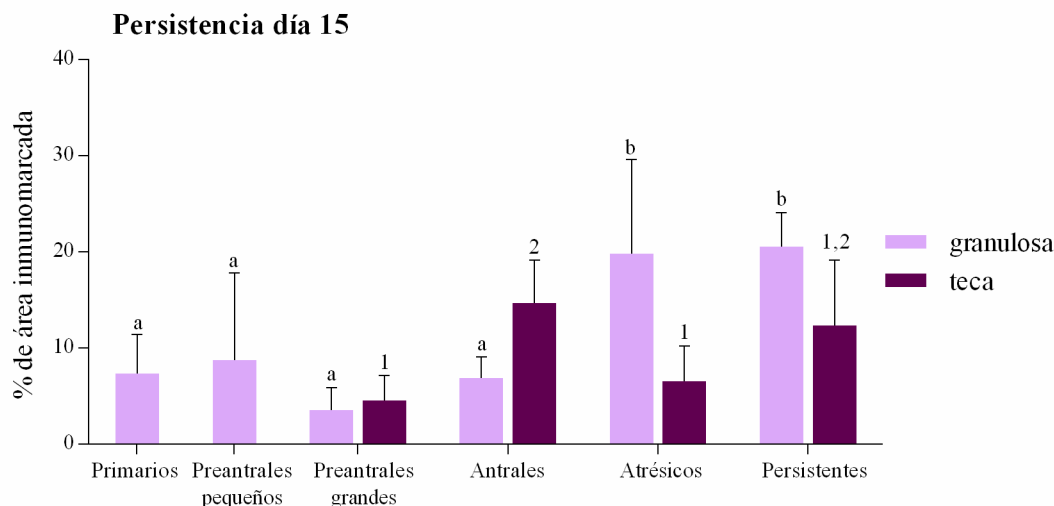


Figura 111: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RII** en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

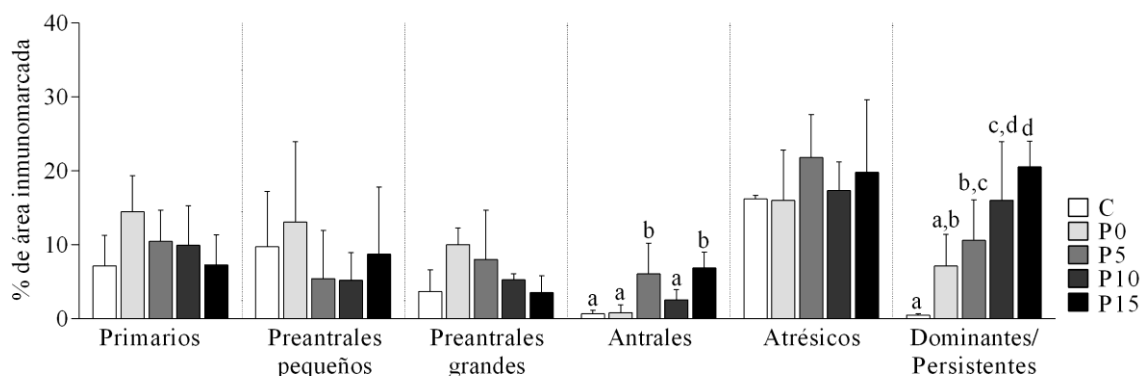


Figura 112: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RII** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

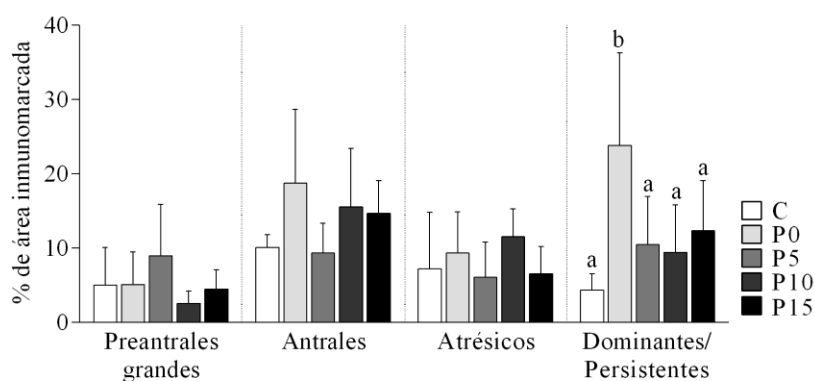


Figura 113: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-1RII** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

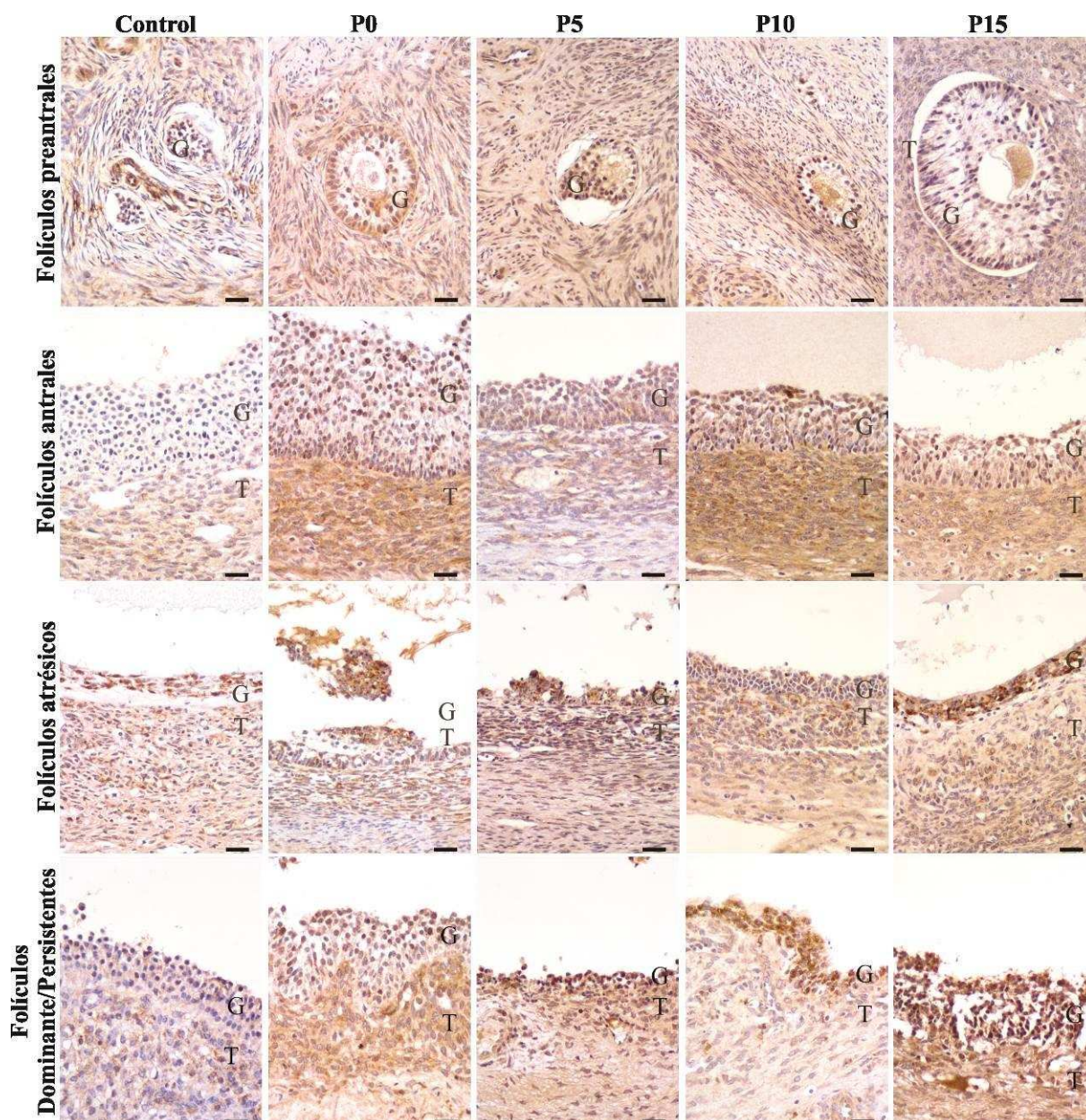


Figura 114: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-1RII** en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna.

4.3.6. IL-4

4.3.6.1. Expresión proteica y localización

Se detectó marcación positiva para IL-4 en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares evaluadas dentro de cada grupo. Al realizar el análisis de la expresión de IL-4 a través de la foliculogénesis, se detectó que en células de la granulosa del grupo P0, la expresión fue mayor en los folículos atrésicos y persistentes en relación a los folículos primarios y antrales ($p < 0,05$), sin evidenciar diferencias con los folículos preantrales ($p > 0,05$). Para las células de la teca interna la

marcación fue significativamente mayor en los persistentes respecto a las demás estructuras en estudio (figuras 115 y 121).

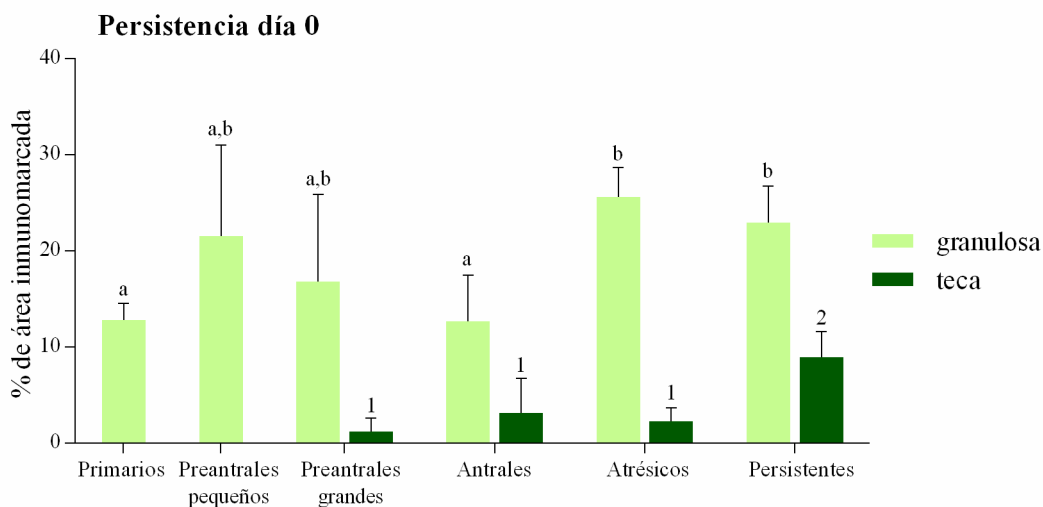


Figura 115: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-4** en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A los 5 días de persistencia observamos que la expresión de IL-4 fue significativamente mayor en los folículos atrésicos con respecto a folículos primarios y preantrales ($p < 0,05$), sin evidenciar diferencias con los folículos antrales y persistentes ($p > 0,05$). A nivel de las células de la teca no se observaron diferencias estadísticas significativas (figuras 116 y 121).

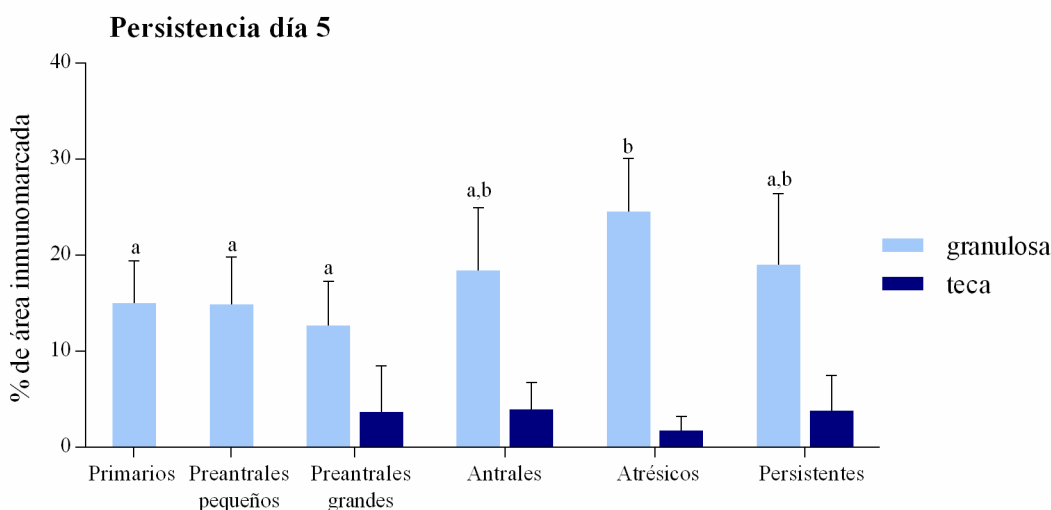


Figura 116: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-4** en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En células de la granulosa del grupo P10 los niveles de expresión de IL-4 fueron similares largo de la folículoogénesis. En las células de la teca se detectó un aumento en la expresión de esta proteína en los folículos antrales en relación a los preantrales grandes (figuras 117 y 121), ($p < 0,05$).

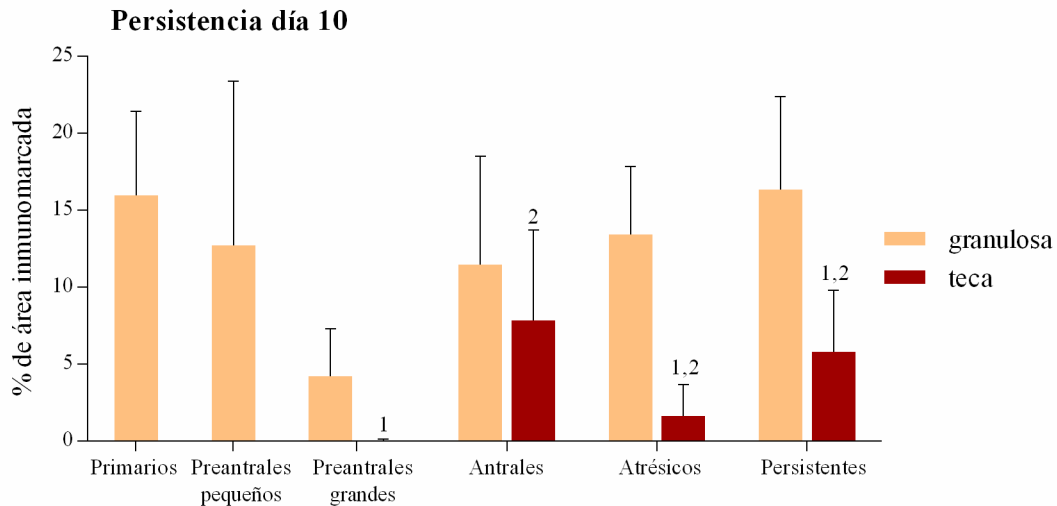


Figura 117: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-4 en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el grupo P15 fue detectado un aumento de IL-4 en las células de la granulosa de los folículos persistentes en relación a los folículos preantrales grandes, y a su vez los folículos atrésicos mostraron una mayor expresión en comparación a los folículos primarios y preantrales. En las células de la teca se detectó la mayor expresión proteica en los folículos antrales en relación a los folículos preantrales grandes y atrésicos. A su vez los folículos persistentes evidenciaron una mayor expresión que los preantrales grandes ($p < 0,05$) (figuras 118 y 121).

En el análisis entre los grupos pudo detectarse que en las células de la granulosa, la expresión en los folículos primarios fue mayor en los grupos P5, P10 y P15 que en el grupo control ($p < 0,05$). Además, la expresión en folículos antrales del grupo P15 fue mayor que en los grupos control, P0 y P10 ($p < 0,05$). En los folículos atrésicos, la expresión fue menor en el grupo P10 que en todos los otros grupos ($p < 0,05$). Además, la expresión en los folículos dominantes del grupo control (como estructura de referencia) fue menor que en todos los grupos de persistencia ($p < 0,05$) (figuras 119 y 121).

En las células teca, la expresión en los folículos antrales fue mayor en el grupo P15 que en los grupos control, P0 y P5 ($p < 0,05$), sin diferencias con el grupo P10 ($p > 0,05$). Por otra parte, la expresión en los folículos dominantes del grupo control (como estructura de

referencia) fue menor que en los folículos persistentes de los grupos P0 y P15 ($p < 0,05$) (figuras 120 y 121).

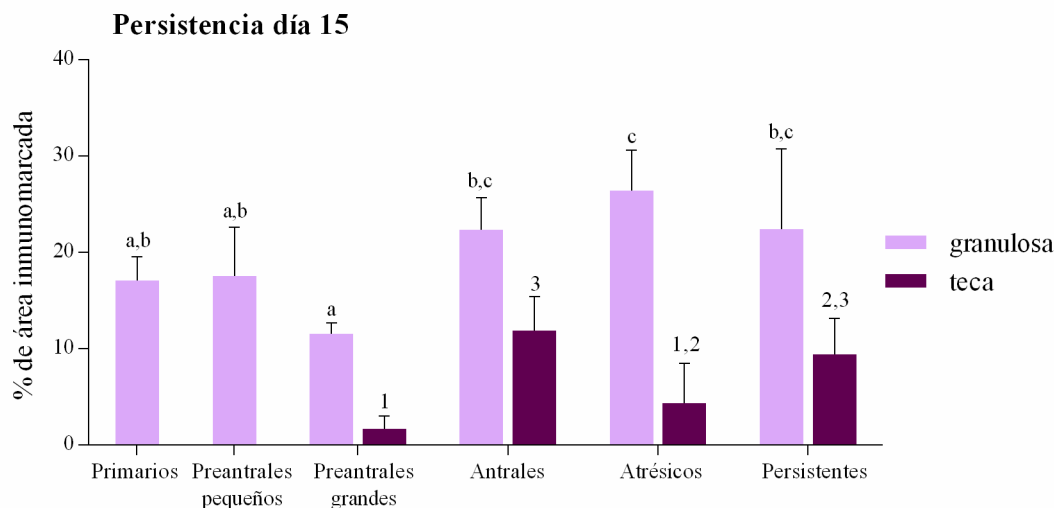


Figura 118: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-4** en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

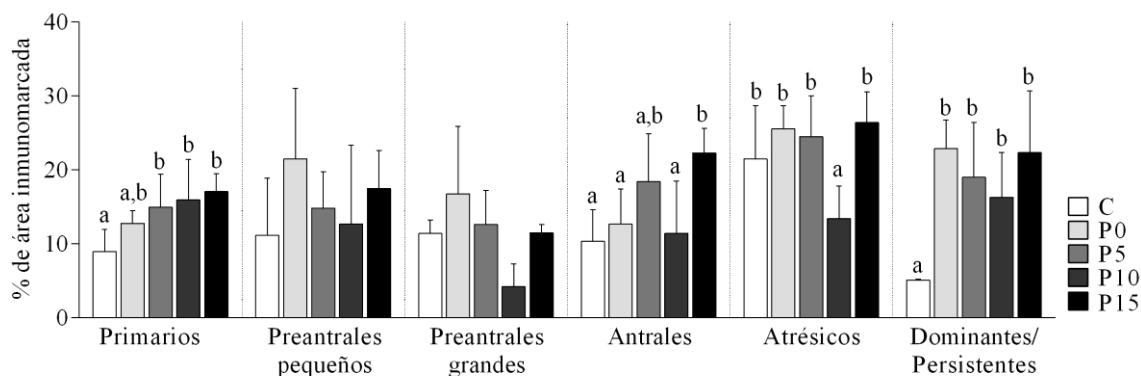


Figura 119: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-4** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

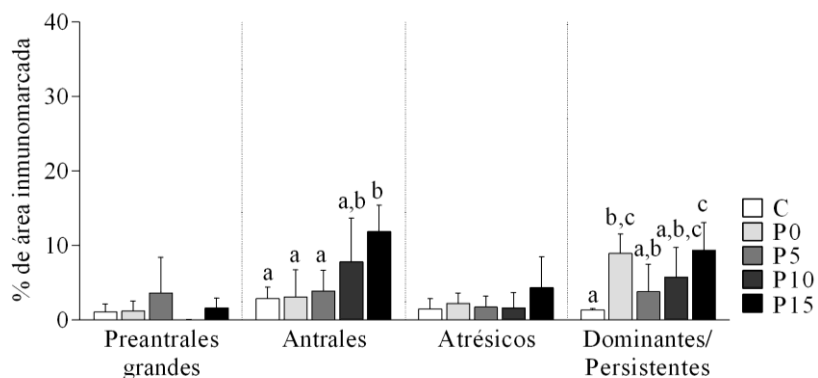


Figura 120: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-4** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

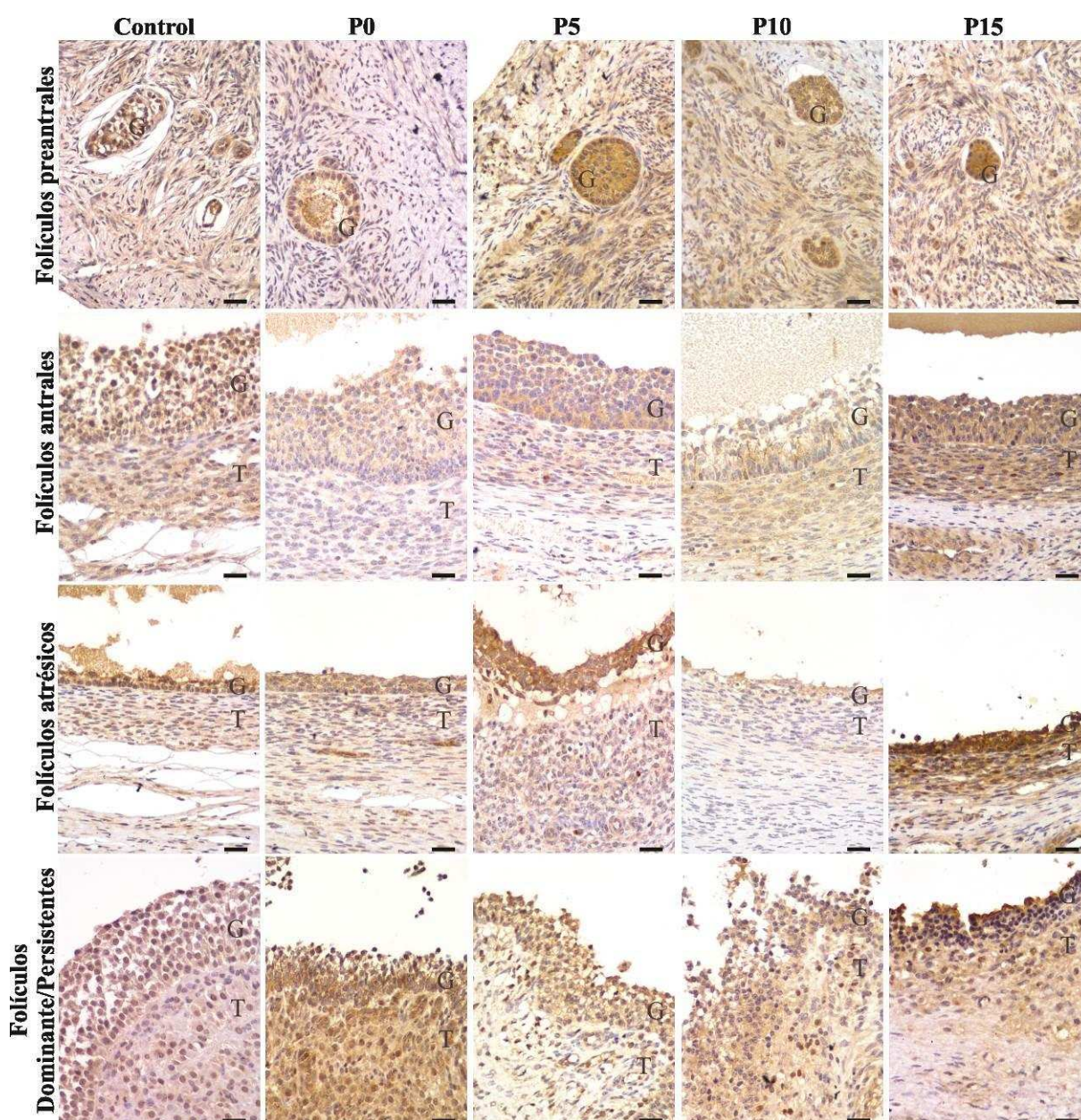


Figura 121: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-4** en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μ m. G: granulosa, T: teca interna.

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

Se evaluó la concentración folicular y sérica de IL-4 en muestras de los grupos control y de persistencia folicular. Como se puede observar en la figura 122, no se hallaron diferencias en la concentración de IL-4 entre animales control y tratados. La comparación entre concentración en LF y suero no mostró diferencias significativas en los grupos P0 y P5. Sin embargo, en los grupos control, P10 y P15, los niveles de IL-4 fueron mayores en LF que en suero ($p < 0,05$).

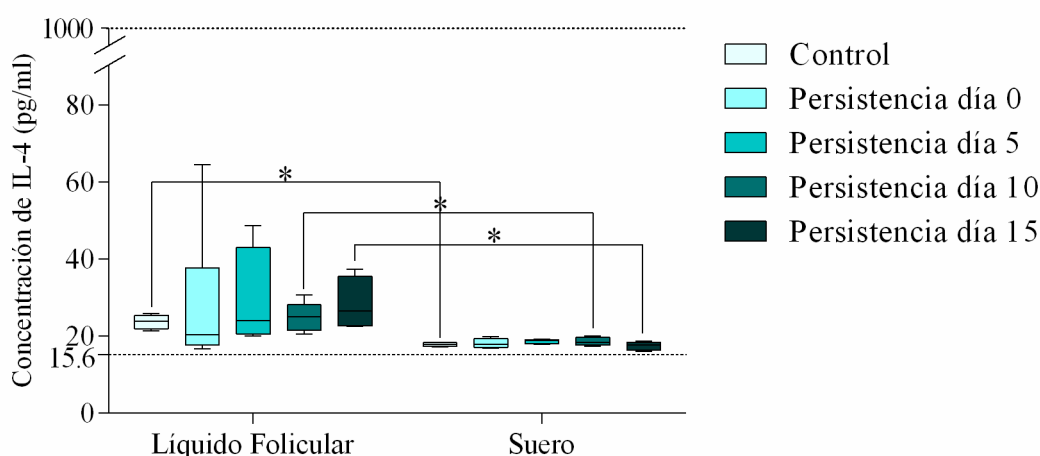


Figura 122: Concentración de **IL-4** en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro), P0, P5, P10 y P15. Los valores representan la media \pm DE. * indica diferencias entre LF y suero dentro de un mismo grupo (indicadas por corchetes) ($p < 0,05$).

4.3.7. IL-6

4.3.7.1. Expresión proteica y localización

La IL-6 fue localizada en el citoplasma de células de la granulosa y teca interna de todos los folículos y grupos analizados. En cada grupo experimental se realizó el análisis de la expresión de esta proteína a lo largo de la foliculogénesis. En células de la granulosa del grupo P0 se detectó la mayor expresión de la proteína en los folículos persistentes en relación al resto de las estructuras evaluadas ($p < 0,05$). Además, en las células de la teca interna, se evidenció la menor inmunexpresión en los folículos preantrales grandes en comparación al resto de las estructuras en estudio ($p < 0,05$) (figuras 123 y 129).

En el grupo P5 las células de la granulosa de los folículos preantrales pequeños y persistentes evidenciaron una expresión significativamente mayor con respecto a los folículos preantrales pequeños y antrales ($p < 0,05$), sin diferenciarse con el resto de las estructuras

($p > 0,05$) No se hallaron diferencias significativas en la expresión de IL-6 durante la foliculogénesis, a nivel de las células de la de la teca (figuras 124 y 129).

El grupo P10 no presentó diferencias de expresión en las células de la granulosa ($p > 0,05$), sin embargo, en células de la teca los folículos persistentes presentaron una mayor expresión respecto a las estructuras restantes. A su vez, los folículos antrales y atrésicos evidenciaron una expresión significativamente mayor que los folículos preantrales grandes ($p < 0,05$) (figuras 125 y 129).

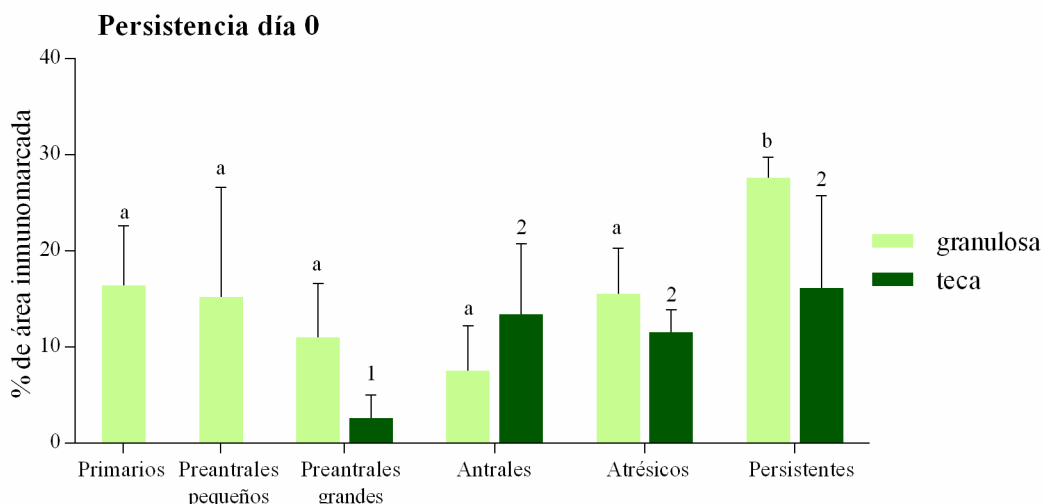


Figura 123: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

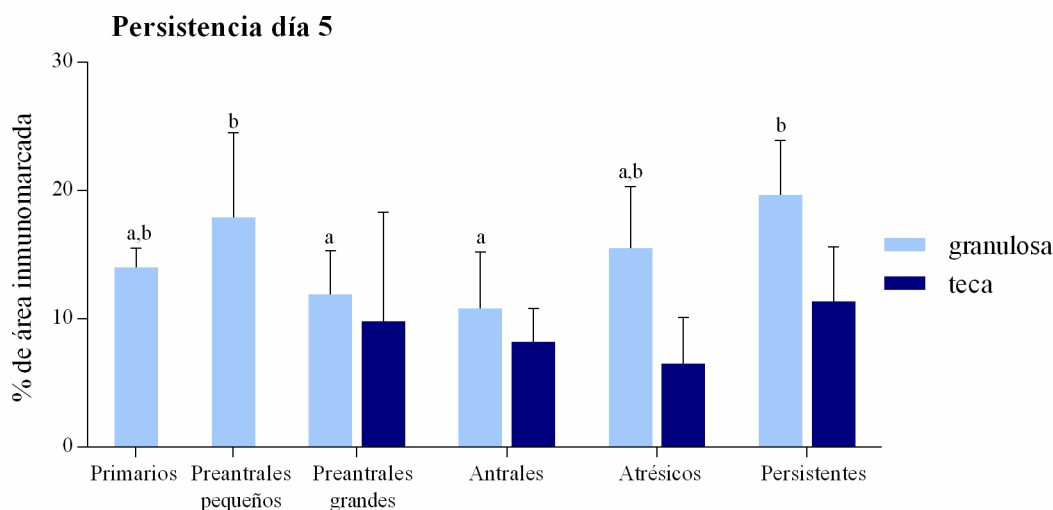


Figura 124: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A los 15 días de persistencia se detectó en las células de la granulosa un aumento de IL-6 en los folículos persistentes en relación a los folículos primarios, preantrales y antrales, a su vez los folículos atrésicos mostraron una mayor expresión en comparación a los folículos antrales ($p < 0,05$). Por otro lado, las células de la teca de los folículos antrales y persistentes presentaron una mayor expresión que las demás estructuras ($p < 0,05$) (figuras 126 y 129).

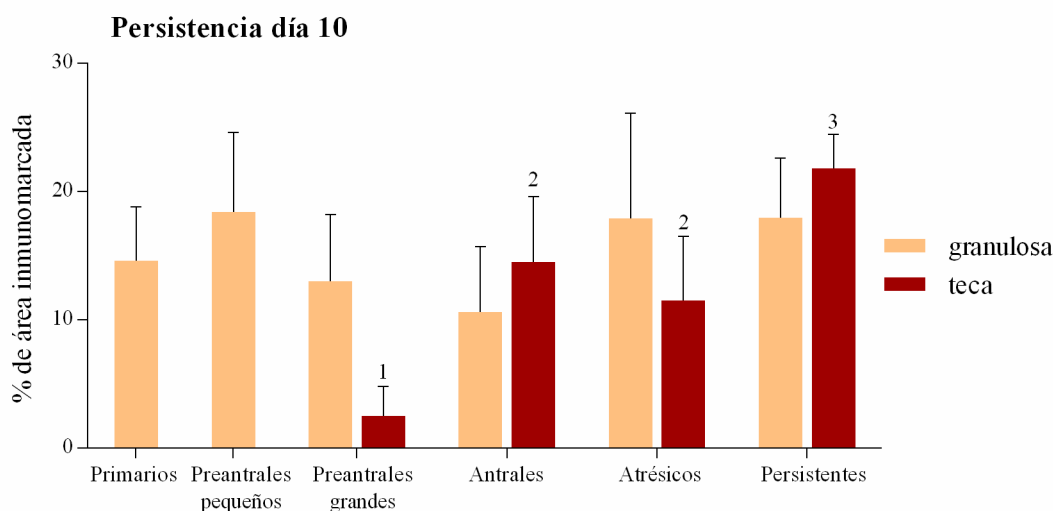


Figura 125: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

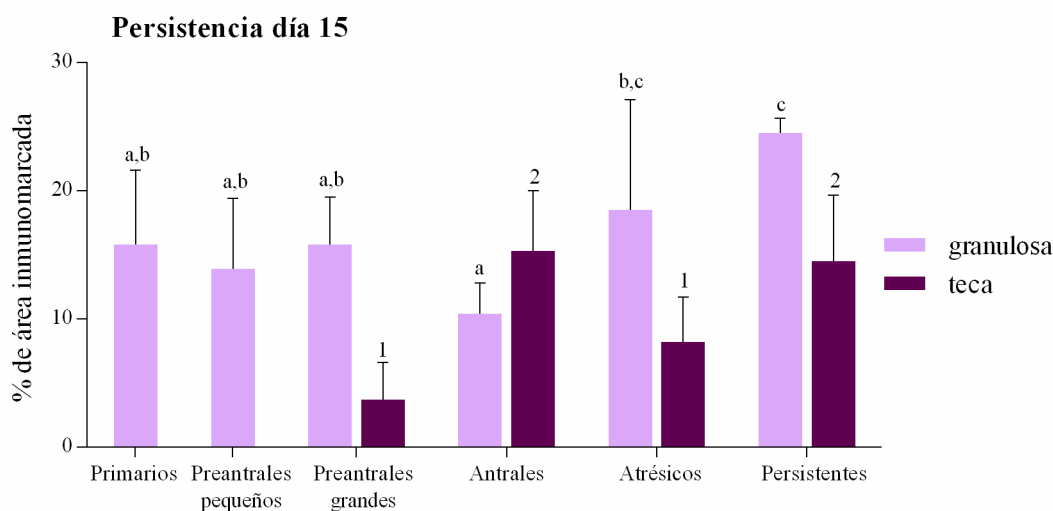


Figura 126: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-6 en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando se compararon cada estructura folicular entre los grupos, las células de la granulosa de los folículos dominantes (como estructura de referencia) mostraron una menor expresión de IL-6 que los folículos persistentes de los grupos P0 y P15 ($p < 0,05$), sin diferencias con los grupo P5 y P10 ($p > 0,05$) (figuras 127 y 129).

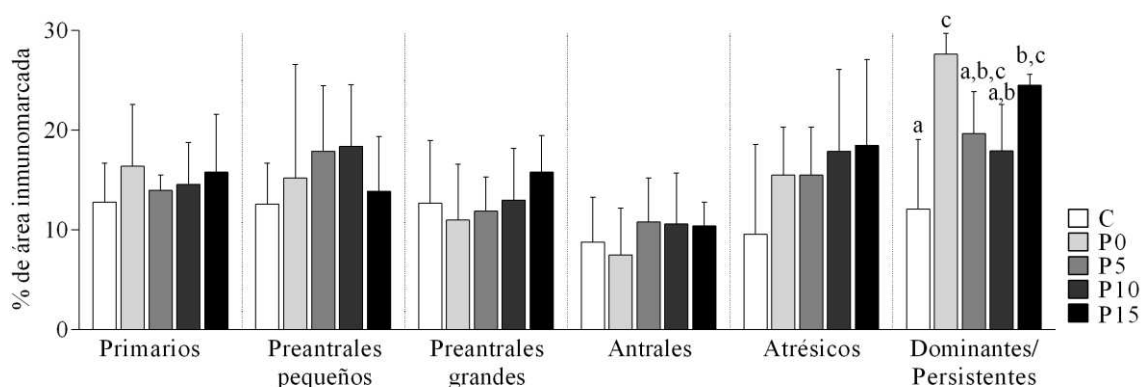


Figura 127: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-6** en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

En las células de teca de folículos antrales, la expresión de IL-6 fue mayor en los grupos P10 y P15 que en los grupos control y P5 ($p < 0,05$), sin diferencias con el grupo P0 ($p > 0,05$). Los folículos persistentes del grupo P10 mostraron una mayor expresión de IL-6 que los folículos dominantes del grupo control (como estructura de referencia) y los folículos persistentes del grupo P5 ($p < 0,05$), sin diferencias significativas con los grupos P0 y P15 (figuras 128 y 129).

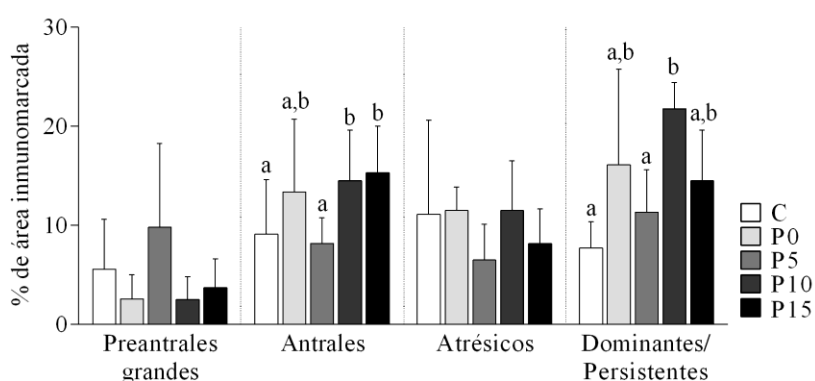


Figura 128: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-6** en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

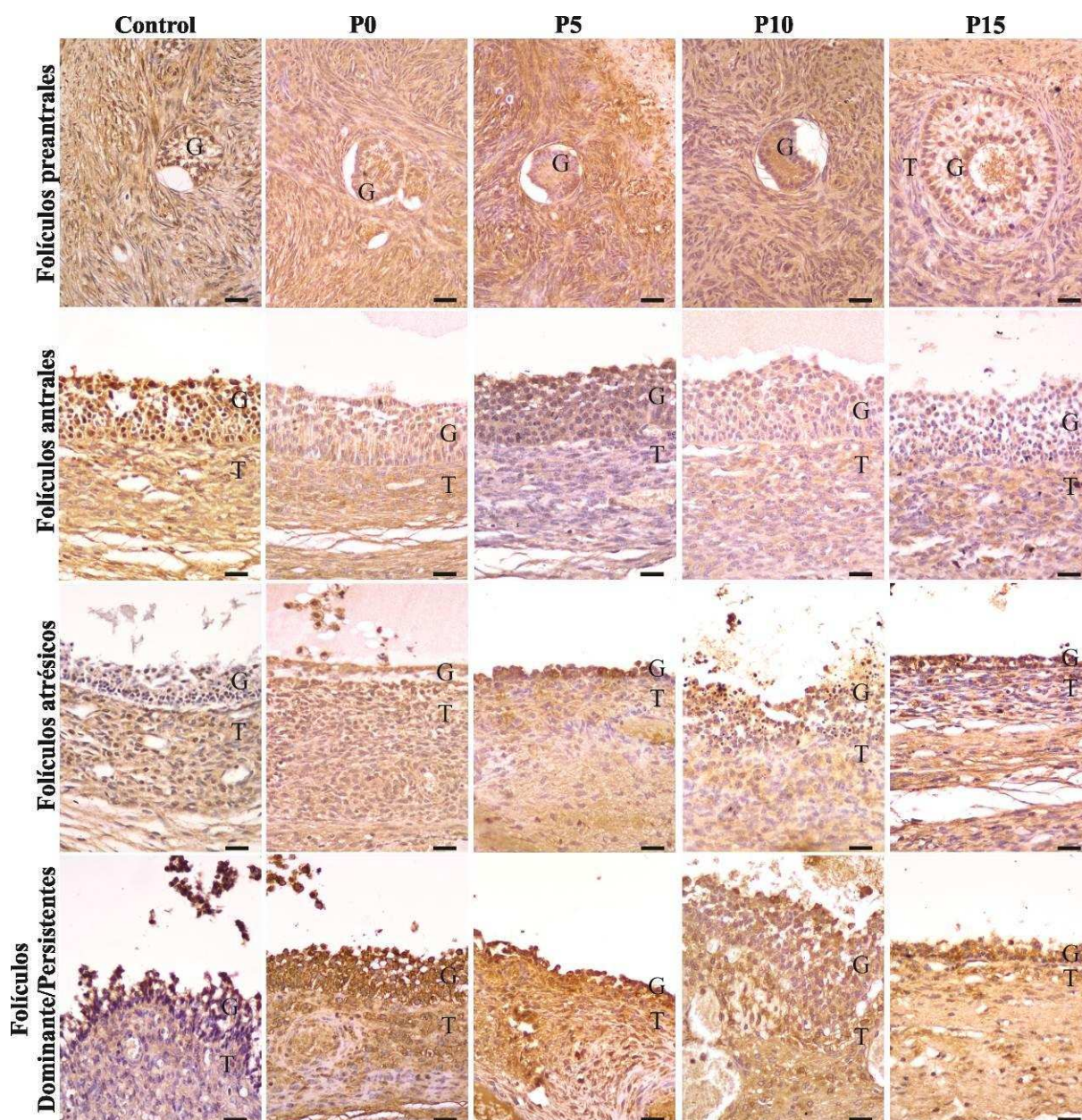


Figura 129: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-6** en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μm . G: granulosa, T: teca interna.

4.3.7.2. Concentración de IL-6 en líquido folicular y suero

Se evaluó la concentración folicular y sérica de IL-6 en muestras de los grupos control y de persistencia folicular. Como se puede observar en la figura 130, no se hallaron diferencias en la concentración de LF entre animales control y tratados, pero en suero las concentraciones fueron significativamente mayores en los grupos P5, P10 y P15 en relación al grupo control ($p < 0,05$), sin diferencias con el grupo P0 ($p > 0,05$). La comparación entre LF y suero no mostró diferencias significativas entre el grupo control y los grupos P0 y P5. Sin

embargo, en los grupos P10 y P15, los niveles de IL-6 fueron mayores en suero que en LF ($p < 0,05$).

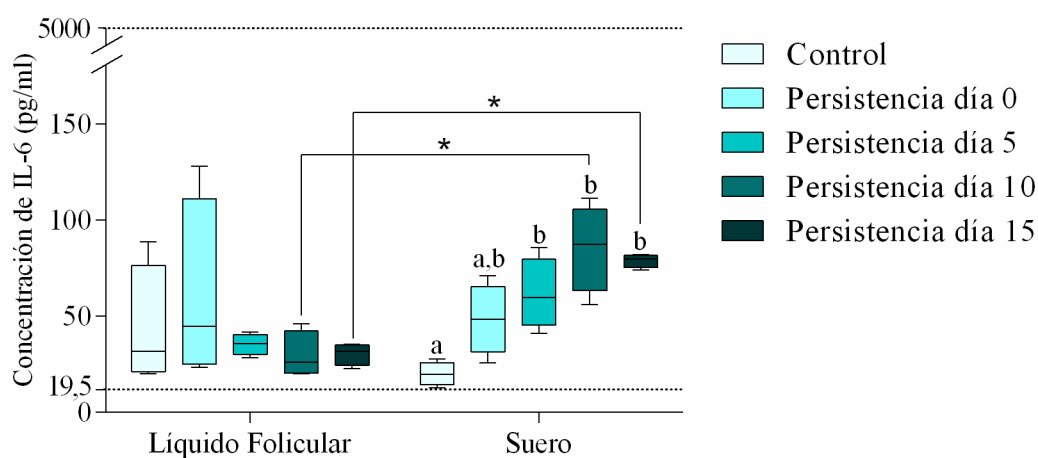


Figura 130: Concentración de **IL-6** en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro), P0, P5, P10 y P15. Los valores representan la media \pm DE. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los distintos grupos. * indica diferencias entre LF y suero dentro de un mismo grupo (indicadas por corchetes) ($p < 0,05$).

4.3.8. IL-8

4.3.8.1. Expresión proteica y localización

Se detectó marcación positiva para IL-8 en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares evaluadas. La IL-8 mostró un patrón de expresión característico a nivel de las células de la granulosa, siendo mayor en éstas últimas en relación a las células de la teca (figura 137).

Al evaluar la expresión de esta proteína a través de la foliculogénesis, pudo determinarse que en las células de la granulosa del grupo P0 la expresión fue mayor en los folículos persistentes y antrales en relación a los folículos primarios, preantrales pequeños y atrésicos ($p < 0,05$), sin diferencias con los folículos preantrales grandes ($p > 0,05$). A nivel de las células de la teca se determinó la mayor inmunomarcación en la categoría de los folículos persistentes en relación al resto de las estructuras evaluadas ($p < 0,05$) (figuras 131 y 137).

A los 5, 10 y 15 días de persistencia no se hallaron diferencias significativas en las células de la teca. Sin embargo, en todos estos grupos, se encontraron diferencias en la expresión de IL-8, en las células de la granulosa. En el grupo P5, la expresión fue mayor en los folículos antrales en relación a los folículos primarios ($p < 0,05$), sin diferencias con el resto de las estructuras ($p > 0,05$) (figuras 132 y 137). En el grupo P10, la expresión fue mayor en los folículos antrales en relación a los folículos primarios y atrésicos ($p < 0,05$), sin diferencias

con los folículos preantrales y persistentes ($p>0,05$) (figuras 133 y 137). En el grupo P15, la expresión fue mayor en los folículos preantrales grandes y antrales en relación al resto de las estructuras evaluadas ($p<0,05$) (figuras 134 y 137).

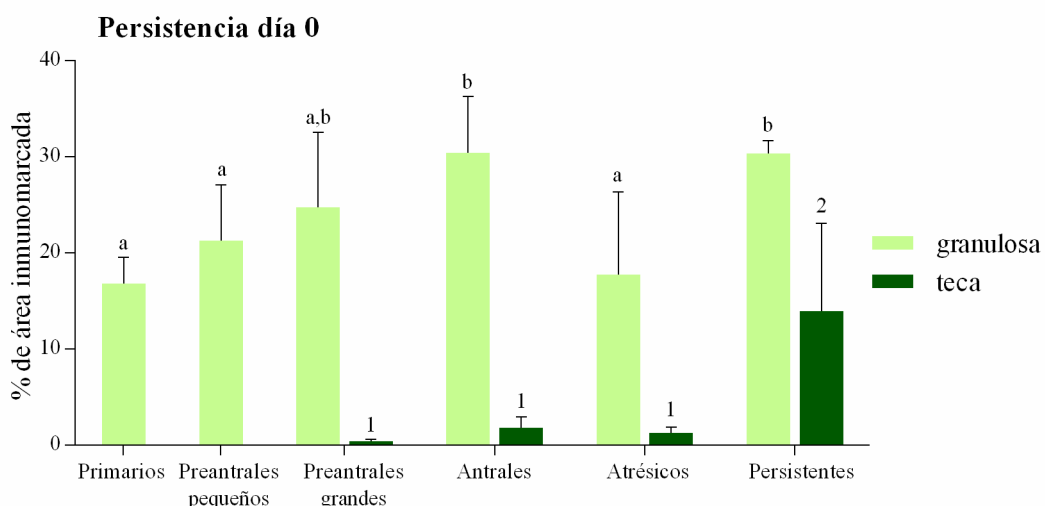


Figura 131: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-8** en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p<0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p<0,05$).

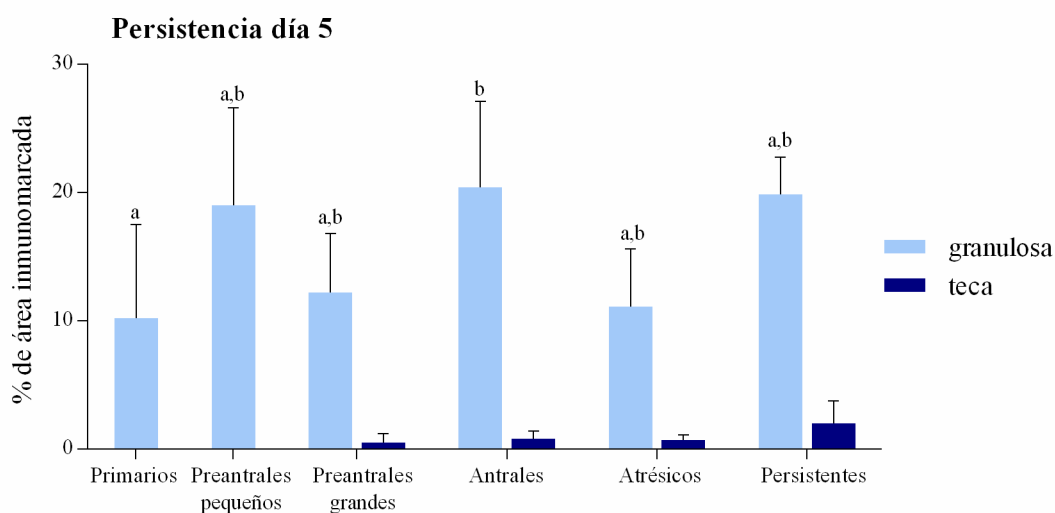


Figura 132: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-8** en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p<0,05$).

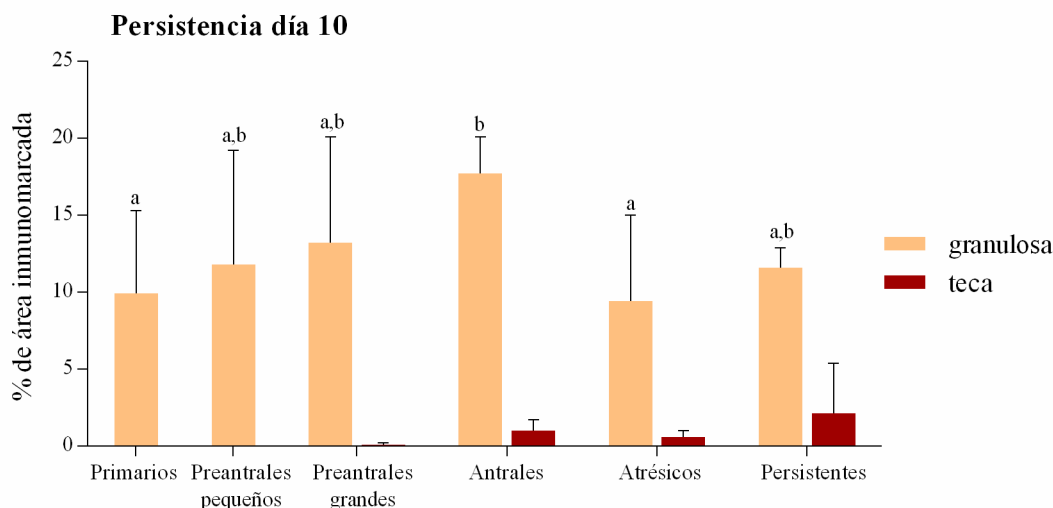


Figura 133: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-8** en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

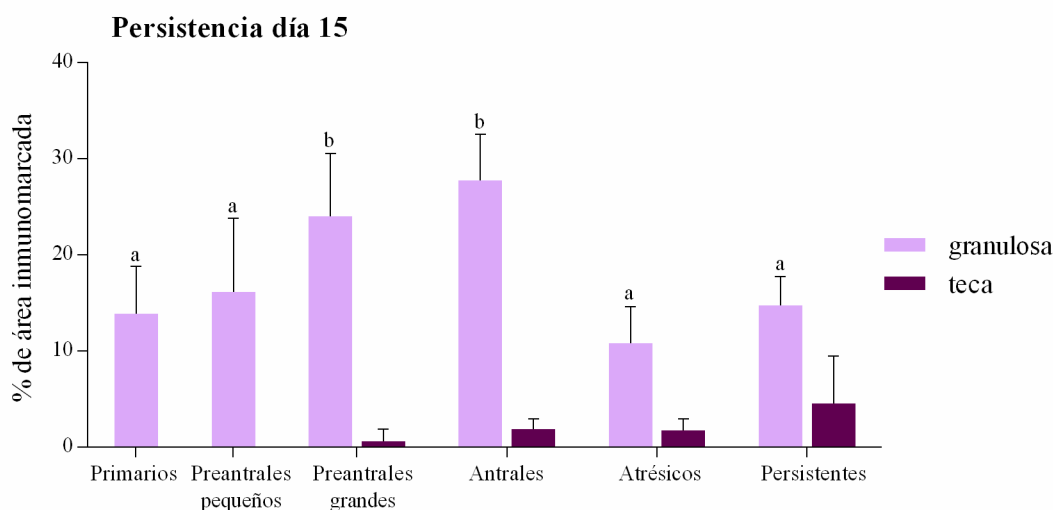


Figura 134: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **IL-8** en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La comparación entre grupos para cada categoría folicular mostró diferencias en la expresión de esta proteína. Las muestras del grupo P0 mostraron una mayor expresión de IL-8 en la mayoría de las categorías foliculares en relación con el grupo control. Las células de la granulosa de los folículos primarios, preantrales grandes y antrales de los grupos P0 y P15 mostraron una mayor expresión de IL-8 que el grupo control ($p < 0,05$). A su vez, las células de la granulosa de los folículos persistentes de los grupos P0, P5 y P15 mostraron una mayor expresión de IL-8 que los folículos dominantes del grupo control (como estructura de

referencia). Además, los folículos persistentes del grupo P0 fueron los que presentaron la mayor expresión en relación a los otros folículos persistentes (figuras 135 y 137).

Por otro lado, la teca interna de los folículos antrales y atrésicos de los grupos P0 y P15, mostró una mayor expresión de IL-8 que las mismas estructuras en el grupo control ($p < 0,05$) (figuras 136 y 137).

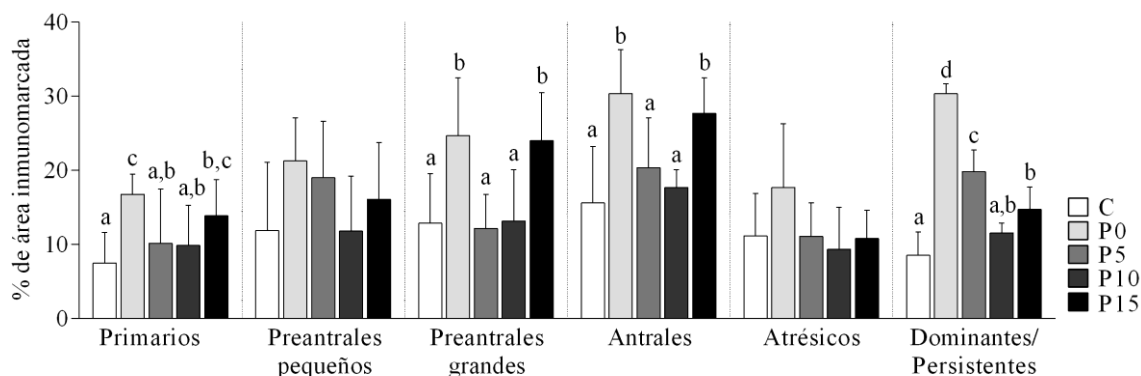


Figura 135: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-8 en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

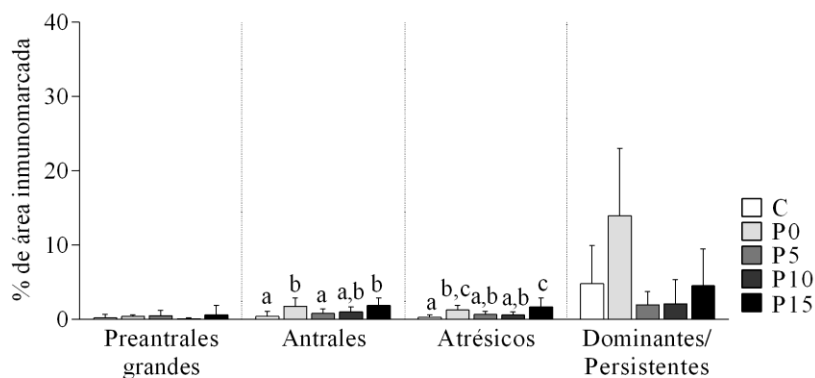


Figura 136: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de IL-8 en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

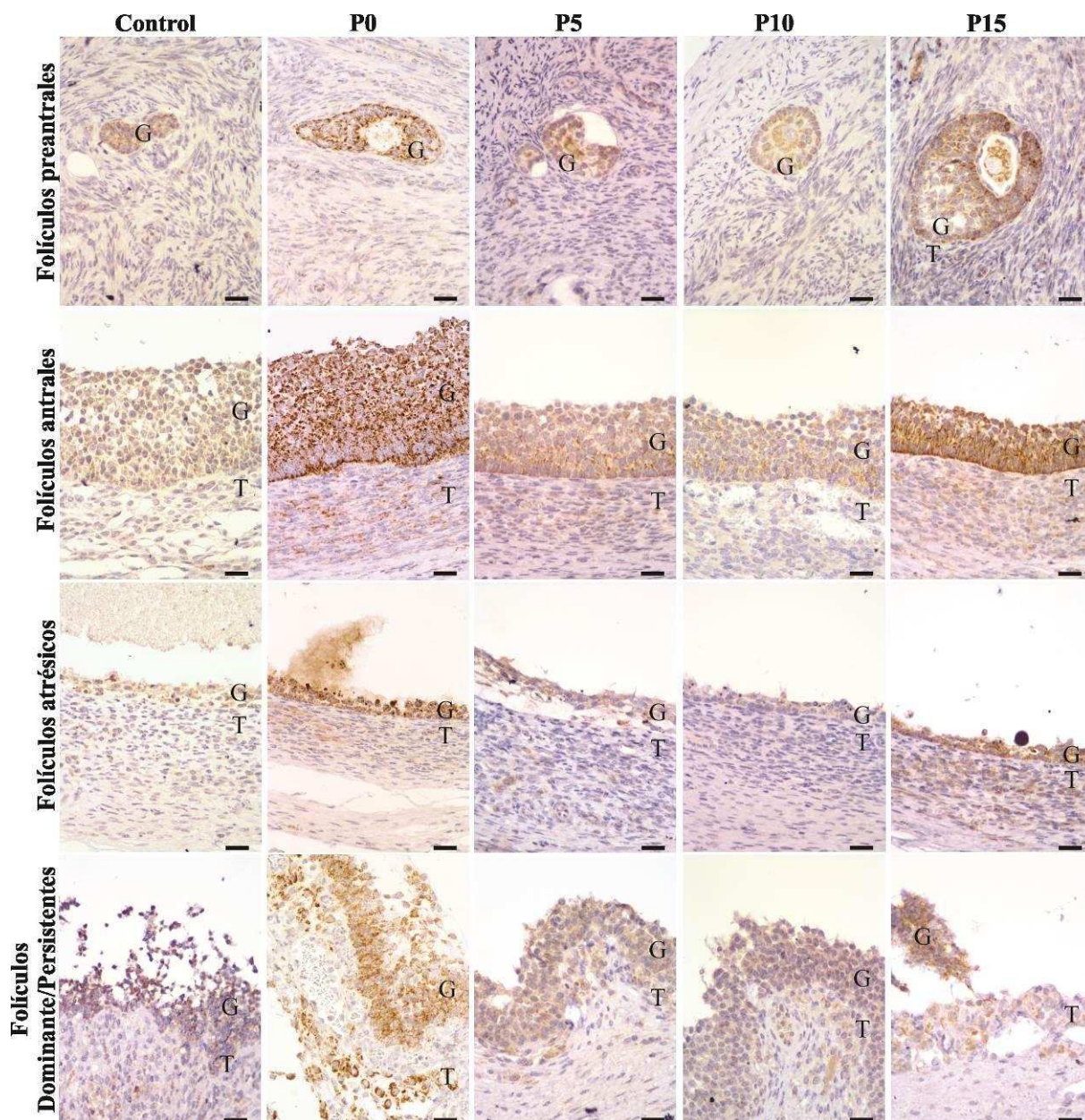


Figura 137: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para **IL-8** en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μm . G: granulosa, T: teca interna.

4.3.8.2. Concentración de IL-8 en líquido folicular y suero

Se evaluó la concentración folicular y sérica de IL-8 en muestras de los grupos control y de persistencia folicular. Como se puede observar en la figura 138, no se detectó IL-8 en LF de animales de los grupos control, P0, P5 y P10 ($< 7,8 \text{ pg/ml}$), por lo que se pudo realizar el análisis estadístico correspondiente. Por otro lado en LF de animales del grupo P15 IL-8 fue cuantificable dentro de los límites de detección de la técnica. En suero no se hallaron diferencias en la concentración de IL-8 entre animales control y tratados ($p > 0,05$).

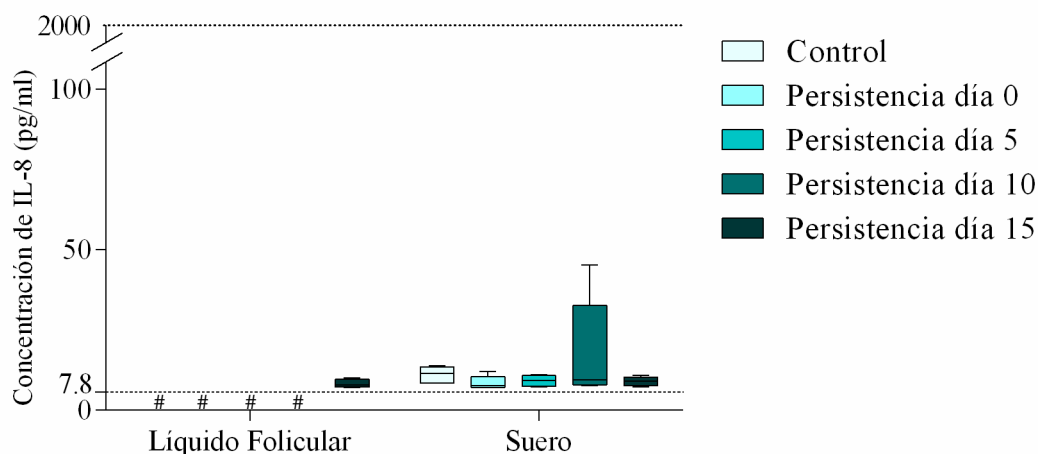


Figura 138: Concentración de **IL-8** en suero y en LF de animales control (folículo dominante, proestro), P0, P5, P10 y P15. Los valores representan la media \pm DE. # IL-8 en LF de animales controles, P0, P5 y P10 ($<$ a 7,8 pg/ml). No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.3.9. *TNF- α : Expresión proteica y localización*

Se detectó marcación positiva para TNF- α en el citoplasma de las células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares evaluadas dentro de cada grupo. En la evaluación a través de la foliculogénesis dentro de cada grupo en estudio, se detectó que la expresión en células de la granulosa en el grupo P0 fue significativamente mayor en la categoría de los folículos persistentes en relación a las demás estructuras evaluadas. Además, las células de la granulosa de los folículos antrales mostraron una menor expresión en relación al resto de las estructuras. Por otro lado, las células de la teca de los folículos antrales y persistentes presentaron mayor expresión que las demás estructuras ($p < 0,05$) (figuras 139 y 145).

A los 5 días de persistencia, en las células de la granulosa, se encontró la mayor expresión de TNF- α en los folículos persistentes con respecto a las demás estructuras foliculares ($p < 0,05$). En la teca interna los folículos preantrales grandes y persistentes mostraron una expresión más alta que los atrésicos ($p < 0,05$), sin diferencias significativas con los antrales (figuras 140 y 145).

En células de la granulosa durante el desarrollo folicular a los 10 días de persistencia se determinó una mayor expresión en folículos persistentes en comparación con los demás folículos en estudio ($p < 0,05$). A su vez los folículos primarios y preantrales mostraron una expresión significativamente mayor que los folículos antrales. En células de la teca se determinó que la mayor expresión fue de los folículos persistentes en relación a los folículos

preantrales grandes y atrésicos ($p < 0,05$), sin diferencias significativas con los folículos antrales (figuras 141 y 145).

A los 15 días de persistencia, la expresión de TNF- α en las células de la granulosa fue significativamente mayor en los folículos persistentes en comparación con el resto de las estructuras evaluadas. Por otro lado, las células de la teca de los folículos antrales y persistentes presentaron una mayor expresión que las demás estructuras ($p < 0,05$) (figuras 142 y 145).

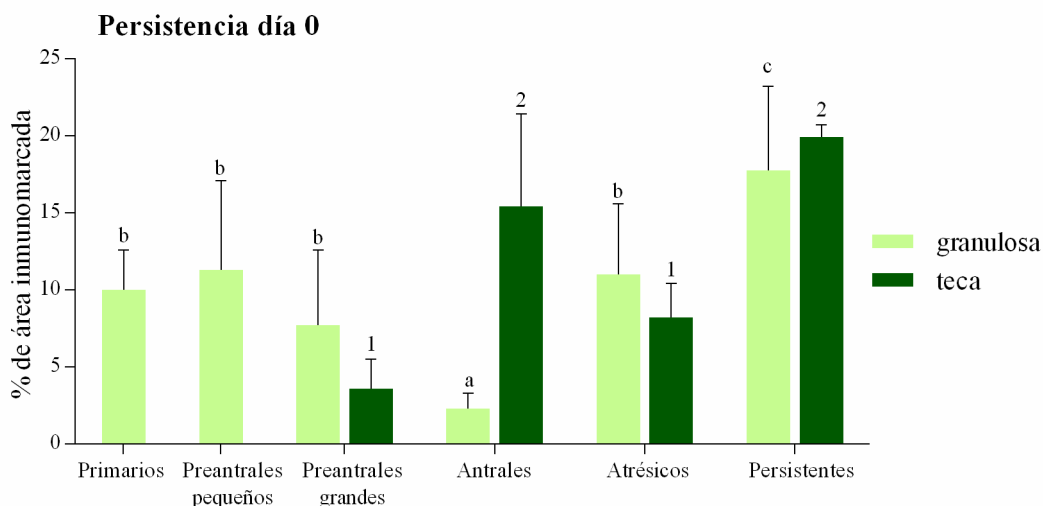


Figura 139: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TNF- α en el grupo P0. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

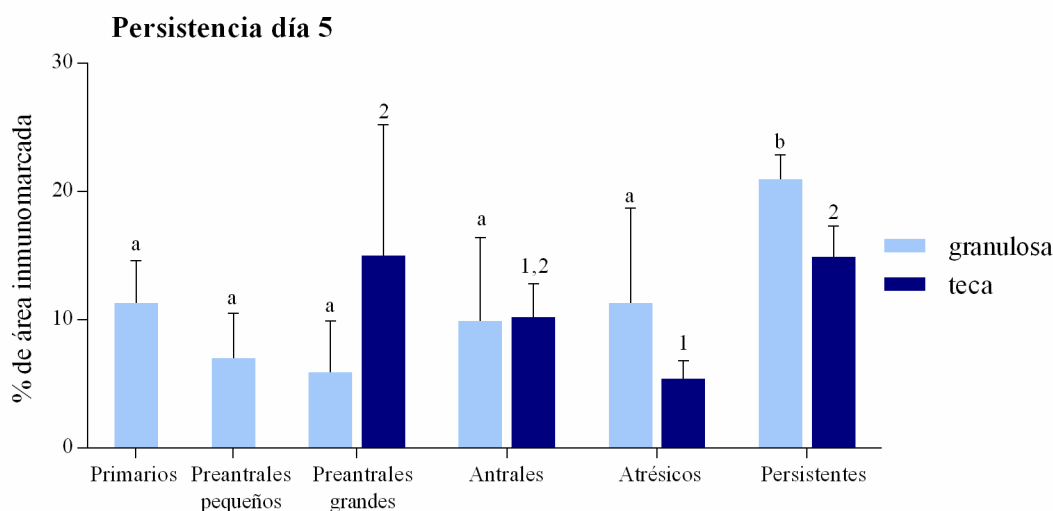


Figura 140: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TNF- α en el grupo P5. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

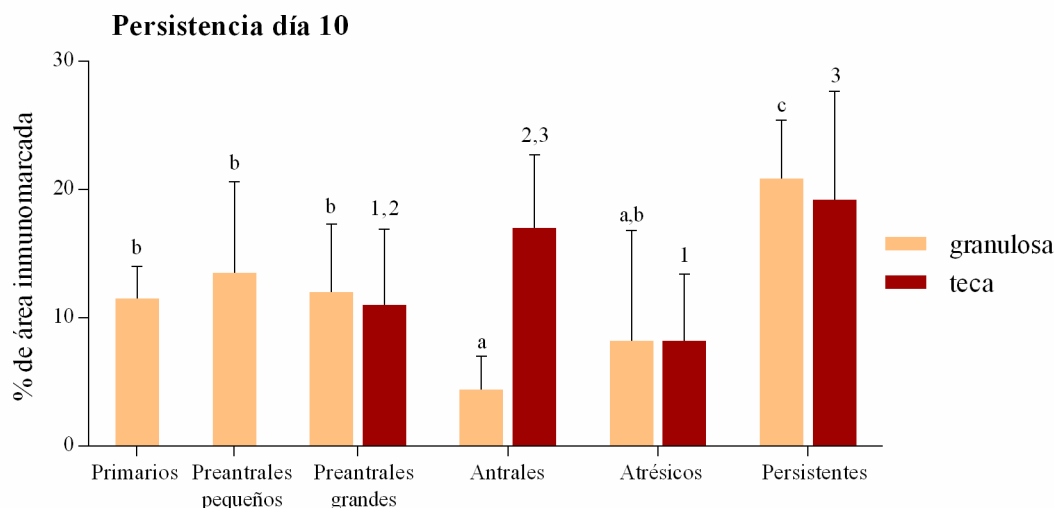


Figura 141: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TNF- α** en el grupo P10. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

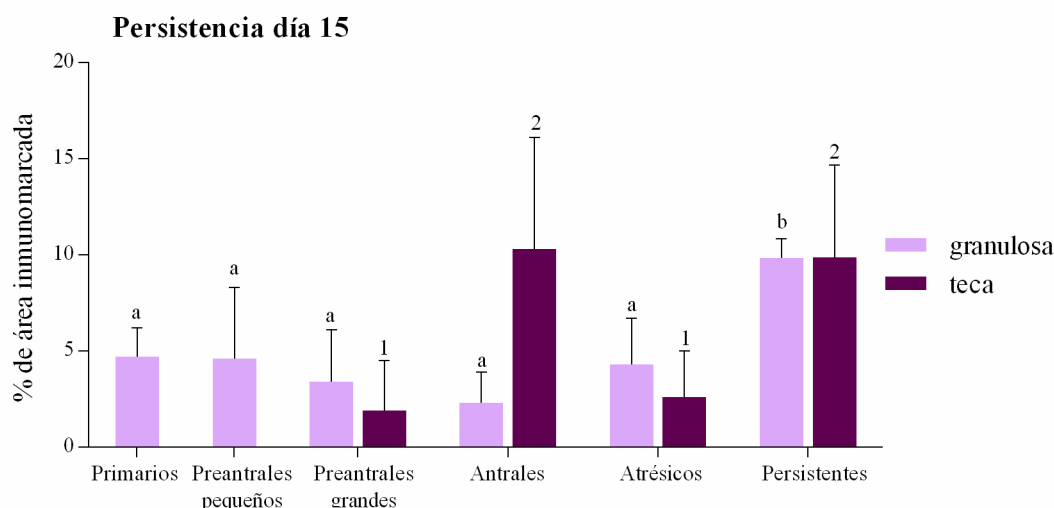


Figura 142: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de **TNF- α** en el grupo P15. El análisis se realizó en células de la granulosa y de la teca interna de todas las categorías foliculares. Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras (granulosa) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con diferentes números (teca interna) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el análisis por categoría folicular entre los grupos se detectaron variaciones en la expresión de **TNF- α** en prácticamente todas las categorías foliculares estudiadas. En células de la granulosa pudo detectarse que en los folículos primarios, la expresión de **TNF- α** fue menor en el grupo P15 que en todos los otros grupos. Los folículos antrales mostraron una mayor expresión de **TNF- α** en el grupo P5 que en todos los otros grupos. Los folículos atrésicos de los grupos P0 y P5 presentaron mayor expresión que los de los grupos control y P15 ($p < 0,05$), sin diferencias con el grupo P10 ($p > 0,05$). Por otra parte, la expresión en las células de la granulosa de los folículos persistentes de los grupos P0, P5 y P10 presentó

mayor expresión en relación a los folículos dominantes del grupo control (como estructura de referencia) y persistente del grupo P15 ($p > 0,05$) (figuras 143 y 145).

A nivel de las células de la teca, se hallaron diferencias en la categoría de folículos preantrales grandes donde la expresión de TNF- α en el grupo P5 fue significativamente mayor que en P0 y P15 ($p < 0,05$), sin diferencias con el grupo control y P10. Sumado a esto, en los folículos antrales, la expresión de TNF- α fue mayor en P10 que en control, P5 y P15, y los folículos atrésicos mostraron mayor expresión en los grupos P0 y P10 que en el grupo P15 ($p < 0,05$) (figuras 144 y 145).

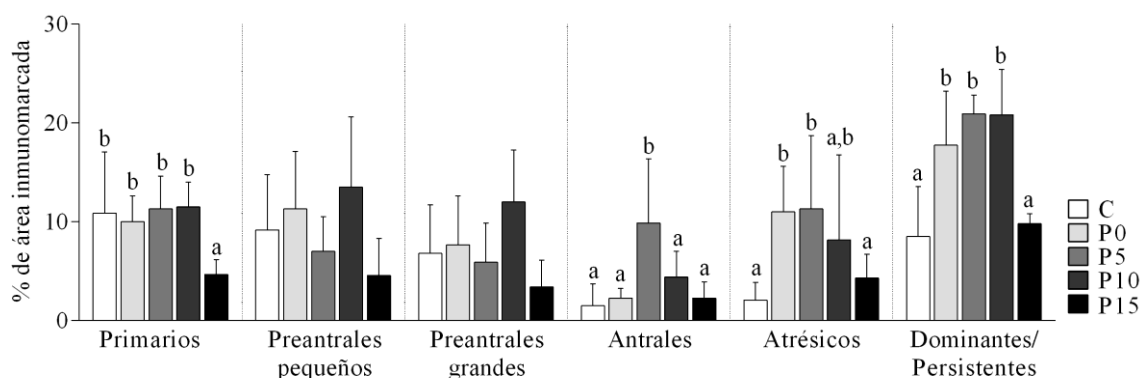


Figura 143: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TNF- α en células de la granulosa de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

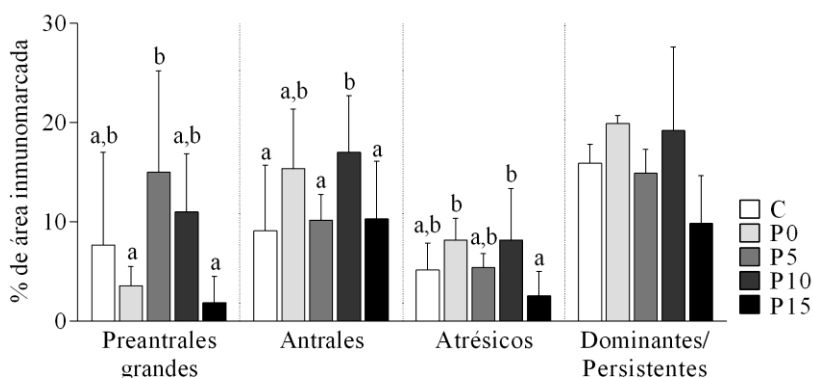


Figura 144: Expresión proteica relativa (medida como porcentaje de área inmunomarcada) de TNF- α en células de la teca interna de cada categoría folicular (separadas por líneas de puntos) entre los distintos grupos en estudio (en distintos colores). Los valores representan la media \pm DE. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas dentro de la misma categoría ($p < 0,05$).

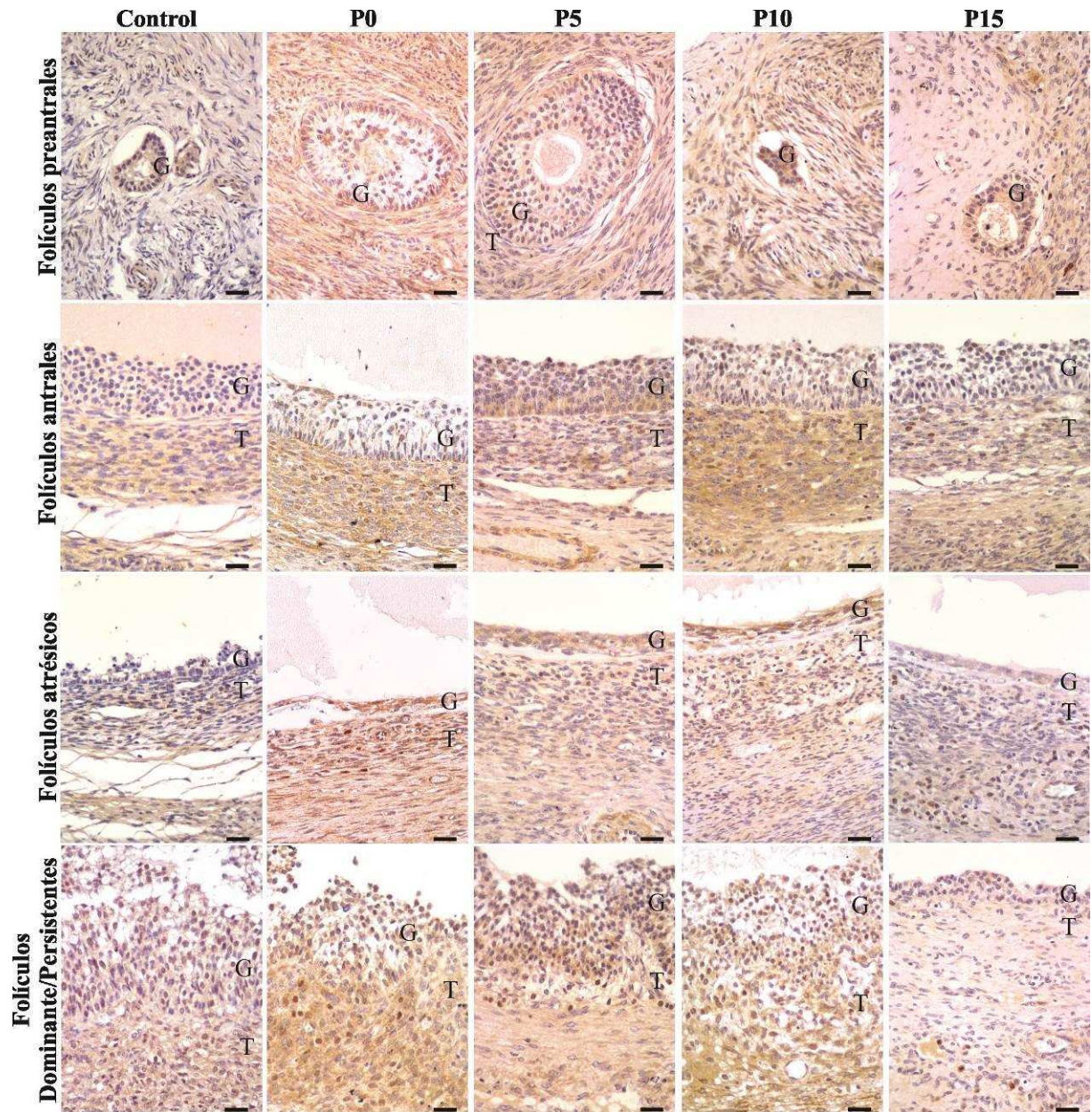


Figura 145: Diferentes estructuras foliculares ováricas inmunomarcadas para $\text{TNF-}\alpha$ en animales de los grupos control, P0, P5, P10 y P15. La barra indica 25 μm . G: granulosa, T: teca interna.

5. DISCUSIÓN

5.1. PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA: UN MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE QUISTES FOLICULARES OVÁRICOS.

El estudio de los procesos que conducen a la falla ovulatoria y la persistencia del folículo dominante son claves para entender la patogénesis de la COD. Sin embargo, debido a la imprevisibilidad de la aparición de quistes, es extremadamente difícil y a menudo poco práctico estudiar su desarrollo espontáneo. Por lo tanto, el uso de modelos experimentales para el análisis de los primeros eventos de la formación de los quistes foliculares ováricos, es fundamental para comprender los mecanismos implicados en la patogénesis de la enfermedad.

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

El modelo de persistencia folicular inducida desarrollado permitió evidenciar cambios en las concentraciones de gonadotrofinas, manifestados por la ausencia del pico preovulatorio de LH con el consiguiente bloqueo de la ovulación, situación que caracteriza y define también a los quistes foliculares ováricos espontáneos (Díaz y col., 2015; Díaz, 2016b). Siguiendo la conclusión de Hatler y col. (2008) que indica que las concentraciones bajas de progesterona pueden reducir la capacidad del E2 (endógeno o exógeno) de inducir un pico preovulatorio de LH y la ovulación, el modelo de persistencia folicular desarrollado fue congruente con dichos hallazgos previos. La pulsatilidad de LH fue modificada, apareciendo en los grupos de 5, 10 y 15 días de persistencia folicular una frecuencia pulsátil similar a la observada en el proestro de los animales controles, aunque de menor amplitud. Estas modificaciones en los perfiles plasmáticos de LH sumadas a concentraciones de FSH basales a través del tiempo, favorecieron la persistencia y el crecimiento continuo del folículo dominante hasta los 15 días en los animales tratados (Díaz y col., 2015; Díaz, 2016b). De esta manera, se corrobora lo descrito por Bridges y Fortune (2003), quienes afirmaron que concentraciones subluteales de progesterona son capaces de inducir un incremento en la frecuencia de los pulsos de LH, inhibiendo su pico preovulatorio y así la ovulación.

Al evaluar los valores de hormonas esteroideas en suero y en LF, obtenidos al final del ensayo, al momento de la ovariectomía, la progesterona sérica presentó mayor concentración

en los animales con folículos persistentes de 0 y 5 días mientras que en aquellos con folículos de 15 días disminuyó de manera análoga a lo observado en los quistes espontáneos. En cuanto al LF, la concentración de esta hormona fue baja en todos los animales con folículos persistentes en relación a los folículos preovulatorios controles. La concentración de 17-hidroxiprogesterona se incrementó de manera proporcional al aumento de días en persistencia, tanto en suero como en LF, a excepción del día 0 de persistencia folicular, que no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control. La testosterona mostró un incremento gradual desde la etapa preovulatoria hasta el día 15 de persistencia. Estos resultados sugieren que los folículos persistentes fueron capaces de mantener su habilidad de síntesis de andrógenos por un período extendido de tiempo, pero hacia el día 15 de persistencia podría haber comenzado a decrecer su capacidad para sintetizar estrógenos (aromatización), como ha sido descrito previamente, tanto en folículos persistentes como en quistes foliculares (Kojima y col., 2003; Amweg y col., 2013; Díaz y col., 2015). Esta deficiente capacidad de aromatización de los andrógenos, por cambios morfo-funcionales en las células de la granulosa, podría ser responsable del incremento en las concentraciones de testosterona que caracteriza a los quistes foliculares en la vaca lechera (Dobson y Smith, 1995; Amweg y col., 2013). Los signos clínicos se presentan en relación a las condiciones hormonales, el anestro es el signo más común, especialmente durante el período posparto (Kesler y Garverick, 1982). Los intervalos irregulares del estro, la ninfomanía, la relajación de los ligamentos pélvicos y el desarrollo de rasgos físicos masculinos son otros signos que pueden estar presentes (Youngquist, 1986; Vanholder y col., 2006).

Las concentraciones de E2 fueron constantes entre el proestro y el día 10 de persistencia, decreciendo significativamente hacia el día 15 de persistencia. Este incremento en las concentraciones séricas podría reflejar la producción de E2 por las células de la granulosa viables hasta el día 10 de persistencia. El aumento de la capacidad secretora de E2 de folículos persistentes en un ambiente hormonal de progesterona subluteal se puede atribuir a un aumento de la masa de tejido con capacidad esteroideogénica. La alta frecuencia de pulsos de LH podría también promover la producción de andrógenos foliculares, llevando a una síntesis incrementada de E2 (Fortune, 1986), y esto ha sido asociado con la patogénesis de los quistes foliculares (Hatler y col., 2003). En ausencia de los efectos inhibidores de las concentraciones luteales de progesterona, estos folículos dominantes persistentes desarrollan un mayor espesor de teca interna que puede producir relativamente mayores niveles de andrógenos tras la estimulación frecuente por parte de LH. En consecuencia, se produce la

aromatización de estos andrógenos a E2 en las células de la granulosa y los resultados son, concentraciones mayores de E2 en plasma en los animales con folículos persistentes frente a aquellos con folículos dominantes normales. Además, las concentraciones séricas de E2 indican que la producción de este esteroide desde los folículos persistentes declina hacia el día 15 de persistencia. Esto coincide con los cambios histológicos observados en las células de la granulosa de los folículos con 15 días de persistencia, como se discute más adelante. Por otra parte, investigaciones previas aseguran que los folículos persistentes poseen una mayor capacidad de producción de progesterona posiblemente originada en una luteinización prematura (Bigelow y Fortune, 1998).

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

Coincidentemente con los cambios hormonales, se observaron cambios a nivel morfológico, ya que los folículos que persistieron en los distintos días evaluados, mostraron una pérdida de espesor en las capas de la granulosa y teca, a medida que avanzaba el tiempo de persistencia. Particularmente, en los folículos persistentes del día 15 el espesor tanto de la capa de células de la granulosa como de la teca interna fue menor en relación a la de los folículos preovulatorios controles (Díaz y col., 2015).

La sumatoria de estos hallazgos, permiten postular que podría desencadenarse una maduración prolongada de los ovocitos pertenecientes a folículos dominantes persistentes según lo descrito por Revah y Butler (1996), y como consecuencia generar alteraciones en la fecundación o aumento en la mortalidad embrionaria.

En función de estos hallazgos, podemos inferir que los folículos persistentes inducidos por este modelo parecen replicar adecuadamente a los quistes foliculares que surgen de forma espontánea en las vacas lecheras, proveyendo una nueva herramienta para estudiar los estadios tempranos de formación de quistes y desarrollo de la COD. El estudio de este modelo experimental sugiere que los ovarios quísticos son formados cuando la adenohipófisis falla en liberar el pico preovulatorio de LH en respuesta a un incremento preovulatorio de E2 (Silvia y col., 2002). Estos resultados indican que los quistes ováricos son similares en numerosas características a los folículos persistentes inducidos por la administración prolongada de

concentraciones subluteales de progesterona. Confirmando el rol local de las concentraciones intermedias de progesterona en la patogénesis de la COD y en los mecanismos regulatorios de la función ovárica, el perfil endocrino, la dinámica de crecimiento y las características histológicas de los folículos persistentes son análogas a las de los quistes espontáneos.

5.2. EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN OVARIOS DE ANIMALES NORMALES, CON COD ESPONTÁNEA Y PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA

El estudio de los procesos que conducen a la falla ovulatoria y la persistencia del folículo dominante es la clave para entender la patogénesis de la COD (Díaz y col., 2015). Las citoquinas son moléculas de señalización celular que cumplen una función importante en los procesos inflamatorios (Rashid y col., 2017). Diversos estudios han demostrado que las citoquinas no sólo se expresan durante las reacciones inmunes, sino que también regulan otros procesos fisiológicos como la ovulación (Dhillon y col., 2006). En este sentido, las citoquinas desempeñan un papel muy importante en el desarrollo folicular ovárico, regulando el crecimiento, la diferenciación y la muerte de diferentes componentes celulares del ovario (Nash y col., 1999). Las citoquinas evaluadas en esta tesis han demostrado ser importantes en el ovario de los mamíferos. Estas citoquinas están implicadas en la regulación de la maduración folicular y la ovulación mediante mecanismos paracrinos y autocrinos (Brännström y col., 1993; Terranova y Rice, 1997; Bukulmez y Arici, 2000). La detección de citoquinas puede utilizarse para la caracterización, predicción y regulación del estado ovárico, así como para el tratamiento de trastornos ováricos (Sirotkin, 2011; Sheldon y col., 2014). En humanos, está descrito un círculo vicioso entre citoquinas pro y antiinflamatorias que se cree que participa en la patogénesis del síndrome de ovario poliquístico (PCOS, del inglés: *polycystic ovary syndrome*) (Ebejer y Calleja-Agius, 2013; Rashid y col., 2017).

Debido a que la creciente evidencia sugiere que la ovulación comparte numerosas características de una reacción inflamatoria, en esta tesis se evaluó la expresión de las citoquinas IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-8 y TNF- α , y los receptores del sistema IL-1, IL-1RI e IL-1RII, en células foliculares ováricas de animales controles sanos, con COD espontánea y en un modelo de persistencia folicular inducido por progesterona. Los resultados obtenidos evidencian por primera vez que la COD y la persistencia folicular en vacas son concurrente con alteraciones en la expresión de estas citoquinas en diferentes estructuras foliculares. Por otra parte, estas citoquinas se expresaron diferencialmente entre los grupos a partir de las primeras etapas de la foliculogénesis, lo que podría afectar el desarrollo folicular temprano y, por tanto, perturbar la fisiología ovárica y contribuir a la recurrencia informada anteriormente para COD (Vanholder y col., 2006; Ortega y col., 2015).

Actualmente, se dispone de información limitada sobre la expresión de estas citoquinas en vacas con COD. Sin embargo, esta enfermedad tiene características similares al

PCOS, trastorno caracterizado por anovulación e infertilidad en mujeres (Barnes y Rosenfield, 1989). Se ha investigado el papel de las citoquinas en el PCOS, con resultados discrepantes relacionados con los diferentes procedimientos de análisis y las diferentes poblaciones del estudio (Amato y col., 2003).

Como ya fue mencionado, el proceso ovulatorio comparte numerosas similitudes con una reacción inflamatoria aguda (Espey, 1994), en la que la LH desencadena una cascada de eventos bioquímicos, incluyendo la producción no sólo de hormonas esteroides y factores de crecimiento ováricos, sino también de citoquinas. Esto representa un nuevo aspecto de las interacciones entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmune (Machelon y Emilie, 1997; Smolikova y col., 2012). La respuesta inflamatoria asociada con el proceso ovulatorio parece estar centrada dentro de las capas celulares de la teca interna y de la granulosa (Espey, 1994). En esta tesis, la inmunoexpresión de todas las citoquinas se observó en granulosa y células de la teca en los folículos de diferentes etapas de desarrollo de los animales controles. Esto sugiere un papel de estas citoquinas en la comunicación celular intraovárica.

5.2.1. *Sistema de la IL-1*

Los miembros del sistema IL-1 se expresan en el ovario de humanos (Zolti y col., 1991; Barak y col., 1992; Hurwitz y col., 1992; Brännström y col., 1994; De Los Santos y col., 1998; Carlberg y col., 2000), ratones (Simón y col., 1994; Terranova y Rice, 1997), ratas (Hurwitz y col., 1991; Scherzer y col., 1996; Wang y col., 1997; Kol y col., 1999a,b) equinos (Martoriati y col., 2002; Martoriati y Gérard, 2003) y bovinos (Passos y col., 2016). La IL-1 controla la transición de las células foliculares facilitando su proliferación y diferenciación (Brännström, 2004), y es capaz de modular la esteroidogénesis y promover la proliferación de células de la granulosa en porcinos (Fukuoka y col., 1989), bovinos (Spicer y Alpizar, 1994), ratas (Wang y col., 1997) y humanos (Best y Hill, 1995; Trundley y Moffett, 2004; Salomonsen y col., 2007). Por otro lado, Kolbus y col. (2006) han demostrado que un polimorfismo común del gen de la *IL-1 α* pero no del de *IL-1 β* está asociado con la presencia de PCOS y con los parámetros clínicos de las mujeres afectadas por este síndrome. Aunque el gen *IL-1 α* no ha sido detectado en células de la granulosa equina (Martoriati y Gérard, 2003), en la presente tesis se detectó expresión de este gen por primera vez en células de ovario bovino. Esto podría atribuirse a ciertas diferencias específicas de la especie en relación con la expresión génica de *IL-1 α* ovárica. Aunque no fue posible cuantificar la expresión del ARNm

de *IL-1 α* en todas las muestras controles, la PCR en tiempo real permitió la detección de todos los transcriptos. Por otra parte, la inmunodetección de la proteína *IL-1 α* fue significativamente mayor en la granulosa de los folículos de los primeros estadios de desarrollo que en los folículos antrales tanto en el grupo control como en el grupo COD espontánea y P0. Cuando comparamos la expresión de *IL-1 α* en quistes en relación a folículos antrales del grupo control, observamos que era mayor en los quistes espontáneos. Sin embargo, se dispone de información limitada sobre la localización celular y la expresión de la *IL-1 α* ovárica. En el ovario humano, tanto la *IL-1 α* como la *IL-1 β* se expresan en células de la granulosa, con una expresión más pronunciada de *IL-1 β* (Hurwitz y col., 1992; Brännström, 2004). Las acciones del sistema de *IL-1* en el folículo ovárico humano durante la foliculogénesis probablemente tienen lugar tanto en las células de la granulosa como en las células de la teca interna porque el *IL-1RI* se expresa en estos dos compartimentos foliculares (Hurwitz y col., 1992; Brännström, 2004).

Las variaciones en la expresión de *IL-1 α* en la persistencia folicular coinciden con lo observado en la COD espontánea, donde se determinó una mayor expresión de *IL-1 α* en la granulosa de los folículos quísticos en comparación a los folículos antrales de los animales controles. Debido a que la definición de quistes foliculares contempla como suficientes 10 días de persistencia en el ovario, consideramos los folículos persistentes del día 15 como quistes foliculares, y se determinó que el aumento de la expresión de esta *IL* es progresivo en el tiempo hasta el día 10 de persistencia. En este tiempo de persistencia, la expresión permanece elevada, sin diferencias en el tiempo esperado para la ovulación (grupo P0) en relación con los folículos dominantes del grupo control. Esto indicaría que los cambios en la expresión de *IL-1 α* se presentan incipientemente durante el desarrollo de COD. La participación de la *IL-1 α* en la esteroidogénesis ovárica local muestra claramente su papel en el desarrollo folicular y posterior ovulación (Brännström y Janson, 1989; Tanaka y col., 1992; Brännström y col., 1993). Considerando sus múltiples funciones, la alta expresión de esta citoquina desde las primeras etapas de persistencia, como lo observado en el grupo P5, podría indicar su participación en la génesis de los quistes foliculares.

Es bien conocida la acción de *IL-1 β* en la ovulación, esta proteína no mostró una alteración en su expresión, excepto en los folículos preantrales pequeños, en los que la granulosa del grupo control mostró menor expresión en relación con las vacas con COD. La misma diferencia se determinó en el modelo experimental, en células de la granulosa, la expresión de *IL-1 β* fue menor en los folículos preantrales pequeños de los grupos control que

en los de los grupos P0 y P15. Tanto en la enfermedad espontánea como en el modelo experimental de persistencia, la IL-1 β mostró una expresión ligeramente alterada que indica que su intervención en el complejo proceso ovulatorio podría estar regulada por otras proteínas del sistema IL-1, como receptores o antagonistas de los receptores. Hemos demostrado que la expresión de IL-1 α es mayor en las células de la granulosa de los folículos persistentes de los grupos P5, P10 y P15 y quistes foliculares que en los folículos controles. Dado que la IL-1 α se une a los mismos receptores que la IL-1 β y genera el mismo efecto sobre las células, esta citoquina podría ser el ligando principal que interviene en la persistencia folicular de la COD. Estudios anteriores han demostrado que durante la foliculogénesis, la IL-1 controla la transición de las células foliculares de una fase proliferativa a una etapa de diferenciación, facilitando la proliferación y previniendo la diferenciación prematura (Brännström, 2004).

Passos y col. (2016) fueron los primeros en reportar la presencia de miembros del sistema IL-1 en diferentes categorías foliculares y diferentes compartimentos de folículos en tejido ovárico bovino, proponiendo un papel importante del sistema IL-1 en la regulación de la foliculogénesis bovina. Otra forma en que la IL-1 modula positivamente el crecimiento folicular es influyendo en la apoptosis, el principal componente de la atresia folicular (Chun y col., 1995; Brännström, 2004), indicando que esta citoquina participaría en determinar si los folículos experimentan atresia o progresan a la ovulación (Field y col., 2014). Estos hechos denotan la importancia de esta citoquina en las primeras etapas del desarrollo folicular. Esta citoquina también actúa sobre diversas vías de la cascada ovulatoria tales como la síntesis de progesterona (Peterson y col., 1993), la inducción de gelatinasas (Hurwitz y col., 1993) y la actividad de la óxido nítrico sintasa (Ellman y col., 1993; Brännström y col., 2010), entre otros procesos (Kokia y col., 1993, Hurwitz y col., 1995a, Brännström, 2004). Después de la ovulación, la IL-1 puede influenciar la función de las células de la granulosa luteínicas de forma paracrina, deteniendo las actividades que disuelven las proteínas y las fibras de colágeno en el ovario, un tiempo después de la ovulación (Papacleovoulou y col., 2011; Woolery y Kruk, 2011; Lee y col., 2011; Xia y col., 2013). Las concentraciones de esta citoquina en LF y suero fueron bajas en todos los grupos, esto puede explicarse por la ausencia de enfermedades en los animales incluidos en este estudio. Por otro lado, no se encontraron diferencias entre el grupo con COD y el grupo control en el LF o en el suero, en concordancia con lo observado en el tejido evaluado por la técnica de inmunohistoquímica indirecta. Cuando realizamos la comparación entre LF y suero en la persistencia folicular, el grupo P0 mostró que la

concentración de IL-1 β fue mayor en suero que en LF, indicando que la persistencia folicular estaría acompañada por una alteración en la secreción de esta citoquina. Como se ha descrito por otros autores (Bersinger y col., 2014), el nivel sérico de citoquinas refleja su liberación conjuntamente por todos los folículos activos e incluso por el estroma. Además, la IL-1 β modula la producción total de prostaglandina E por las células de la granulosa, proporcionando así un mecanismo para determinar el sitio de la ruptura del folículo (Hurwitz y col., 1995a, b, 1997; Duffy and Stouffer, 2002; Gaytan y col., 2002; Field y col., 2014). Su incremento en el día esperado de la ovulación en el grupo P0 podría contribuir a la falla en el orquestado mecanismo de la ovulación. Por otro lado, no se encontraron diferencias en el LF o suero entre los grupos de persistencia folicular y el grupo control, resultados que concuerdan con lo observado en tejido evaluado por inmunohistoquímica en el modelo experimental. Los resultados aquí presentados concuerdan con los de Niu y col. (2017), en los que no se identificaron diferencias en las concentraciones de IL-1 β e IL-4 entre los grupos control y PCOS. Sin embargo, Rashid y col. (2017) detectaron IL-1 β en suero de mujeres con PCOS y controles, y el nivel fue significativamente menor en PCOS en comparación con los controles. Cabe destacar que, los resultados en el modelo experimental concuerdan con los observados en la COD espontánea, tanto en tejido, como en LF y suero, dando un indicio de que el modelo representa un escenario compatible a la enfermedad a campo, con la ventaja que pueden ser evaluadas las etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad.

Un componente importante del sistema de la IL-1 intraovárico es el antagonista natural del receptor de IL-1 (IL-1RA), que actúa como un atenuador de la acción de IL-1. El IL-1RA en el ovario de rata se expresa en células de la granulosa de folículos preantrales pero no en folículos de etapas anteriores (Wang y col., 1997; Brännström, 2004). Passos y col. (2016) demostraron la presencia de esta citoquina en todas las estructuras del ovario bovino, con una débil expresión de la misma en las células de la teca. Estos resultados coinciden con la expresión observada a lo largo de la foliculogénesis en el grupo control. Sin embargo, en la COD y en los grupos de persistencia folicular, la expresión de IL-1RA a lo largo de la foliculogénesis fue relativamente constante. En un sistema de perfusión *in vitro* en ovarios de rata, se ha demostrado que IL-1RA suprime el número de ovulaciones estimuladas con LH (Peterson y col., 1993). A su vez, se demostró el rol *in vivo* para el IL-1RA en la ovulación, donde la administración en el saco de la bolsa ovárica de ovarios preovulatorios de rata disminuyó la respuesta ovulatoria cuando se administró IL-1RA antes de hCG (Ono y col., 1997) o 5 horas después de hCG (Simón y col., 1994; Brännström, 2004). Polimorfismos en

los genes de *IL-1 β* e *IL-1RA* han sido correlacionados positivamente con la probabilidad de esterilidad causada por PCOS en humanos (Xia y col., 2013). A su vez, determinaron que los pacientes con estos genes de alto riesgo deben realizar una prevención temprana y evitar la aparición de trastornos metabólicos y otras complicaciones a largo plazo. Por lo tanto, consideramos a la ovulación como un curso de eventos inflamatorios y el organismo aparentemente intenta limitar la cascada de reacción subsiguiente, manteniendo de esta manera la integridad de los tejidos subyacentes. Se sugiere que el IL-1RA actúa de forma autocrina/paracrina en la vecindad inmediata de las células para minimizar la respuesta inflamatoria generada por IL-1 β (Rashid y col., 2017). De este modo, IL-1RA suprime las reacciones mediadas por IL-1 α y β del sistema inmune contra el daño del tejido ovárico durante la ovulación. Büscher y col. (1999) demostraron que el LF peri-ovulatorio humano contiene concentraciones sustanciales de IL-1RA. El equilibrio entre los niveles de IL-1RA e IL-1 en los tejidos locales influye en los efectos fisiológicos o fisiopatológicos relativos de la IL-1 (Arend, 2002). En humanos, los niveles de IL-1RA son elevados en la circulación de pacientes con una variedad de afecciones inflamatorias, infecciosas y posquirúrgicas, indicando la importancia de la producción de esta proteína antiinflamatoria (Arend y col., 1998). Es muy probable que el IL-1RA circulante se difunda en los tejidos e influya en la relación local de IL-1RA / IL-1. Sin embargo, debido al efecto del receptor soluble, se necesitan niveles de IL-1RA 100 veces superiores a IL-1 para inhibir funcionalmente los efectos biológicos de IL-1 en las células diana (Arend y col., 1990). Por lo tanto, IL-1RA debe producirse abundantemente en los tejidos locales para bloquear los efectos de la IL-1 (Arend, 2002). Dado que IL-1 α mostró sobreexpresión en granulosa de quistes y folículos persistentes, se podría explicar la elevada expresión de IL-1RA, con el fin de contrarrestar a IL-1, tal como se observa en los quistes foliculares y en los folículos persistentes del grupo P15 en relación con los folículos dominantes del grupo control, situación que podría haber interferido con el proceso ovulatorio.

El IL-1RI evidenció una expresión constante sin diferencias entre los grupos, excepto en quistes en los que fue significativamente mayor en comparación con los folículos dominantes del grupo control, tanto en las células de la granulosa como en la teca interna. Nuestros resultados coinciden con los de Scherzer y col. (1996) donde se describen que, el subtipo de receptor principal en el ovario de rata durante la foliculogénesis es la IL-1RI con niveles de expresión elevados prácticamente constantes en el folículo, en contraste con la expresión muy baja de IL-1RII (Scherzer y col., 1996, Brännström, 2004). Sin embargo, se han reportado

resultados contradictorios en diferentes estudios. Schmidt y col. (2014) evaluaron la expresión de IL-1RI en los ovarios de pacientes sanos y con PCOS por medio de PCR cuantitativa y encontraron una menor expresión de este receptor en el estroma ovárico en pacientes con PCOS y no encontraron diferencias en la expresión del mismo receptor en células de la granulosa. Nuestros resultados difieren de los descritos anteriormente, probablemente debido a diferencias entre especies, y probablemente, debido a diferencias metodológicas. Los resultados observados en la COD espontánea no fueron reflejados en el modelo experimental de persistencia folicular. En el modelo, la expresión de IL-1RI no mostró diferencias, excepto en los folículos antrales en los que la granulosa del grupo P0 mostró menor expresión que los grupos P5, P10 y P15, sin diferencias con el grupo control. El IL-1RI puede sufrir un desprendimiento dependiente de la metaloproteinasa del dominio extracelular, dando lugar a un receptor soluble (Elzinga y col., 2009; Twomey y col., 2009). El ectodominio separado (sIL-1RI) actúa como señuelo soluble, ya que es capaz de capturar IL-1 y prevenir su interacción con receptores de membrana (Burger y col., 1995; Kopf y col., 2010). Sin embargo, sIL-1RI también capta y secuestra el antagonista IL-1RA, reduciendo así la capacidad inhibitoria de este (Burger y col., 1995; Symons y col., 1995; Boraschi y Tagliabue, 2013). Por otra parte, la expresión de IL-1RI fue significativamente menor en la granulosa de los folículos de los primeros estadios de desarrollo que en los quistes en el grupo COD espontánea, y la inmunomarcación fue contante en la foliculogénesis del resto de los grupos evaluados. La presencia de IL-1RI se demostró previamente en ovocitos, granulosa, teca y células del cúmulus en el tejido ovárico de ratones (Simón y col., 1994), ratas (Wang y col., 1997; Kol y col., 1999b), mujeres (Hurwits y col., 1992; De los Santos y col., 1998) y yeguas (Martoriati y col., 2002). En el bovino (Passos y col., 2016), el ratón (Terranova y Rice, 1997) y los humanos (Wang y col., 1997), la expresión de IL-1RI varía con el desarrollo folicular y población celular ovárica (Wang y col., 1997; Murayama y col., 2010). El ARNm de IL-1RI está presente en las células granulosa y teca de folículos en crecimiento, pero ausente en folículos primordiales y preantrales en el ovario de rata (Wang y col., 1997). Por otra parte, el ARNm de IL-1RI es más abundante en células de teca que en células de granulosa en folículos preovulatorios de rata (Wang y col., 1997; Murayama y col., 2010).

La expresión de IL-1RII en los quistes, fue significativamente mayor que en los folículos dominantes del grupo control, tanto células de la granulosa como de la teca interna. IL-1RII tiene una cola citoplasmática corta y no posee dominio TIR, por lo que no genera señal. Se libera en una forma soluble (Kuhn y col., 2007, Lorenzen y col., 2012) como

consecuencia del procesamiento proteolítico o empalme alternativo (IL-1RIIs) (Garlanda y col., 2013). IL-1RII regula negativamente la actividad de IL-1 por diferentes mecanismos. Al unirse con alta afinidad, IL-1RII actúa como una trampa molecular para IL-1 (Colotta y col., 1993; Re y col., 1996). Curiosamente, IL-1RII se une a IL-1RA al menos 100 veces menos eficientemente que los agonistas (Smith y col., 2003; Garlanda y col., 2013). La proIL-1 β puede ser procesada extracelularmente por la caspasa-1 liberada y por otras proteasas, y dar lugar a formas activas de la citoquina, aumentando de este modo la inflamación (Hazuda y col., 1990). En esta situación, el IL-1RIIs es capaz de capturar a la proIL-1 β y, al ligarse, prevenir su clivaje proteolítico (Symons y col., 1995; Boraschi y Tagliabue, 2013). El IL-1RIIs también se localiza en el citosol de células que expresan IL-1RII (Kawaguchi y col., 2006) y es capaz de capturar proIL-1 β (Symons y col., 1995; Boraschi y Tagliabue, 2013) y proIL-1 α (Zheng y col., 2013). Varios mediadores antiinflamatorios inducen la expresión de IL-1RII, entre los cuales se cuentan a las hormonas glucocorticoides, prostaglandinas, aspirina, citoquinas Th2 (IL-4 e IL-13), IL-10 e IL-27 (Spriggs y col., 1992; Colotta y col., 1993), sugiriendo que la inducción de IL-1RII contribuye al efecto antiinflamatorio de estos mediadores (Garlanda y col., 2013; Bonecchi y col., 2016).

Los receptores señuelos y receptores sin señalización o atípica, han surgido como una estrategia general conservada en la evolución para ajustar la acción de las citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Bonecchi y col., 2016). El aumento de la expresión de IL-1RII se detectó en los folículos quísticos y podría reflejar la activación de la regulación negativa endógena de las vías de la inflamación. En el modelo de persistencia folicular, la expresión en las células de la granulosa fue mayor en los folículos antrales de los grupos P5 y P15 que en todos los otros grupos. En los folículos persistentes, la expresión de IL-1RII fue mayor en los grupos P5, P10 y P15 que en los folículos dominantes del grupo control. En las células de la teca de los folículos persistentes, la expresión fue mayor en el grupo P0 que en todos los otros grupos. La mayor expresión de IL-1RII detectada en los folículos persistentes se condice con lo observado en la COD espontánea. A lo largo de la foliculogénesis las células de la granulosa de animales controles, mostraron la mayor expresión en los folículos atrésicos en relación a las categorías restantes, este resultado podría indicar una clara participación de la IL-1 en la proliferación de las células de la granulosa, siendo el IL-1RII encargado de bloquear la acción de esta citoquina. El IL-1RII se comportó de la misma manera a lo largo de la foliculogénesis en el grupo COD espontánea y control, mostrando los quistes una marcación similar a los folículos atrésicos. En los grupos P5, P10 y P15 la

expresión fue similar al grupo control. El grupo P15, en particular mostró, a lo largo de la foliculogénesis, una expresión similar a la detectada en el grupo COD. Estos resultados soportan aún más la utilidad de este modelo en el estudio de la quistogénesis. Estudios anteriores demuestran la presencia del IL-1RII en la foliculogénesis normal en bovinos (Passos y col., 2016). Estos autores observaron mediante inmunohistoquímica una tinción de moderada a fuerte en células de la granulosa, mientras que las células de teca tenían una tinción moderada en folículos antrales grandes, sin mostrar marcación en estadios anteriores. Ellos determinaron que con el crecimiento de folículos antrales pequeños a grandes, hay un aumento en la expresión de IL-1RII (Passos y col., 2016). Nuestros resultados en el grupo control difieren de los de Passos y col. (2016) dado que detectamos marcación en todos los estadios evaluados siendo la mayor expresión en la capa de células de la teca del grupo de folículos antrales, esto puede deberse en parte a la homogeneidad de las muestras utilizadas o diferencias técnicas.

Estos hallazgos revelan la complejidad de la regulación del sistema IL-1, de modo que un desequilibrio en cualquiera de sus miembros podría romper el equilibrio del mismo. IL-1RII e IL-1RA podrían estar bloqueando la participación de IL-1 β en el complejo proceso ovulatorio, pero, por otro lado, la sobreexpresión de IL-1RI en quistes foliculares espontáneos podría estar favoreciendo la acción de esta citoquina. Así mismo, encontramos sobreexpresada IL-1 α en la granulosa de los quistes y folículos persistentes y, teniendo en cuenta que ambos ligandos se unen a los mismos receptores, podrían ser responsables de una acción alterada de estas citoquinas sobre las células del folículo ovárico que, como sabemos, están implicadas en la proliferación, diferenciación y apoptosis (Chun y col., 1995; Brännström, 2004).

5.2.2. *Expresión de IL-4*

Se observaron variaciones en la expresión de IL-4, las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos quísticos del grupo COD espontánea mostraron una mayor expresión que los folículos dominantes del grupo control. Del mismo modo, en el modelo experimental de inducción de folículos persistentes la expresión fue mayor en las células de la granulosa de los folículos persistentes de todos los grupos de persistencia que en los folículos dominantes del grupo control. En las células de la teca de los folículos persistentes de los grupos P0 y P15, la expresión fue mayor que en los folículos dominantes del grupo control.

La expresión de IL-4 en folículos quísticos y persistentes del grupo P15 se comportó de manera similar. Hatzirodos y col. (2014) describieron el perfil de transcriptoma de las células de la granulosa de los folículos ováricos bovinos y el gen del receptor inmunorregulador, IL4R fue identificado entre la lista de genes activados en folículos antrales grandes. Se ha demostrado que la expresión de IL-4 y su receptor aumentan en el folículo preovulatorio de rata (Leo y col., 2001). Colotta y col. (1993) demostraron que IL-1RII actúa como una trampa molecular para IL-1, una función mejorada por IL-4, que aumenta la expresión en la membrana y la liberación de esta molécula de unión a IL-1. Con respecto a esto, la expresión tanto de IL-1RII como de IL-4 fue mayor en los folículos atrésicos y quistes, esto podría indicar una co-estimulación en la secreción de estas citoquinas, evidenciado por una expresión similar de ambas citoquinas a lo largo de la foliculogénesis. Se ha demostrado que la IL-4 estimula la expresión de ARNm de 3β -HSD en cultivos primarios de células de la granulosa luteinizadas humanas (Cote y col., 2000; Simard y col., 2005). A lo largo de la foliculogénesis las células de la granulosa de animales controles, mostraron la mayor expresión en los folículos atrésicos en relación a las categorías restantes, este resultado podría indicar una clara participación de la IL-4 en la regulación de la proliferación de las células de la granulosa. La IL-4 se comportó de la misma manera a lo largo de la foliculogénesis en el grupo COD espontánea, mostrando los quistes una marcación similar a los folículos atrésicos. En los grupos de persistencia folicular los folículos atrésicos evidenciaron la mayor expresión con respecto a los folículos de los primeros estadios de desarrollo. Volpert y col. (1998) demostraron que la IL-4 es un potente inhibidor de la angiogénesis *in vivo* cuando se introduce localmente, así como cuando se inyecta sistémicamente. Este proceso es importante para el crecimiento folicular normal durante las etapas finales de la foliculogénesis y se encuentra alterado en los folículos quísticos (Isobe y col., 2005, 2008). A su vez la IL-4 tiene actividad antiinflamatoria y podría estar bloqueando el proceso inflamatorio asociado a la ovulación. Previamente ha sido demostrado que la IL-4 tiene un efecto antiinflamatorio directo *in vitro* mediante la supresión de la secreción de IL-1 β , IL-12, IL-10 y TNF- α por monocitos e IL-1 β e IL-12 por macrófagos (Dembic, 2015).

El análisis de la concentración sérica y en LF de IL-4 no mostró diferencias entre las vacas controles y con COD. Sin embargo, en ambos grupos, los niveles de IL-4 fueron mayores en LF que en suero. Por otro lado, y comportándose de manera similar el análisis de las concentraciones séricas y de LF de IL-4 no mostró diferencias entre los grupos control y el modelo experimental. Sin embargo, en los grupos control, P10 y P15, los niveles de IL-4

fueron más altos en LF que en suero. Este hecho resalta la importancia de la regulación local de esta citoquina en el compartimento folicular y se evidencia una secreción local de esta citoquina. Dado que las citoquinas tienen en su mayoría un modo de acción paracrino o autocrino, creemos que las concentraciones intrafoliculares representan mejor su papel en las funciones ováricas que las concentraciones sanguíneas. Las concentraciones de citoquinas en la sangre pueden estar influenciadas por sitios de producción extraováricos, y la producción extraovárica de citoquinas no siempre contribuye significativamente a las concentraciones de citoquinas en el compartimento folicular. Por lo tanto, podría considerarse que las concentraciones intrafoliculares de citoquinas generan un interés especial en el estudio de su papel en las funciones ováricas. Gaafar y col. (2014) evaluó las citoquinas en LF de mujeres con PCOS y concluyó que la IL-4 en LF no mostró asociación con el PCOS. Sin embargo, Ostanin y col. (2007) demostraron que en pacientes con foliculogénesis alterada, las concentraciones de IL-4 en el LF fueron significativamente menores que en las mujeres con una mayor cantidad media de ovocitos recogidos. En el mismo estudio se determinó que la ausencia de embarazo después de la fertilización *in vitro* se asocia con niveles más bajos de IL-4 en combinación con contenidos elevados de IL-8. Los resultados denotan una función relevante de las citoquinas en la regulación de la ovogénesis y en la preparación del endometrio para la implantación del embrión.

5.2.3. *Expresión de IL-6*

La IL-6, otra citoquina pleiotrópica multifuncional que presenta propiedades tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, ha sido implicada como un regulador intraovárico. Los macrófagos activados y muchas otras células inmunes expresan IL-6, al igual que la mayoría de las células estromales (Hunter y Jones, 2015). Se ha informado que las células de la granulosa y teca expresan esta citoquina (Taylor y Terranova, 1995; Liu y col., 2009; Bromfield y Sheldon, 2011; Price y Sheldon, 2013). Los niveles elevados de otras citoquinas proinflamatorias, incluyendo el TNF- α y la IL-1 β , pueden regular la producción de IL-6 de manera autocrina/paracrina (Hunter y Jones, 2015). Además de su papel clave en la respuesta inmune innata y adaptativa a la infección, IL-6 ha sido implicada en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos vinculados con respuestas inflamatorias que incluyen la regulación metabólica, el control neuroendocrino, la disfunción reproductiva, la resistencia a

la insulina y la enfermedad vascular (Telleria y col., 1998; Scheller y col., 2011; Samir y col., 2017).

El ARNm que codifica IL-6 se detectó mediante PCR cuantitativa en tiempo real en células de LF de ovarios humanos (Wu y col., 2007). Las fluctuaciones en la expresión del gen *IL-6* se han correlacionado con la angiogénesis cíclica que se produce durante la maduración del folículo ovárico (Motro y col., 1990). En esta tesis, no se observó diferencia en la expresión de ARNm en muestras control y quísticas, de acuerdo con lo observado por Wu y col. (2007) en quistes foliculares de mujeres con PCOS en comparación con folículos normales de mujeres sanas.

Debido a que la IL-6 es producida por las células ováricas y se encuentra en el LF, esta citoquina puede actuar como un regulador autocrino y paracrino de la función ovárica (Adashi y col., 1990; Buyalos y col., 1992). Brännström (2004) demostró que el ovario de rata produce IL-6 antes y durante el proceso ovulatorio. En este sentido, observamos una expresión moderada de IL-6 en la granulosa y la teca de todas las categorías foliculares de folículos controles, aunque, durante la foliculogénesis en el resto de los grupos persistencia folicular y COD se evidenciaron variaciones en la expresión de esta proteína. Las células de la granulosa de los quistes espontáneos mostraron mayor expresión con respecto a los folículos antrales del grupo control. En ratones, se informó una mayor inmunomarcación para la IL-6 en las células que rodean a los folículos quísticos, principalmente en las células de la teca y las células del estroma, en comparación con los ratones controles (Deshpande y col., 2000). En cambio, al comparar la concentración en LF y suero de IL-6, no se hallaron diferencias entre animales control y con COD. Zhang y col. (2017) examinaron el perfil de citoquinas en LF de controles y pacientes con PCOS. Encontraron que las concentraciones de IL-6 en el sobrenadante del LF fueron significativamente mayores en pacientes con PCOS en comparación con el grupo control. Se ha demostrado que la concentración de IL-6 en suero y LF se correlaciona con la etiología de la infertilidad, las tasas de fertilización y los resultados del embarazo en mujeres (Hammadeh y col., 2000; Zhang y col., 2017).

Previamente, describimos que la expresión de IL-6 fue significativamente mayor en las células de la granulosa de los quistes que en los folículos antrales del grupo control, sin diferencias en las células de teca. Estos resultados coinciden parcialmente con los detectados en el modelo experimental, en los que la expresión de IL-6 fue mayor en las células de la granulosa de los folículos persistentes del grupo P15 que en los folículos dominantes de los animales controles. A su vez, la expresión de IL-6 fue mayor en el grupo P0 que en los

folículos dominantes del grupo control, indicando un cambio temprano en la expresión de esta citoquina. Además, se detectó una mayor expresión de IL-6 en la teca interna de folículos persistentes de P10 relacionados con folículos dominantes de animales controles, así como en folículos antrales de los grupos P10 y P15 en relación con los folículos antrales controles. Aunque la concentración de IL-6 en LF fue similar en todos los grupos, se detectó un aumento en los niveles séricos, donde las concentraciones fueron significativamente mayores en los grupos P5, P10 y P15 en relación al grupo control. Estos resultados coinciden con los postulados por Amato y col. (2003) y por Vgontzas y col. (2006), quienes observaron que las mujeres infértiles con PCOS mostraban niveles mayores de IL-6 en suero en relación al grupo control. Como describen otros autores (Bersinger y col., 2014), el nivel sérico de citoquinas refleja la liberación de esta citoquina por parte de todos los folículos activos e incluso el estroma. Es decir, el aumento de los niveles séricos en los animales con folículos persistentes sería una consecuencia de un mayor número de folículos que liberan citoquinas en el torrente sanguíneo. Es probable que parte de lo que se expresa en células de la granulosa se dirija hacia la teca y desde allí al torrente circulatorio. Debe observarse que los niveles de esta citoquina no disminuyeron pero permanecieron similares en todos los grupos, a pesar del alto volumen de LF total en estas estructuras. Varios estudios apoyan la función de la IL-6 en la neovascularización que acompaña a la fisiología del tejido en remodelación (Lin y col, 2003; Nilsson y col., 2005). Por otra parte, la participación de la IL-6 en la angiogénesis se ha demostrado previamente, por lo que este aumento en su expresión podría estar relacionado con el aumento de la vascularización de las capas de células de la teca observado en este modelo (Díaz y col., 2015) y en las capas de células de la teca de quistes foliculares de vacas con COD espontánea (Isobe y col., 2005, 2008). Esta alteración puede estar asociada con el desarrollo avanzado de la vasculatura y la acumulación de LF en los folículos quísticos, característica de esta enfermedad (Isobe y col., 2005). Loret de Mola y col. (1996) y Cannon (1998) postularon que la IL-6 tiene un efecto estimulante sobre la secreción de LH, que está alterada en pacientes con PCOS (Kazer y col., 1987; Amato y col., 2003), como ocurre en animales con COD y en el modelo experimental. En este punto, debe recordarse que esta IL también tiene acciones antiinflamatorias, una razón por la cual los altos niveles detectados en este estudio pueden estimular un aumento de antagonistas de IL-1 α y TNF- α , como se ha observado en los resultados aquí presentados, ya sea suprimiendo o disminuyendo la respuesta inflamatoria (Tilg y col., 1994). Aunque no se encontraron cambios en los niveles foliculares entre los grupos, el aumento en los niveles séricos probablemente tenga efectos a

nivel de otros órganos implicados en la reproducción como el eje hipotálamo-hipófisis y sugiere la participación de esta citoquina en la fisiopatología de la COD.

5.2.4. *Expresión de IL-8*

La expresión de IL-8 en la COD espontánea no mostró alteraciones, excepto en los folículos antrales, en los que la teca interna del control expresó menores niveles en relación a las vacas con COD. En el modelo experimental la expresión de IL-8 en las células de la granulosa fue mayor en los folículos primarios, preantrales grandes y antrales de los grupos P0 y P15 relacionados con el grupo de control. Además, los folículos persistentes de los grupos P0, P5 y P15 mostraron una mayor expresión de IL-8 que los folículos dominantes del grupo control. La expresión de esta citoquina fue constante a lo largo de la foliculogénesis en el grupo control, mostrando la mayor expresión en las células de la granulosa. Sin embargo, en el grupo de animales con COD y en todos los grupos de persistencia, se observó la mayor expresión en las células de la granulosa de los folículos antrales con respecto a los primarios. A su vez en el modelo de persistencia observamos que en las células de la granulosa hubo diferencias en la expresión de esta IL en los estadios iniciales de desarrollo folicular. Estos resultados demuestran que IL-8 podría estar implicada en la regulación de la proliferación y la angiogénesis, como ha sido reportado por otros autores (Koch y col., 1992, Schadendorf y col., 1993). Estos dos procesos son importantes para el crecimiento folicular normal durante las etapas finales de la foliculogénesis y se encuentran alterados en los folículos persistentes y quísticos (Isobe y col., 2005; Díaz y col., 2015; Belotti y col., 2017). La permanente expresión local de IL-8 y la invasión de neutrófilos pueden afectar la foliculogénesis y deteriorar la reserva ovárica (Kitaya y Yamada, 2011). En los bovinos, la IL-8 promueve la luteinización después de la ovulación (Shimizu y col., 2012, 2013) y se cree que es un mediador potente de la ovulación mediante el reclutamiento y la activación de neutrófilos. Al mismo tiempo, en LF observamos que la concentración de IL-8 en el grupo control y los primeros grupos de persistencia folicular no pudo medirse debido a que la concentración se encontraba por debajo del nivel de detección de la técnica, mientras que en LF de los quistes espontáneos y persistentes del grupo P15 la concentración de la citoquina fue cuantificable en todas las muestras. Esto sugiere que el aumento podría ser gradual a través de la persistencia folicular, haciéndose evidente hacia el día 15 de persistencia lo que se condice con los quistes espontáneos. Esto nos permite concluir que el aumento de la expresión de IL-8 en las células

de la granulosa de los folículos antrales de vacas COD y persistentes de los grupos P0, P5 y P15 y la concentración encontrada en LF de quistes y folículos persistentes del grupo P15, podría contribuir, junto con la IL-6, a la intensa angiogénesis previamente mostrada en los folículos persistentes de este modelo (Díaz y col., 2015) y también observada en los quistes espontáneos (Isobe y col., 2005, 2008).

Teniendo en cuenta los resultados aquí discutidos, podemos suponer que la IL-8 contribuye a la detención del desarrollo folicular y, por tanto, a la persistencia folicular y recurrencia de la enfermedad, interfiriendo con el correcto desarrollo folicular.

5.2.5. *Expresión de TNF- α*

TNF- α es una citoquina proinflamatoria multifuncional secretada principalmente por macrófagos activados y otras células inmunes, incluidos los linfocitos T, aunque también se ha demostrado que muchos otros tipos de células, incluidas las células endoteliales vasculares, las células del músculo esquelético y células del ovario, expresan y/o secretan TNF- α (Price y Sheldon, 2013; Peake y col., 2015). TNF- α ha demostrado ejercer múltiples efectos fisiológicos sobre la función ovárica, incluyendo la modulación sobre la esteroidogénesis folicular y lútea, la atresia del folículo y luteólisis (Wu y col., 2004; Turner y col., 2011; Walusimbi y Pate, 2013; Sheldon y col., 2014; Samir y col., 2017). El ARNm que codifica el TNF- α ha sido detectado en ovario en células de LF humanas y de rata (Sancho-Tello y col., 1992). En acuerdo con los hallazgos de Wu y col. (2007), no encontramos diferencias en la expresión de ARNm entre el control y muestras de quistes. Los resultados de la inmunoexpresión difieren de los obtenidos a nivel de expresión génica de *IL-1 α* , *IL-6* y *TNF- α* , y la ausencia de ARNm de la mayoría de las muestras del grupo control puede ser debido a la baja expresión de estos genes o a la escasa cantidad de muestra obtenida a partir de las células del LF. Además, como lo observaron Martoriati y Gérard (2003), la expresión de los genes de las citoquinas en las células de la granulosa varía durante la maduración folicular, probablemente bajo la influencia de gonadotrofinas.

Se ha descrito que TNF- α se expresa en ovarios normales de ratas, ratones, vacas, mujeres y otras especies, con mayor expresión principalmente en células de la granulosa (Roby y Terranova, 1989; Zolti y col., 1990; Deshpande y col., 2000). En este sentido nosotros detectamos que la inmunomarcación de TNF- α fue mayor en la granulosa de los folículos primarios y preantrales en relación a los folículos antrales y atrésicos en el grupo

control. TNF- α se ha implicado como un factor de crecimiento que promueve la apoptosis de ovocitos, que se considera necesaria para que se produzca el ensamblaje del folículo en las etapas iniciales de la foliculogénesis (Chen y col., 1993; Marcinkiewicz y col., 1994; Kondo y col., 1995; Morrison y Marcinkiewicz, 2002; Marcinkiewicz y col., 2002; Nilsson y col., 2006). Por otro lado, Hong y col. (2016), demostraron la capacidad de TNF- α de estimular la proliferación las células de la teca interna porcinas *in vitro*. La expresión de esta proteína a través de la foliculogénesis en los grupos COD, P0 y P10 presentó el mismo patrón de expresión que el grupo control. Todos los grupos mostraron mayor expresión de TNF- α en células de la granulosa de quistes y folículos persistentes respecto a los estadios iniciales de desarrollo. En síntesis, esta citoquina se expresó diferencialmente durante la foliculogénesis en todos los grupos en estudio, hecho que sugiere la posible influencia del TNF- α la maduración folicular (De y col., 1992; Deshpande y col., 2000). Esto podría indicar que se producen cambios desde las primeras etapas del desarrollo de los folículos (como del grupo P0), que estarían implicados en alteraciones permanentes en las etapas iniciales de la foliculogénesis, lo que contribuiría a la recurrencia previamente informada para la COD (Vanholder y col., 2006).

Por otro lado, pudimos observar que las células de la granulosa de quistes espontáneos mostraban mayor expresión con respecto a los folículos antrales del grupo control. Coincidiendo con estos hallazgos, Amato y col. (2003) demostraron que en mujeres infértiles con PCOS, las concentraciones de TNF- α e IL-6 en el suero y el LF eran mayores que las determinadas en las mujeres controles. En el modelo experimental, se detectaron variaciones en la expresión de TNF- α en prácticamente todas las categorías foliculares comparadas. Específicamente, la expresión de TNF- α en la granulosa de los folículos persistentes de los grupos P0, P5 y P10 fue mayor que en los folículos dominantes controles. Estos resultados coinciden con los de Deshpande y col. (2000), que demostraron que la inmunomarcación de TNF- α es mayor en las células que rodean los folículos quísticos, principalmente en la teca y las células del estroma, en comparación con los controles. Johnson y col. (1999) sugirieron que el TNF- α secretado del complejo de células ovocito-cúmulo ayuda en el proceso ovulatorio por inducción de la expresión del gen de la colagenasa folicular. Una alteración en esta enzima afectaría claramente al proceso ovulatorio. El TNF- α es liberado por las células de la granulosa bovina, aumentando gradualmente durante la fase folicular y alcanzando un pico alrededor de la ovulación junto con aumentos en la secreción de prostanoïdes, los cuales desempeñan papeles en los eventos que conducen a la ovulación (Wang y col., 1992; Loret de

Mola y col., 1996). Por lo tanto, el aumento de la secreción de esta citoquina en este modelo experimental podría estar interfiriendo con su función durante la ovulación. Silva y col. (2017), describieron las proteínas del sistema TNF- α en diferentes etapas del desarrollo folicular en bovinos. A su vez, demostraron que la adición de TNF- α *in vitro* reduce la supervivencia de los folículos y aumenta el número de células apoptóticas en el tejido ovárico, mientras que la adición de dexametasona al medio de cultivo mantiene la ultraestructura del folículo en el tejido. En base a estos resultados recientes, podemos suponer que TNF- α es crucial en el control de la apoptosis a nivel ovárico y la sobreexpresión observada influye en la proliferación de las células foliculares. A su vez, nuestro grupo de trabajo demostró que el balance proliferación/apoptosis se encuentra alterado tanto en quistes foliculares como en el modelo experimental (Salveti y col., 2010; Belotti y col., 2017). Estos resultados tomados en conjunto nos hacen suponer que TNF- α podría tener un papel en este desbalance. Además, los resultados observados en el modelo experimental concuerdan con los de la COD espontánea, una mayor expresión de esta citoquina en la granulosa de los folículos quísticos y en los folículos persistentes en los días 0, 5 y 10 de persistencia, sin diferencias en los folículos de 15 días de persistencia relacionados con los folículos controles. Esto podría indicar que la expresión de TNF- α en las primeras etapas de la persistencia puede estar relacionada con el desarrollo de los quistes. La disminución de la expresión de TNF- α en el grupo P15 relacionada con los otros grupos de persistencia podría deberse a una menor proporción de células sanas de granulosa y, por tanto, a una disminución de la expresión de esta proteína, ya que, como hemos descrito anteriormente, hay una disminución en el espesor de esta capa y un aumento en las células apoptóticas en las etapas más avanzadas de la persistencia.

Se ha observado una expresión diferencial de las citoquinas evaluadas durante el desarrollo folicular, lo que sugiere la posible influencia de las citoquinas en la maduración folicular (De y col., 1992; Deshpande, 2000). Esta afirmación se aplica a lo evidenciado durante el análisis de la foliculogénesis para las diferentes citoquinas evaluadas en esta tesis. Se detectó la expresión de todas las citoquinas en células de la granulosa y de la teca interna de los folículos en todas las etapas de desarrollo evaluadas, en los animales control y en cada grupo experimental. La expresión de las citoquinas estudiadas varía a lo largo de la foliculogénesis de manera diferencial en los distintos grupos. Esto podría indicar que las variaciones observadas se producen desde las primeras etapas de desarrollo de los folículos. Podrían estar involucradas en la dificultad de reanudar los ciclos normales, lo que

predispondría a una recurrencia de la COD como se ha informado previamente (Silvia et al., 2002; Vanholder et al., 2006). Esto a su vez, sugiere una función relevante de estas citoquinas en el diálogo paracrino entre la capa de células granulosa/teca y el ovocito.

Aunque hay pocos estudios sobre la expresión proteica de citoquinas en células ováricas de mamíferos o sobre citoquinas en enfermedades reproductivas en bovinos, no se encontraron estudios previos sobre la expresión constitutiva de la mayoría de estas proteínas en ovarios bovinos adultos y en ovarios quísticos bovinos. En general, en la granulosa de los quistes se observó una inmunomarcación más alta que en los folículos antrales o dominantes del grupo control. Dado que las células de la granulosa son los componentes primarios de los compartimentos de las células foliculares, una disfunción de estas células puede contribuir a la función ovárica anormal observada en la COD (Ortega y col., 2007; Velázquez y col., 2010; Salvetti y col., 2010; Marelli y col., 2014; Matiller y col., 2014). Por lo tanto, el aumento de la producción de citoquinas en las células de la granulosa de los quistes, como se observó en la mayoría de las citoquinas y receptores evaluados, puede conducir a una disfunción de las células de la granulosa con el consecuente desarrollo folicular anormal, afectando varios pasos importantes en la maduración folicular, y contribuyendo finalmente a la anovulación y la disfunción ovárica. Estos resultados sugieren una participación del sistema inmune en la patogénesis de la COD.

Diversos estudios involucran a las citoquinas evaluadas en los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis (Koch y col., 1992; Schadendorf y col., 1993; Spicer y Alpizar, 1994; Chun y col., 1995; Brännström, 2004; Hong y col., 2016). En este sentido, otros investigadores han confirmado que el balance de proliferación/apoptosis se altera en los folículos quísticos en animales con COD espontánea (Isobe y Yoshimura, 2007). También se ha observado que la proliferación en quistes foliculares está disminuida, con bajos niveles de apoptosis (Salvetti y col., 2010). Asimismo, en el modelo experimental se confirmó que el balance de proliferación/apoptosis se encuentra alterado (Belotti y col., 2017). La combinación de la débil actividad proliferativa y los bajos niveles de apoptosis observados en los quistes foliculares y folículos persistentes podrían explicar por qué estos folículos crecen lentamente y luego mantienen una condición estática sin degeneración, conduciendo a su persistencia. Estas alteraciones pueden deberse a modificaciones estructurales y funcionales que tienen lugar en las células foliculares y podrían estar relacionadas con los cambios hormonales que ocurren en los animales con COD (Salvetti y col., 2012). Mientras que numerosos factores influyen en este delicado equilibrio, el sistema IL-1 podría además añadir

sus acciones a otros sistemas como el IGF y los sistemas TGF- β . Se ha observado que la expresión de IGF1, un fuerte inductor de la proliferación, es menor en los quistes (Ortega y col., 2008, Rodríguez y col., 2015), y TGF- β 1 y 2 es mayor en los quistes que en estructuras análogas en el ovario (Matiller y col., 2014). Tales circunstancias inusuales favorecen la persistencia de estas estructuras, que continúan secretando niveles alterados de citoquinas, factores de crecimiento y hormonas, contribuyendo así a la patogénesis de la COD.

El estrés se ha postulado como uno de los factores predisponentes más importantes de la COD (Vanholder y col., 2006, Amweg y col., 2016). Los GC son hormonas inducidas por el estrés y agentes antiinflamatorios que modulan la producción de citoquinas y prostaglandinas en diferentes procesos reproductivos: ovulación, luteólisis, implantación de embriones, crecimiento fetal y desarrollo placentario (Hillier y Tetsuka, 1998; Andersen, 2002; Myers y col., 2007; Tetsuka y col., 2010; Duong y col., 2012; Majewska y col., 2012; Kuse y col., 2013; Amweg y col., 2016). La generación de GC durante la ovulación ayudaría a limitar el proceso inflamatorio en el ovario (Hillier y Tetsuka, 1998; Andersen, 2002; Michael y col., 2003). Sin embargo, situaciones extremas podrían afectar el mecanismo ovulatorio normal, alterando el ciclo estral y bloqueando la ovulación (Amweg y col., 2017). Se ha demostrado que la ACTH aumenta la secreción endógena de cortisol, induciendo así la persistencia folicular y la formación de quistes en el ganado bovino (Dobson y col., 2000; Salvetti y col., 2010; Amweg y col., 2013). Estos resultados, nos llevan a concluir que la expresión del complejo sistema de comunicación intercelular que integran estas citoquinas está claramente alterada y que esto puede conducir a la alteración de la función celular, contribuyendo a la persistencia folicular y los cambios endocrinos encontrados en ganado con COD. Debido a que la ovulación en los mamíferos es similar a una reacción inflamatoria, esperábamos una disminución en la expresión de las citoquinas proinflamatorias evaluadas. Sin embargo, en el modelo de persistencia folicular inducido por progesterona y en la COD espontánea, hemos encontrado un aumento de la expresión de citoquinas en granulosa y teca células de folículos persistentes y quistes. La alteración en la expresión de las citoquinas aquí analizadas puede afectar a varios pasos importantes en la maduración folicular, contribuyendo en última instancia a la anovulación y la disfunción ovárica. Por otra parte, resultados anteriores han demostrado que algunas citoquinas antiinflamatorias, como TGF- β 1, se incrementan en las vacas con COD (Matiller y col., 2014). Los resultados aquí presentados son consistentes con los de Matiller y col. (2014). En esta tesis, de acuerdo con esos resultados, se incrementaron los niveles de IL-1RA, IL-1RII, IL-4 e IL-6 en vacas con COD y

persistencia folicular. En estudios futuros, se debe evaluar la expresión de otras citoquinas con funciones antiinflamatorias, así como receptores y antagonistas que podrían desempeñar un rol en la gran cascada de eventos relacionados con la ovulación y, por lo tanto, en su fracaso. Esto proporcionará una imagen más amplia de la función de las citoquinas en la patogénesis de la COD.

6. *CONCLUSIONES*

Existen evidencias crecientes que indican que son necesarios ciertos tipos de respuestas inflamatorias en varios eventos reproductivos. Bajo estas condiciones fisiológicas e incluso fisiopatológicas, las citoquinas parecen ejercer sus actividades pleiotrópicas en el sistema reproductivo. Los resultados de esta tesis sugieren una estrecha relación entre los sistemas inmunológico y reproductivo, mostrando su participación a lo largo de la foliculogénesis y, considerando el modelo experimental usado, su relación con la patogénesis de la COD.

Los programas reproductivos pueden ser controlados mediante diferentes parámetros para comprobar su éxito o fracaso, siendo el objetivo principal, cumplir con la premisa de generar anualmente un ternero por vaca. A su vez, las vacas lecheras son animales seleccionados para producir grandes cantidades de leche, dicha selección ha ido en detrimento de otras características, como las cualidades reproductivas. Para lograr estos altos niveles de producción se ponen en funcionamiento numerosos procesos fisiológicos con altas demandas de energía, las cuales deben ser cumplidas a través de una correcta alimentación. Esta situación va acompañada del estrés que sufre el animal en confinamiento (manejo, rutina de ordeño, clima, calor, enfermedades, hacinamiento, entre otros). La combinación de alta producción, balance energético negativo y estrés ponen en riesgo la homeostasis del animal, situación que afecta la eficiencia del sistema reproductor. Por lo tanto, cualquier alteración de la función reproductiva, como la aparición de quistes foliculares, o alteraciones en la frecuencia de los ciclos estrales, son capaces de provocar una importante reducción en la eficiencia reproductiva de estos animales y en consecuencia, en la producción de terneros. Todo esto repercute económicamente en el tambo a través de la disminución de la producción de litros de leche y del aumento en los costos debido a tratamientos veterinarios. Por este motivo existe un gran interés en desarrollar modelos que permitan dilucidar los procesos por los cuales se desencadenan las alteraciones de origen ovárico en vacas lecheras, y de esta manera determinar su etiopatogenia y desarrollar posibles medidas preventivas y/o terapéuticas. Además, el desarrollo de los métodos necesarios para estos estudios, permiten disponer de herramientas no sólo para la investigación de estos trastornos, sino además, para su aplicación en posibles medidas preventivas, terapéuticas y en el estudio de otras enfermedades.

Los resultados obtenidos en esta tesis aumentan el estado actual del conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad quística ovárica y los mecanismos involucrados en la

persistencia folicular. De esta manera, con los resultados obtenidos y la discusión de los mismos considerando los aportes de otros autores, obtuvimos las siguientes conclusiones:

El estudio de los mecanismos que conllevan a la falla en el proceso de ovulación y la persistencia folicular es una de las claves para comprender la patogénesis de la COD. En el presente estudio, con dosis bajas de progesterona, pudo realizarse la inducción de folículos persistentes que, al cabo de 15 días de persistencia a partir del momento esperado de ovulación, llegaron a ser estructuras compatibles con la definición de quistes foliculares y por ende asociados a la COD. Así, los folículos persistentes siguen siendo similares en su histomorfometría a los folículos sanos, aunque gradualmente van perdiendo células de la granulosa sin llegar a presentar pérdida completa de dicha capa o luteinización. Esta conservación de capas de células funcionales le permite al folículo persistente responder a los cambios en el ambiente hormonal. Gracias a la utilidad de este modelo experimental, se han obtenido datos relevantes sobre lo que sucede en etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad, que llevarían finalmente a la formación de los quistes, con las consiguientes infructuosas inseminaciones artificiales o mortalidad embrionaria temprana. Este aporte podría contribuir a medidas que ayuden a lograr diagnósticos oportunos y a tratamientos efectivos.

Ha sido previamente demostrado que las citoquinas aquí evaluadas cumplen un rol importante en los mecanismos que regulan la diferenciación, proliferación y apoptosis, es decir, el desarrollo de las células foliculares, así como en la comunicación intercelular y entre las diferentes capas celulares que componen el folículo ovárico mediante mecanismos paracrinós y autocrinos. Es por esto que una expresión alterada podría modificar las funciones normales del ovario y de esta manera formar parte de procesos patológicos como la persistencia folicular y la COD.

Los resultados proporcionan evidencia de que la COD y la persistencia folicular inducida por el tratamiento prolongado con progesterona en vacas lecheras son concurrentes con una expresión alterada de estas citoquinas. La expresión de la mayoría de las citoquinas evaluadas se encuentra aumentada en P0 (día esperado de ovulación), P15 (análogo a un quiste folicular), y en los quistes espontáneos. Esto demuestra la importancia del modelo experimental en el estudio de las etapas tempranas de la enfermedad. Además, estas citoquinas se expresaron diferencialmente durante la foliculogénesis, lo que sugiere la posible influencia de estas en la maduración folicular.

La inmunoexpresión de todas las citoquinas se determinó en células de la granulosa y de la teca en folículos de diferentes etapas de desarrollo en los animales control. Sin embargo, en las células de la granulosa se observaron la mayoría de los cambios. Esto sugiere la participación de estas citoquinas en la comunicación celular intraovárica.

En la COD, encontramos una expresión alterada de IL-1 α , IL-1RA, IL-1RI, IL-1RII, IL-4, IL-6 y TNF- α particularmente elevada en quistes foliculares, dando evidencia de mecanismo regulador alterado, IL-1RII y el IL-1RA, dadas sus características antiinflamatorias, podrían estar bloqueando la participación de IL-1 β en el complejo proceso ovulatorio, pero por otro lado la sobreexpresión de IL-1RI podría compensar la acción de esta citoquina. La IL-4, que tiene actividad antiinflamatoria, podría contribuir a un bloqueo en el proceso inflamatorio asociado a la ovulación. Por su parte, la IL-8 no mostró alteraciones excepto en los folículos antrales, etapa previa al desarrollo del folículo destinado a ovular, por lo que su implicancia estaría en la etapa final del desarrollo folicular, en la cual se sabe que interviene en la quimiotaxis neutrofílica al momento de la ovulación. Se ha demostrado previamente que las citoquinas evaluadas influyen en la esteroidogénesis, la proliferación folicular ovárica, la diferenciación y la apoptosis. Sumado a ello, estudios previos y paralelos indican que estos procesos se encuentran alterados de manera temprana en el modelo utilizado lo que podría estar asociado a la alteración en la expresión de estas citoquinas.

En el modelo experimental de persistencia folicular, no se observaron diferencias en la expresión del ligando de IL-1 β o IL-1RI, sino un aumento de la expresión de IL-1 α , IL-1RA e IL-1RII en la granulosa de los folículos persistentes, evidenciando una modificación en el mecanismo regulador. De la misma manera que en la enfermedad espontánea, el IL-1RII y el IL-1RA podrían estar bloqueando la participación de IL-1 β y esto podría explicar en parte la anovulación observada en este modelo. A su vez, la IL-4 mostró una mayor expresión en los folículos persistentes de prácticamente todos los grupos, y dada su actividad antiinflamatoria, podría estar inhibiendo el proceso inflamatorio. La IL-6, IL-8 y TNF- α también mostraron una sobreexpresión en los folículos persistentes, dada a la importante intervención en la angiogénesis, proliferación, diferenciación y apoptosis de estas citoquinas, consideramos que podrían ser puntos claves en el desarrollo de esta enfermedad.

Los cambios incipientes detectados en este estudio desde el momento preciso de la anovulación (P0) podrían indicar que estas citoquinas ejercen una función importante en este proceso y contribuyen así a la patogénesis de la COD.

Estos hechos demuestran la complejidad de la red de comunicación intercelular de la que forman parte las citoquinas. La alteración de las citoquinas en tejido y LF de animales con COD indican un trastorno del microambiente inmunológico del folículo ovárico, y considerando el alto grado de reincidencia de la COD, los cambios a nivel del desarrollo folicular temprano pueden afectar la foliculogénesis futura y contribuir a la aparición recurrente de esta enfermedad.

Un desbalance en la expresión de las citoquinas relacionadas a la ovulación, contribuiría en la persistencia folicular avalando los resultados encontrados en el modelo experimental y en los casos de COD espontánea. Futuros estudios podrían exponer aún más las complejidades de la COD en el ganado y aclarar la acción de las citoquinas en esta enfermedad y ayudar a desarrollar nuevas estrategias preventivas o terapéuticas.

Finalmente, la información recabada y producida permite al grupo de trabajo la posibilidad de trasladar recursos teóricos y técnicos al medio rural donde se produce la enfermedad y de esta manera brindar nuevas herramientas para la comprensión, diagnóstico y tratamiento de los folículos persistentes y quistes, produciendo una mejora en los sistemas de producción lechera.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta TJ, Miyamoto A, Ozawa T, Wijayagunawardane MP, Sato K. 1998. Local release of steroid hormones, prostaglandin E2, and endothelin-1 from bovine mature follicles in vitro: effects of luteinizing hormone, endothelin-1, and cytokines. *Biol Reprod.* 59: 437-443.
- Acosta TJ, Tetsuka M, Matsui M, Shimizu T, Berisha B, Schams D, Miyamoto A. 2005. In vivo evidence that local cortisol production increases in the preovulatory follicle of the cow. *J Reprod Dev.* 51: 483-489.
- Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malh, P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology.* 69: 72-80.
- Adashi EY, Resnick CE, Packman JN, Hurwitz A, Payne DW. 1990. Cytokine-mediated regulation of ovarian function: tumor necrosis factor inhibits gonadotropin-supported progesterone accumulation by differentiating and luteinized murine granulosa cells. *Am J Obstet Gynecol.* 162: 889-899.
- Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hamalainen T, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Lan ZJ, Liu K. 2010. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum Mol Genet.* 3: 397-410.
- Aerts JMJ, Bols PEJ. 2010a. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reprod Dom Anim.* 45: 171-179.
- Aerts JMJ, Bols PEJ. 2010b. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Development. Reprod Dom Anim.* 45: 180-187.
- Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. 2012. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood.* 119: 651-665.
- Ahmad N, Schrick FN, Butcher RL, Inskeep EK. 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol Reprod.* 52: 1129-1135.
- Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, Duan S, Eiwegger T, Eljaszewicz A, Ferstl R, Frei R, Garbani M, Globinska A, Hess L, Huitema C, Kubo T2, Komlosi Z, Konieczna P, Kovacs N, Kucuksezer UC, Meyer N, Morita H, Olzhausen J, O'Mahony L, Pezer M, Prati M, Rebane A, Rhyner C, Rinaldi A, Sokolowska M, Stanic B, Sugita K, Treis A, van de Veen W, Wanke K, Wawrzyniak M, Wawrzyniak P, Wirz

- OF, Zakzuk JS, Akdis CA. 2016. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor b, and TNF-a: Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 138: 984-1010.
- Alfaro NS, Salvetti NR, Velazquez MM, Stangaferro ML, Rey F, Ortega HH. 2012. Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Res Vet Sci.* 92: 478-85.
- Alpizar E, Spicer LJ. 1993. Effects of Interleukin-6 on Proliferation and Follicle-Stimulating Hormone-Induced Estradiol Production by Bovine Granulosa Cells In Vitro: Dependence on Size of Follicle. *Biol Reprod.* 49: 38-43.
- Alpizar E, Spicer LJ. 1994. Effects of interleukin-6 on proliferation and follicle-stimulating hormone-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: dependence on size of follicle. *Biol Reprod.* 50: 38-43.
- Amato G, Conte M, Mazziotti G, Lalli E, Vitolo G, Tucker AT, Bellastella A, Carella C, Izzo A. 2003. Serum and follicular fluid cytokines in polycystic ovary syndrome during stimulated cycles. *Obstet Gynecol.* 101: 1177-1182.
- Amweg AN, Paredes A, Salvetti NR, Lara HE, Ortega HH. 2011. Expression of melanocortin receptors mRNA, and direct effects of ACTH on steroid secretion in the bovine ovary. *Theriogenology.* 75:628-637.
- Amweg AN, Rodríguez FM, Huber E, Marelli BE, Gareis NC, Belotti EM, Rey F, Salvetti NR, Ortega HH. 2017. Detection and activity of 11 beta hydroxylase (CYP11B1) in the bovine ovary. *Reproduction.* 153: 433-441.
- Amweg AN, Rodriguez FM, Huber E, Marelli BE, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. 2016. Role of glucocorticoids in the bovine cystic disease: Expression of glucocorticoid receptor in the bovine ovary. *Cells Tissues Organs.* 201:138-47.
- Amweg AN, Salvetti NR, Stangaferro ML, Paredes AH, Lara HH, Rodríguez FM, Ortega HH. 2013. Ovarian localization of 11 β Hydroxysteroid Dehydrogenase (11 β HSD): Effects of ACTH stimulation and its relationship with bovine cystic ovarian disease. *Domest Anim Endocrinol.* 45: 126-140.
- Andersen CY. 2002. Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis. *J Endocrinol.* 173: 211-217.

- Ando M, Kol S, Kokia E, Ruutiainen-Altman K, Sirois J, Rohan RM, Payne DW, Adashi EY. 1998. Rat ovarian prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2: periovulatory expression of granulosa cell-based interleukin-1-dependent enzymes. *Endocrinology*. 139: 2501-2508.
- Andus T, Geiger T, Hirano T, Northoff H, Ganter U, Bauer J, Kishimoto T, Heinrich PC. 1987. Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett*. 221: 18-22.
- Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. 1998. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol*. 16: 27-55.
- Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP. 1990. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J Clin Invest*. 85: 1694-1697.
- Arend WP. 1991. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest*. 88: 1445-1451.
- Arend, WP. 2002. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 13: 323-340.
- Arici A, Oral E, Bukulmez O, Buradagunta S, Engin O, Olive DL. 1996. Interleukin-8 expression and modulation in human preovulatory follicles and ovarian cells. *Endocrinology*. 137: 3762-3769.
- Armstrong DG, Gutierrez CG, Baxter G, Glazyrin AL, Mann GE, Woad KJ, Hogg CO, Webb R. 2000. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *J Endocrinol*. 165: 101-113.
- Arsenescu R, Arsenescu V, de Villiers WJ. 2011. TNF-alpha and the development of the neonatal immune system: Implications for inhibitor use in pregnancy. *Am J Gastroenterol*. 106: 559-562.
- Artini PG, Monteleone P, Toldin MRP, Matteucci C, Ruggiero M, Cela V, Genazzani AR. 2007. Growth factors and folliculogenesis in polycystic ovary patients. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2: 215-223.
- Bagavandoss P, Wiggins RC, Kunkel SL, Remich DG, Keyes PL. 1990. Tumor necrosis factor production and accumulation of inflammatory cells in the corpus luteum of pseudopregnancy and pregnancy in rabbits. *Biol Reprod*. 42: 367-376.

- Bao B, Garverick HA. 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotrofin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci.* 76: 1903-1921.
- Barak V, Yanai P, Trevers AJ, Roisman I, Simon A, Laufer N. 1992. Interleukin-1: local production and modulation of human granulosa luteal cells steroidogenesis. *Fertil Steril.* 58: 719-725.
- Baratta M, Basini G, Bussolati S, Tamanini C. 1996. Effects of interleukin-1 b fragment (163-171) on progesterone and estradiol-17 β release by bovine granulosa cells from different size follicles. *Regul Pept.* 67: 187-194.
- Baravalle C, Salvetti NR, Mira GA, Lorente JA, Ortega HH. 2007. Role of ACTH in the pathogenesis of Polycystic Ovarian Syndrome in the rat: hormonal profiles and ovarian morphology. *Physiol Res.* 56: 67-78.
- Barnes R, Rosenfield R. 1989. The polycystic ovary syndrome. *Ann Intern Med.* 110: 386-392.
- Bartlett PC, Ngategize PK, Kaneene JB, Kirk JH, Anderson SM, Mather EC. 1986. Cystic follicular disease in Michigan Holstein-Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology and economic impact. *Prev Vet Med.* 4: 15-33.
- Bartolomé JA, Thatcher WW, Melendez P, Risco CA, Archbald LF. 2005. Strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cysts in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 227: 1409-1414.
- Basini G, Baratta M, Bussolati S, Tamanini C. 1998. Interleukin-1 beta fragment (163-171) modulates bovine granulosa cell proliferation in vitro: dependence on size of follicle. *J Reprod Immunol.* 37: 139-153.
- Baskind NE, Balen AH. 2016. Hypothalamic-pituitary, ovarian and adrenal contributions to polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 37: 80-97.
- Bautista AP. 2001. Free radicals, chemokines, and cell injury in HIV-1 and SIV infections and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med.* 31: 1527-1532.
- Beg MA, Ginther OJ. 2006. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction.* 132: 365-377.

- Belayet HM, Kanayama N, Khatun S, Asahina T, Okada Y, Kitamura K, Kobayashi T, Terao T. 2000. Pharmacologic doses of interleukin 8 suppositories induce follicular maturation in rabbits. *Cytokine*. 12: 361-367.
- Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*. 89: 3413-3424.
- Belotti EM, Stassi AF, Velázquez MML, Díaz PU, Marelli BE, Rey F, Notaro US, Ortega HH, Salvetti NR. 2017. Changes in the Proliferation/Apoptosis Balance in the Bovine Ovary: A Key Early Event in Follicular Persistence. *Cells Tissues Organs*. doi: 10.1159/000481167.
- Bergfeld EG, Kojima FN, Cupp AS, Wehrman ME, Peters KE, Mariscal V, Sanchez T, Kinder JE. 1996. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 beta- estradiol in bovine females. *Biol Reprod*. 54: 546-553.
- Bersinger NA, Kollmann Z, Von Wolff M. 2014. Serum but not follicular fluid cytokine levels are increased in stimulated versus natural cycle IVF: a multiplexed assay study. *J Reprod Immunol*. 106: 27-33.
- Best CL, Hill JA. 1995. Interleukin-1 alpha and -beta modulation of luteinized human granulosa cell oestrogen and progesterone biosynthesis. *Hum Reprod*. 10: 3206-3210.
- Bethin KE, Vogt SK, Muglia LJ. 2000. Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 9317-9322.
- Bierschwal CJ. 1966. A clinical study of cystic conditions of the bovine ovary. *J Am Vet Med Assoc*. 149: 1591-1595.
- Bigelow KL, Fortune JE. 1998. Characteristics of prolonged dominant versus control follicles: follicle cell numbers, steroidogenic capabilities, and messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes. *Biol. Reprod*. 58: 1241-1249.
- Bó GA, Caccia M. 2002. Dinámica folicular en el ganado bovino. En: UNGERFELD R. Reproducción en los animales domésticos. Ed. Melibea.

- Bodensteiner KJ, Wiltbank MC, Bergfelt DR, Ginther OJ. 1996. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology*. 45: 499-512.
- Bonafos LD, Kot K, Ginther OJ. 1995. Physical characteristics of the uterus during the bovine estrous cycle and early pregnancy. *Theriogenology*. 43: 713-21.
- Bonder CS, Dickensheets HL, Finlay-Jones JJ, Donnelly RP, Hart PH. 1998. Involvement of the IL-2 receptor gamma-chain (gammac) in the control by IL-4 of human monocyte and macrophage proinflammatory mediator production. *J Immunol*. 160: 4048-4056.
- Bonecchi R, Garlanda C, Mantovani A, Riva F. 2016. Cytokine decoy and scavenger receptors as key regulators of immunity and inflammation. *Cytokine*. 87: 37-45.
- Boraschi D, Tagliabue A. 2013. The interleukin-1 receptor family. *Semin Immunol*. 25: 394-407.
- Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. 2004. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 215: 135-141.
- Bosu WT, Peter AT. 1987. Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 28: 725.
- Bouchard P, Wolf JP, Hajri S. 1988. Inhibition of ovulation: comparison between the mechanism of action of steroids and GnRH analogues. *Hum Reprod*. 3: 503-506.
- Bouma-ter Steege JC, Mayo KH, Griffioen AW. 2001. Angiostatic proteins and peptides. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 11: 319-334.
- Brännström M, Bonello N, Wang LJ, Norman RJ. 1995. Effects of tumor necrosis factor α (TNF α) on ovulation in the rat ovary. *Reprod Fertil Dev*. 7: 67-73.
- Brännström M, Enskog A. 2002. Leukocyte networks and ovulation. *J Reprod Immunol*. 57: 47-60.
- Brännström M, Janson PO. 1989. Progesterone is a mediator in the ovulatory process in the in vitro perfused rat ovary. *Biol Reprod*. 40: 1170-1177.
- Brännström M, Lind AK, Dahm-Kähler P. 2010. Ovulation: a molecular view. In: *Reproductive Endocrinology and Infertility: Integrating Modern Clinical and Laboratory Practice*, DT Carrell, CM Peterson, Eds., Springer Science Business Media, New York. 119-132.

- Brannstrom M, Norman RJ. 1993. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum Reprod.* 8: 1762-1775.
- Brännström M, Pascoe V, Norman RJ, McClure N. 1994. Localization of leukocyte subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual cycle. *Fertil Steril.* 61: 488-495.
- Brännström M, Wang L, Norman RJ. 1993. Effects of cytokines on prostaglandin production and steroidogenesis of incubated preovulatory follicles of the rat. *Biol Reprod.* 48: 165-171.
- Brännström M. 2004. Potential role of cytokines in ovarian physiology: the case for interleukin-1. In: *The Ovary*, 2nd Edit., PCK Leung, EY Adashi, Eds., Elsevier Academic Press, Vancouver. 261-271.
- Braw-Tal R, 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.
- Braw-Tal R. 2002. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Mol Cell Endocrinol.* 187: 11-18.
- Breard E, Benhaim A, Feral C, Leymarie P. 1998. Rabbit ovarian production of interleukin-6 and its potential effects on gonadotropin-induced progesterone secretion in granulosa and theca cells. *J Endocrinol.* 159: 479-487.
- Bréard E, Delarue B, Benhaim A, Feral C, Leymarie P. 1998. Inhibition by rabbit granulosa and theca cells: effects on gonadotropin-induced progesterone production. *Euro J Endocrinol.* 138: 328-336.
- Bridges PJ, Fortune JE. 2003. Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. *Domest Anim Endocrin.* 25: 199-214.
- Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Mayo KE, Shea LD, Woodruff TK. 2006. Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Dev Biol.* 298: 149-154.
- Bromfield JJ, Sheldon IM. 2011. Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression in vitro. *Endocrinology.* 152: 5029-5040.

- Brown EM, Elmore RG, Garverick HA, Kesler DJ. 1982. Gonadotropin releasing hormone treatment of dairy cows with ovarian cysts. II. Histology of ovarian cyst walls. *Theriogenology*. 17: 689-696.
- Brown JL, Schoenemann HM, Reeves JJ. 1986. Effect of FSH treatment on LH and FSH receptors in chronic cystic-ovarian-diseased dairy cows. *J Anim Sci*. 62: 1063-1071.
- Brune B. 2003. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ*. 10: 864-869.
- Brunswig-Spickenheier B, Mukhopadhyay AK. 1997. Stimulation of nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in bovine ovarian theca cells by tumor necrosis factor alpha (TNF alpha). Is this pathway implicated in the TNF alpha-induced inhibition of luteinizing hormone-stimulated prorenin production? *Biol Reprod*. 57: 700-706.
- Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. 1990. Interactions between somatic cells and germcells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod*. 43: 543-547.
- Bukulmez O, Arici A. 2000. Leukocytes in ovarian function. *Hum Reprod*. 6: 1-15.
- Burger D, Chicheportiche R, Giri JG, Dayer JM. 1995. The inhibitory activity of human interleukin-1 receptor antagonist is enhanced by type II interleukin-1 soluble receptor and hindered by type I interleukin-1 soluble receptor. *J Clin Invest*. 96: 38-41.
- Büscher U, Chen FC, Kentenich H, Schmiady H. 1999. Cytokines in the follicular fluid of stimulated and non-stimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction? *Hum Reprod*. 14: 162-166.
- Bustin S, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 55: 611-622.
- Butcher RL, Pope RS. 1979. Role of estrogen during prolonged estrous cycles of the rat on subsequent embryonic death or development. *Biol Reprod*. 21: 491-495.
- Buyalos R P, Watson J M, Martinez-Maza O. 1992. Detection of interleukin-6 in human follicular fluid. *Fertil Steril*. 57: 1230-1234.
- Calder MD, Manikkam M, Salfen BE, Youngquist RS, Lubahn DB, Lamberson WR, Garverick HA. 2001. Dominant bovine ovarian follicular cysts express increased levels

of messenger RNAs for luteinizing hormone receptor and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta(4),delta(5) isomerase compared to normal dominant follicles. *Biol Reprod.* 65: 471-476.

Calder MD, Salfen BE, Bao B, Youngquist RS, Garverick HA. 1999. Administration of progesterone to cows with ovarian follicular cysts results in a reduction in mean LH and LH pulse frequency and initiates ovulatory follicular growth. *J Anim Sci.* 77: 3037-3042.

Callejas S. 2001. Fisiología del ciclo estral bovino. En: Palma, G. ed. *Biotecnología de la Reproducción.* p 701.

Campbell BK, Souza C, Gong J, Webb R, Kendall N, Marsters P, Robinson G, Mitchell A, Telfer EE, Baird DT. 2003. Domestic ruminants as models for elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reproduction.* 61: 429-443.

Cannon JG. 1998. Adaptive interactions between cytokines and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Ann N Y Acad Sci.* 856: 234-242.

Carlberg M, Nejaty J, Fröysa B, Guan Y, Söder O, Bergqvist A. 2000. Elevated expression of tumor necrosis factor alpha in cultured granulosa cells from women with endometriosis. *Hum Reprod.* 15: 1250-1255.

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

Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, Depinho RA. 2003. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science.* 5630: 215-218.

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

Cerri PS, Pereira-Junior JA, Biselli NB, Sasso-Cerri E. 2010. Mast cells and MMP-9 in the lamina propria during eruption of rat molars: Quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Anat.* 217: 116-125.

Chang RJ, Gougeon A, Erickson GF. 1998. Evidence for a neutrophil-interleukin-8 system in human folliculogenesis. *Am J Obstet Gynecol.* 178: 650-657.

- Chen HL, Marcinkiewicz JL, Sancho-Tello M, Hunt JS, Terranova PF. 1993. Tumor necrosis factor- α gene expression in mouse oocytes and follicular cells. *Biol Reprod.* 48: 707-714.
- Chun SY, Eisenhauer KM, Kubo M, Hsueh AJ. 1995. Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology.* 136: 3120-3127.
- Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. 1993. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science.* 261: 472-475.
- Cook DL, Parfet JR, Smith CA, Moss GE, Youngquist RS, Garverick HA. 1991. Secretory patterns of LH and FSH during development and hypothalamic and hypophyseal characteristics following development of steroid-induced ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J Reprod Fertil.* 91: 19-28.
- Cook DL, Smith CA, Parfet JR, Youngquist RS, Brown EM, Garverick HA. 1990. Fate and turnover rate of ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J Reprod Fertil.* 90: 37-46.
- Correia-Álvarez E, Gómez E, Martín D, Carrocera S, Pérez S, Otero J, Peynot N, Giraud-Delville C, Caamaño JN, Sandra O, Duranthon V, Muñoz M. 2015a. Expression and localization of interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor (type I) in the bovine endometrium and embryo. *J Reprod Immunol.* 110: 1-13.
- Correia-Álvarez E, Gómez E, Martín D, Carrocera S, Pérez S, Peynot N, Giraud-Delville C, Caamaño JN, Balseiro A, Sandra O, Duranthon V, Muñoz M. 2015b. Early embryonic and endometrial regulation of tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor 2 in the cattle uterus. *Theriogenology.* 83: 1028-1037.
- Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC. 1997. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Hum Reprod.* 12: 759-768.
- Cote S, Feltus AF, Gingras S, Freeman M, Melner MH, Simard J. 2000. IL-4 stimulation of ovarian 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase type II gene expression: mechanisms of activation. Program of the 82nd Annual Meeting of The Endocrine Society, Toronto, p 313.
- Cupp AS, Garcia-Winder M, Zamudio A, Mariscal V, Wehrman M, Kojima N, Peters K, Bergfeld E, Hernandez P, Sanchez T, Kittok R, Kinder J. 1992. Two concentrations of

progesterone (P4) in circulation have a differential effect on pattern of ovarian follicular development in the cow. *Biol Reprod.* 44: 64.

Cupp AS, Stumpf TT, Kojima FN, Werth LA, Wolfe MW, Roberson MS, Kittok RJ, Kinder JE. 1995. Secretion of gonadotrophins change during the luteal phase of the bovine oestrous cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or 17 beta-oestradiol. *Anim Reprod Sci.* 37: 109-119.

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

Davies KJ. 1995. Oxidative stress: The paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp.* 61: 1-31.

Day ML, Anderson LH. 1998. Current concepts on the control of puberty in cattle. *J Anim Sci.* 76: 1-15.

Day N. 1991. The treatment and prevention of cystic ovarian disease. *Vet Med.* 86: 761-766.

De Los Santos MJ, Anderson DJ, Racowsky C, Simón C, Hill JA. 1998. Expression of interleukin-1 system genes in human gametes. *Biol Reprod.* 59: 1419-1424.

De M, Sanford T, Wood G. 1992. Interleukin-1, Interleukin- 6, and tumor necrosis factor a are produced in the mouse uterus during the estrous cycle and are induced by estrogen an progesterone. *Dev Biol.* 151: 297-305.

De Rensis F, Peters AR. 1999. The control of follicular dynamics by PGF2Alpha, GnRH, hCG and oestrus syn- chronization in cattle. *Reprod Domest Anim.* 34: 49-59.

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

Dellmann HD, Eurell JA. 1998. Textbook of veterinary histology. 5th ed, London: Williams y Wilkins. 252.

Dembic Z. 2015. Cytokines of the Immune System: Interleukins. En: *The Cytokines of the Immune System.* 6: 143-239.

Deshpande R, Chang M, Chapman J, Michael S. 2000. Alteration of cytokine production in follicular cystic ovaries induced in mice by neonatal estradiol injection. *Am J Reprod Immunol.* 44: 80-88.

- Devoto L, Kohen P, Munoz A, Strauss JF. 2009. Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online*. 18: 19-24.
- Dhillon WS, Murphy KG, Bloom S. 2006. Endocrinology: the next 60 years. *J Endocrinol*. 190: 7-10.
- Díaz PU, Hein GJ, Belotti EM, Rodríguez FM, Rey F, Amweg AN, Matiller V, Baravalle ME, Ortega HH, Salvetti NR. 2016a. BMP2, 4 and 6 and BMPRII are altered from early stages of bovine cystic ovarian disease development. *Reproduction*. 152: 333-350.
- Díaz PU, Stangaferro ML, Gareis NC, Silvia W, Matiller V, Salvetti NR, Rey F, Barberis F, Cattaneo L, Ortega HH. 2015. Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: an experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology*. 84: 1149-1160.
- Díaz PU. 2016b. Rol biológico de las BMPs y la AMH en la patogenia de la persistencia folicular relacionada con la Enfermedad Quística Ovárica Bovina. Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias-Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional del Litoral.
- Dinarello CA. 1994. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J*. 8: 1314-1325.
- Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM. 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci*. 78: 345-370.
- Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. 2002. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol*. 21: 33-49.
- Dobson H, Ribadu AY, Noble KM, Tebble JE, Ward WR. 2000. Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle. *J Reprod Fertil*. 120: 405-410.
- Dobson H, Smith RF. 1995. Stress and reproduction in farm animals. *J Reprod Fertil Suppl*. 49: 451-461.
- Doucet C, Brouty-Boyé D, Pottin-Clemenceau C, Jasmin C, Canonica GW, Azzarone B. 1998. IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. *Int Immunol*. 10: 1421-1433.

- Driancourt MA. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55: 1211-1239.
- Duffy DM, Stouffer RL. 2002. Follicular administration of a cyclo-oxygenase inhibitor can prevent oocyte release without alteration of normal luteal function in rhesus monkeys. *Hum Reprod*. 17: 2825-2831.
- Duncan WC. 2000. The human corpus luteum: Remodelling during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. *Rev Reprod*. 5: 12-17.
- Duong HT, Piotrowska-Tomala KK, Acosta TJ, Bah MM, Sinderewicz E, Majewska M, Jankowska K, Okuda K, Skarzynski DJ. 2012. Effects of cortisol on pregnancy rate and corpus luteum function in heifers: an in vivo study. *J Reprod Dev* 58: 223-230.
- Ebejer K, Calleja-Agius J. The role of cytokines in polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 29: 36-540.
- Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, Verderber E, Brewer MT, Hannum CH, Thompson RC. 1990. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature*. 343: 341-346.
- Ellman C, Corbett JA, Misko TP, McDaniel M, Beckerman KP. 1993. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced cellular cytotoxicity in the rat ovary. A potential role for nitric oxide in the ovulatory process. *J Clin Invest*. 92: 3053-3056.
- Elzinga BM, Twomey C, Powell JC, Harte F, McCarthy JV. 2009. Interleukin-1 receptor type 1 is a substrate for γ -secretase-dependent regulated intramembrane proteolysis. *J Biol Chem*. 284: 1394-1409.
- Enciclopedia Bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1º Edición. 2008. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Enciclopedia Británica. 2007. 15ª Edición. Editorial Enciclopedia Británica.
- Eppig JJ. 1985. Oocyte-somatic cell interactions during oocyte growth and maturation in the mammal. *Dev Biol*. 1: 313-347.
- Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122: 829-838.
- Erb RE, Monk EL, Callahan CJ, Mollet TA. 1973. Endocrinology of induced ovarian follicular cysts. *J Anim Sci (Abstr.)*. 37: 310.

- Erickson BH. 1966a. Development and radio respons of the prenatal bovine ovary. *J Reprod Fertil.* 11: 91-105.
- Erickson BH. 1966b. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci.* 25: 800-805.
- Espey LL, Belilinger AS, Healy JA. 2004. Ovulation: an inflammatory cascade of gene expression. In: *The Ovary*, 2nd Edit., PCK Leung, EY Adashi, Eds., Elsevier Academic Press, Vancouver. 145-165.
- Espey LL. 1980. Ovulation as an inflammatory reaction- A hypothesis. *Biol Reprod.* 22: 73-106.
- Espey LL. 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod.* 50: 233-238.
- Espey LL. 1999. Ovulation. En: *Encyclopedia of Reproduction*, Vol. 3, eds. E. Knobil and J. D. Neill. San Diego: Academic Press, 605-614.
- Espinoza-Villavicencio JL, Ortega Pérez R, Palacios Espinosa A, Valencia Méndez J, Aréchiga Flores CF. 2007. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia.* 32: 93-99.
- Evans AC, Adams GP, Rawlings NC. 1994. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J Reprod Fertil.* 100: 187-194.
- Eyestone WH, Ax RL. 1984. A review of ovarian follicular cysts in cows, with comparisons to the condition in women, rats and rabbits. *Theriogenology.* 22: 109-125.
- Fathala MA, Geissenger HD, Liptrap RM. 1978. Effects of endometrial damage and prostaglandin F2a in experimental cystic ovarian follicles in the cow. *Res Vet Sci.* 25: 269-279.
- Fernández Sánchez, MÁ. 2008. El aparato reproductor de la vaca. Morfología, estructura y función. En: *El ciclo estral de la vaca. Diagnóstico fotográfico.* (Ed.: Fernández Sánchez, M.Á.) Servet, Zaragoza, España, 2-10.
- Field SL, Dasgupta T, Cummings M, Orsi NM. 2014. Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. *Mol Reprod Dev.* 81: 284-314.

- Filion F, Bouchard N, Goff AK, Lussier JG, Sirois J. 2001. Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo. *J Biol Chem.* 276: 34323-34330.
- Findlay JK, Drummond AE. 1999. Regulation of the FSH Receptor in the Ovary. *Trends Endocrinol Metab.* 10: 183-188.
- Finnegan A, Grusby MJ, Kaplan CD, O'Neill SK, Eibel H, Koreny T, Czipri M, Mikecz K, Zhang J. 2002. IL-4 and IL-12 regulate proteoglycan- induced arthritis through stat-dependent mechanisms. *J Immunol.* 169: 3345-3352
- Folman Y, Rosenberg M, Herz Z, Davidson M. 1973. The relationship between plasma progesterone concentrations and conception in postpartum dairy cows maintained on two levels of nutrition. *J Reprod Fertil.* 34: 267-278.
- Forbes K, Westwood M. 2010. Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth. *J Endocrinol* 207:1-16.
- Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JM, Crowe MA. 2011. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci.* 124: 163-169.
- Fortín M. 1989. Sincronización de celos en bovinos con prostaglandinas. Aspectos prácticos. *CABIA.* 15: 29-39.
- Fortune JE. 1986. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol Reprod.* 35: 292-299.
- Fortune JE. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 50: 225-232.
- Fortune JE. 2003: The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 78: 135-163.
- Frankenstein Z, Alon U, Cohen IR. 2006. The immune-body cytokine network defines a social architecture of cell interactions. *Biol Direct.* 1: 32.
- Franks S, Stark J, Hardy K. 2008. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 14: 367-378.
- Fukuoka M, Yasuda K, Taii S, Takakura K, Mori T. 1989. Interleukin-1 stimulates growth and inhibits progesterone secretion in cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology.* 124: 884-890.

- Gaafar TM, Hanna MOF, Hammady MR, Amr HM, Osman OM, Nasef A, Osman AM. 2014. Evaluation of cytokines in follicular fluid and their effect on fertilization and pregnancy outcome. *Immunol Invest.* 43: 572-584.
- García Sacristán A. 1995. *Fisiología Veterinaria*. Editorial Interamericana. McGraw-Hill, España.
- García-Velasco JA, Arici A. 1998. Chemokines and human reproduction. *Fertil Steril.* 71: 983-993.
- Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. 2013. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity.* 39: 1003-1018.
- Garnero O, Perusia O. 2002. Cirugía de cabeza, cuello y torax. Aparato reproductor de la hembra. En: Garnero O, Perusia O, *Manual de anestésicos y cirugías del bovino*. 3ra edición. Ed. Imprenta San Cayetano, Santa Fe. 31: 59-76
- Garverick HA. 1997. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci.* 80: 995-1004.
- Gasque Gómez R. 2008. Capítulo 10: Reproducción Bovina. En: *Enciclopedia Bovina*. (Ed. Comité Editorial de la Universidad Nacional Autónoma de México) 1ra Edición, México. 393.
- Gaytan F, Tarradas E, Bellido C, Morales C, Sanchez-Criado JE. 2002. Prostaglandin E inhibits abnormal follicle rupture and restores ovulation in indomethacin-treated rats. *Biol Reprod.* 67: 1140-1147.
- Geneser F. 2005. *Histología*. 3ra edición. Editorial Médica Panamericana. 813.
- Gerard N, Caillaud M, Martoriati A, Goudet G, Lalmanach AC. 2004. The interleukin-1 system and female reproduction. *J Endocrinol.* 180: 203-212.
- Ghersevich S, Isomaa V, Vihko P. 2001. Cytokine regulation of the expression of estrogenic biosynthetic enzymes in cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 172: 21-30.
- Gibbons JR, Wiltbank MC, Ginther OJ. 1999. Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol Reprod.* 60: 72-77.
- Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. 2001. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod.* 65: 638-647.

- Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. 1998. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. *Theriogenology*. 50: 507-519.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. 1999. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. *Theriogenology*. 52: 1079-1093.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol Reprod*. 63: 383-389.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP, 1989: Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol Reprod*. 41: 247-254.
- Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Wiltbank MC. 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*. 48: 75-87.
- Ginther OJ. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci*. 60-61: 61-79.
- Gorospe WC, Hughes FM Jr, Spangelo BL. 1992. Interleukin-6: effects on and production by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology*. 130: 1750-1752.
- Gorospe WC, Spangelo BL. 1993. Interleukin-6 production by rat granulosa cells in vitro: effects of cytokines, follicle-stimulating hormone, and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *Biol Reprod*. 48: 538-543.
- Goto J, Suganuma N, Takata K, Kitamura K, Asahina T, Kobayashi H, Muranaka Y, Furuhashi M, Kanayama N. 2002. Morphological analyses of interleukin-8 effects on rat ovarian follicles at ovulation and luteinization in vivo. *Cytokine*. 20: 168-173.
- Gottsche ML, Van Kirk EA, Murdoch WJ. 2000. Tumour necrosis factor alpha up-regulates matrix metalloproteinase-2 activity in periovulatory ovine follicles: metamorphic and endocrine implications. *Reprod Fertil Dev*. 12: 75-80.
- Gottschall PE, Katsuura G, Dahl RR, Hoffmann ST, Arimura A. 1988. Discordance in the effects of interleukin-1 on rat granulosa cell differentiation induced by follicle-stimulating hormone or activators of adenylate cyclase. *Biol Reprod*. 39: 1074-1085.

- Gottschall PE, Uehara A, Talbot Hoffmann S, Arimura A. 1987. Interleukin-1 inhibits follicle stimulating hormone-induced differentiation in rat granulosa cells in vitro. *Biochem Biophys Res Comm.* 149: 502-509.
- Gottshall PE, Katsuura G, Arimura A. 1989. Interleukin-1 suppresses follicle-stimulating hormone-induced estradiol secretion from cultured ovarian granulosa cells. *J Reprod Immunol.* 15: 281-290.
- Gümen A, Sartori R, Costa FM, Wiltbank MC. 2002. A GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure can induce development of follicular cysts. *J Dairy Sci.* 85: 43-50.
- Gümen A, Wiltbank MC. 2002. An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. *Biol Reprod.* 66: 1689-1695.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales.* 7ª ed. McGraw-Hill. Interamericana.
- Haider S, Knöfler M. 2009. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta.* 30: 111.
- Hamilton SA, Garverick HA, Keisler DH, Xu ZZ, Loos K, Youngquist RS, Salfen BE. 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol Reprod.* 53: 890-898.
- Hammadeh ME, Braemert B, Baltes S, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. 2000. Relationship between ovarian stimulation regimen and cytokine concentration in follicular fluid and their effect on fertilization and pregnancy outcome of patients undergoing ICSI program. *Am J Reprod Immunol.* 43: 12-20.
- Hart P, Bonder C, Balogh J, Dickensheets HL, Donnelly RP, Finlay-Jones JJ. 1999. Differential responses of human monocytes and macrophages to IL-4 and IL-13. *J Leukoc.* 66: 575-578.
- Hashii K, Fujiwara H, Yoshioka S, Kataoka N, Yamada S, Hirano T, Mori T, Fujii S, Maeda M. 1998. Peripheral blood mononuclear cells stimulate progesterone production by luteal cells derived from pregnant and non-pregnant women: possible involvement of interleukin-4 and interleukin-10 in corpus luteum function and differentiation. *Hum Reprod.* 13: 2738-2744.

- Hatler TB, Hayes SH, Anderson LH, Silvia WJ. 2006. Effect of a single injection of progesterone on ovarian follicular cysts in lactating dairy cows. *Vet J.* 172: 329-333.
- Hatler TB, Hayes SH, Laranja Da Fonseca LF, Silvia WJ. 2003. Relationship between endogenous progesterone and follicular dynamics in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts. *Biol Reprod.* 69: 218-223.
- Hatler TB, Hayes SH, Ray DL, Reames PS, Silvia WJ. 2008. Effect of subluteal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows. *Vet J.* 177: 360-368.
- Hattori M, Sakamoto K, Fujihara N, Kojima I. 1996. Nitric oxide: A modulator for the epidermal growth factor receptor expression in developing ovarian granulosa cells. *Am J Physiol.* 270: C812-C818.
- Hatzirodos N, Irving-Rodgers HF, Hummitzsch K, Harland ML, Morris SE, Rodgers RJ. 2014. Transcriptome profiling of granulosa cells of bovine ovarian follicles during growth from small to large antral sizes. *BMC Genomics.* 15: 24.
- Hazuda DJ, Strickler J, Kueppers F, Simon PL, Young PR. 1990. Processing of precursor interleukin 1 β and inflammatory disease. *J Biol Chem.* 265: 6318-6322.
- Hein GJ, Panzani CG, Rodríguez FM, Salvetti NR, Díaz PU, Gareis NC, Benítez GA, Ortega HH, Rey F. 2015. Impaired insulin signaling pathway in ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci.* 156: 64-74.
- Henricks DM, Hill JR, Dickey JF. 1973. Plasma ovarian hormone levels and fertility in beef heifers treated with melengestrol acetate (MGA). *J Anim Sci.* 37: 1169-1175.
- Hickey MM, Simon MC. 2006. Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Curr Top Dev Biol.* 76: 217-257.
- Hill JR, Lamond DR, Henricks DM, Dickey JF, Niswender GD. 1971. The effect of melengestrol acetate (MGA) on ovarian function and fertilization in beef heifers. *Biol Reprod.* 4: 16-22.
- Hillier SG, Tetsuka M. 1998. An anti-inflammatory role for glucocorticoids in the ovaries?. *J Reprod Immunol.* 39: 21-27.
- Hillier SG. 2001. Gonadotrophic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol.* 179: 39-46.

- Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, Nakajima K, Pyun KH, Kishimoto T. 1985. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci USA*. 82: 5490-5494.
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, Tsunasawa S, Sakiyama F, Matsui H, Takahara Y, Taniguchi T, Kishimoto T. 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*. 324: 73-76.
- Hirano T. 2014. Revisiting the 1986 molecular cloning of interleukin 6. *Front Immunol*. 5: 456.
- Hirshfield AN. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*. 124: 43-101.
- Hodes GE, Pfau ML, Leboeuf M, Golden SA, Christoffel DJ, Bregman D, Rebusi N, Heshmati M, Aleyasin H, Warren BL, Lebonté B, Horn S, Lapidus KA, Stelzhammer V, Wong EH, Bahn S, Krishnan V, Bolaños-Guzman CA, Murrough JW, Merad M, Russo SJ. 2014. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111: 16136-16141.
- Holmes-McNary M. 2002. Nuclear factor kB signaling in catabolic disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab*. 5: 255-263.
- Hong L, Zhang Y, Wang Q, Han Y, Teng X. 2016. Effects of interleukin 6 and tumor necrosis factor- α on the proliferation of porcine theca interna cells: Possible role of these cytokines in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 55: 183-187.
- Hooijer GA, Lubbers RB, Ducro BJ, van Arendonk JA, Kaal-Lansbergen LM, van der Lende T. 2001. Genetic parameters for cystic ovarian disease in dutch black and white dairy cattle. *J Dairy Sci*. 84: 286-291.
- Hsieh M, Zamah AM, Conti M. 2009. Epidermal Growth Factor-Like Growth Factors in the Follicular Fluid: Role in Oocyte Development and Maturation. *Semin Reprod Med*. 27: 52-61.

- Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev.* 15: 707-724.
- Hunter C, Jones S. 2015. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol.* 16: 448-457.
- 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: 461-477.
- Hurwitz A, Dushnik M, Solomon H, Ben-Chetrit A, Finci-Yeheskel Z, Milwidsky A, Mayer M, Adashi EY, Yagel S. 1993. Cytokine-mediated regulation of rat ovarian function: interleukin-1 stimulates the accumulation of a 92-kilodalton gelatinase. *Endocrinology.* 132: 2709-2714.
- Hurwitz A, Finci-Yeheskel Z, Dushnik M, Milwidsky A, Shimonovitz S, Yagel S, Adashi EY, Mayer M. 1995a. Interleukin-1-mediated regulation of plasminogen activation in pregnant mare serum gonadotropin-primed rat granulosa cells is independent of prostaglandin production. *J Soc Gynecol Investig.* 2: 691-699.
- Hurwitz A, Finci-Yeheskel Z, Milwidsky A, Yagel S, Adashi EY, Laufer N, Mayer M. 1997. In-vitro modulation of plasminogen activator activity, prostaglandin E and nitric oxide production by interleukin-1 in pregnant mare serum gonadotrophin-primed theca-interstitial cells. *Hum Reprod* 12: 774-779.
- Hurwitz A, Lavy Y, Finci-Yeheskel Z, Milwidsky A, Shimonovitz S, Yagel S, Adashi EY, Laufer N, Mayer M. 1995b. Interleukin-1-mediated stimulation of prostaglandin E production is without effect on plasminogen activator activity in human granulosa lutein cell cultures. *J Clin Endocrinol Metab.* 80: 3018-3024.
- Hurwitz A, Loukides J, Rissiarelli E, Botero L, Katz E, McAllister JM, Garcia JE, Rohan R, Adashi EY, Hernandez ER. 1992. Human intraovarian interleukin-1 (IL-1) system: highly compartmentalized and hormonally dependent regulation of the genes encoding IL-1, its receptor, and its receptor antagonist. *J Clin Invest.* 89: 1746-1754.
- Hurwitz A, Ricciarelli E, Botero L, Rohan RM, Hernandez ER, Adashi EY. 1991. Endocrine- and autocrine- mediated regulation of rat ovarian (theca-interstitial) interleukin-1 beta gene expression: Gonadotropin-dependent preovulatory acquisition. *Endocrinology.* 129: 3427-3429.

- Hussein MR. 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update*. 11: 162-177.
- Hwang H, Choi SY, Kim TY. 2007. IL-4 suppresses UVB-induced apoptosis in skin. *J Biochem Mol Biol*. 40: 36-43.
- Imai F, Kishi H, Nakao K, Nishimura T, Minegishi T. 2014. IL-6 up-regulates the expression of rat LH receptors during granulosa cell differentiation. *Endocrinology*. 155: 1436-1444.
- Inza DR, Van Thillo G. 2011. Citoquinas y ovulación. *Rev SAEGRE*. 18: 44-59.
- Isobe N, Kitabayashi M, Yoshimura Y. 2005. Microvascular distribution and vascular endothelial growth factor expression in bovine cystic follicles. *Domest Anim Endocrinol*. 29: 634-645.
- Isobe N, Kitabayashi M, Yoshimura Y. 2008. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in bovine cystic follicles. *Reprod Domest Anim*. 43: 267-271.
- Isobe N, Yoshimura Y. 2000a. Immunocytochemical study of cell proliferation in the cystic ovarian follicles in cows. *Theriogenology*. 54: 1159-1169.
- Isobe N, Yoshimura Y. 2000b. Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: a DNA-end labeling histochemical study. *Theriogenology*. 53: 897-904.
- Isobe N, Yoshimura Y. 2007. Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle. *J Reprod Dev*. 53: 1119-1124.
- Jaaskelainen M, Kyronlahti A, Anttonen M, Nishi Y, Yanase T, Secchiero P, Zauli G, Tapanainen JS, Heikinheimo M, Vaskivuo TE. 2009. TRAIL pathway components and their putative role in granulosa cell apoptosis in the human ovary. *Differentiation*. 77: 369-376.
- Jiemtaweeboon S, Shirasuna K, Nitta A, Kobayashi A, Schuberth H. 2011. Evidence that polymorphonuclear neutrophils infiltrate into the developing corpus luteum and promote angiogenesis with interleukin-8 in the cow. *Reprod Biol Endocrinol*. 9: 79.
- Jöchle W. 1993. Forty years of control of the oestrous cycle in ruminants: progress made, unresolved problems and the potential impact of sperm encapsulation technology. *Reprod Fertil Dev*. 5: 587-594.

- Johnson ML, Murdoch J, Van Kirk EA, Kaltenbach JE, Murdoch WJ. 1999. Tumor necrosis factor alpha regulates collagenolytic activity in preovulatory ovine follicles: relationship to cytokine secretion by the oocyte-cumulus cell complex. *Biol Reprod.* 61: 1581-1585.
- Jolly PD, Tisdall, DJ, Heath DA, Lun S, McNatty KP. 1994. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'- monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biol Reprod.* 1: 934-944.
- Jones SA, Scheller J, Rose-John S. 2011. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest.* 121: 3375-3383.
- Jung YD, Liu W, Reinmuth N, Ahmad SA, Fan F, Gallick GE, Ellis LM. 2001. Vascular endothelial growth factor is upregulated by interleukin-1 beta in human vascular smooth muscle cells via the P38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Angiogenesis.* 4: 155-162.
- Kallis YN, Robson AJ, Fallowfield JA, Thomas HC, Alison MR, Wright NA, Goldin RD, Iredale JP, Forbes SJ. 2011. Remodelling of extracellular matrix is a requirement for the hepatic progenitor cell response. *Gut.* 60: 525-533.
- Karakji EG, Tsang BK. 1995. Regulation of rat granulosa cell plasminogen activator system: influence of interleukin-1 beta and ovarian follicular development. *Biol Reprod.* 53: 1302-1310.
- Kasson BG, Gorospe WC. 1989. Effects of interleukins 1, 2 and 3 on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 62: 103-111.
- Kawaguchi Y, Nishimagi E, Tochimoto A, Kawamoto M, Katsumata Y, Soejima M, Kanno T, Kamatani N, Hara M. 2006. Intracellular IL-1alpha-binding proteins contribute to biological functions of endogenous IL-1alpha in systemic sclerosis fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 14501-14506.
- Kawasaki F, Kawano Y, Kosay Hasan Z, Narahara H, Miyakawa I. 2003. The clinical role of interleukin-6 and interleukin-6 soluble receptor in human follicular fluids. *Clin Exper Med.* 3: 27-31.

- Kawate N, Inaba T, Mori J. 1996. Changes in plasma concentrations of gonadotropins and steroid hormones during the formation of bovine follicular cysts induced by the administration of ACTH. *J Vet Med Sci.* 58: 141-144.
- Kazer RR, Kessel B, Yen SS. 1987. Circulating luteinizing hormone pulse frequency in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 65: 233-236.
- Kesler DJ, Garverick H.A. 1982. Ovarian Cysts in Dairy Cattle : a Review. *J Anim Sci.* 55: 1147-1159.
- Kesler DJ, Garverick HA, Caudle AB, Elmore RG, Youngquist RS, Bierschwal CJ. 1980. Reproductive hormone and ovarian changes in cows with ovarian cysts. *J Dairy Sci.* 63: 166-170.
- Kitaya K, Yamada H. 2011. Pathophysiological Roles of Chemokines in Human Reproduction: An Overview. *Am J Reprod Immunol.* 65: 449-459.
- Klimpel GR. 1980. Soluble factors from LPS-activated macrophages induce cytotoxic T cell differentiation from alloantigen-primed spleen cells. *J Immunol.* 125: 1243-1249.
- Knight PG, Glister C. 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction.* 121: 503-512.
- Knight PG, Glister C. 2006. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 132: 191-206.
- Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Strieter RM. 1992. Interleukin 8 as a macrophage derived mediator of angiogenesis. *Science.* 258: 1798-1801.
- Kojima FN, Bergfeld EG, Wehrman ME, Cupp AS, Fike KE, Mariscal-Aguayo DV, Sanchez-Torres T, Garcia-Winder M, Clopton DT, Roberts AJ, Kinder JE. 2003. Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. *Anim Reprod Sci.* 77: 187-211.
- Kojima N, Stumpf TT, Cupp AS, Werth LA, Roberson MS, Wolfe MW, Kittok RJ, Kinder JE. 1992. Exogenous progesterone and progestins as used in estrous synchrony regimens do not mimic the corpus luteum in regulation of luteinizing hormone and 17 beta-estradiol in circulation of cows. *Biol Reprod.* 47: 1009-1017.

- Kokia E, Hurwitz A, Ben-Shlomo I, Adashi EY, Yanagishita M. 1993. Receptor-mediated stimulatory effect of IL-1 beta on hyaluronic acid and proteoglycan biosynthesis by cultured rat ovarian cells: Role for heterologous cell-cell interactions. *Endocrinology*. 133: 2391-2394.
- Kol S, Donesky BW, Ruutiainen-Altman K, Ben-Shlomo I, Irahara M, Ando M, Rohan RM, Adashi EY. 1999a. Ovarian interleukin-1 receptor antagonist in rats: gene expression, cellular localization, cyclic variation, and hormonal regulation of a potential determinant of interleukin-1 action. *Biol Reprod*. 61: 274-282.
- Kol S, Ruutiainen-Altman K, Scherzer WJ, Ben-Shlomo I, Ando M, Rohan RM, Adashi EY. 1999b. The rat intraovarian interleukin (IL)-1 system: Cellular localization, cyclic variation and hormonal regulation of IL-1beta and of the type I and type II IL-1 receptors. *Mol Cell Endocrinol*. 149: 115-128.
- Kolbus A, Walch K, Nagele F, Wenzl R, Unfried G, Huber JC. 2006. Interleukin-1 alpha but not interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with polycystic ovary syndrome. *J Reprod Immunol*. 73: 188-193.
- Kondo H, Maruo T, Mochizuki M. 1995. Immunohistochemical evidence for the presence of tumor necrosis factor-alpha in the infant and adult human ovary. *Endocr J*. 42: 771-780.
- König HE, Liebich HG. 2002. *Anatomía de los animales domésticos*. 2da Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ. 2010. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev Drug Discov*. 9: 703-718.
- Kraakman MJ, Kammoun HL, Allen TL, Deswaerte V, Henstridge DC, Estevez E, Matthews VB, Neill B, White DA, Murphy AJ, Peijs L, Yang C, Risis S, Bruce CR, Du XJ, Bobik A, Lee-Young RS, Kingwell BA, Vasanthakumar A, Shi W, Kallies A, Lancaster GI, Rose-John S, Febbraio MA. 2015. Blocking IL-6 trans-signaling prevents high-fat diet-induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance. *Cell Metab*. 21: 403-416.
- Kuhn PH, Marjaux E, Imhof A, De Strooper B, Haass C, Lichtenthaler SF. 2007. Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *J Biol Chem*. 282: 11982-11995.

- Kulick LJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*. 52: 913-921.
- Kuse M, Lee HY, Acosta TJ, Hojo T, Okuda K. 2013. Expression of glucocorticoid receptor α and its regulation in the bovine endometrium: possible role in cyclic prostaglandin F 2α production. *J Reprod Dev*. 59: 346-352.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lagaly DV, Aad PY, Grado-Ahuir JA, Hulsey LB, Spicer LJ. 2008. Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Mol Cell Endocrinol*. 284: 38-45.
- Laporte HM, Hogeveen H, Schukken YH, Noordhuizen JPTM. 1994. Cystic ovarian disease in Dutch dairy cattle I. Incidence, risk factors and consequences. *Livest Prod. Sci*. 38: 191-197.
- Laroux FS, Pavlick KP, Hines IN, Kawachi S, Harada H, Bharwani S, Hoffman JM, Grisham MB. 2001. Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiol Scand*. 173: 113-118.
- Lee MY, Kim SH, Ihm HJ, Chae HD, Kim CH, Kang BM. 2011. Up-regulation of p21-activated kinase 1 by in vitro treatment with interleukin 1-beta and its increased expression in ovarian endometriotic cysts. *Fertil Steril*. 96: 508-511.
- Leo CP, Pisarska MD, Hsueh AJW. 2001. DNA array analysis of changes in preovulatory gene expression in the rat ovary. *Biol Reprod*. 65: 269-276.
- Levitas E, Chamoun D, Udoff LC, Ando M, Resnick CE, Adashi EY. 2000. Periovulatory and interleukin-1 beta-dependent up-regulation of intraovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) in the rat: Potential role for VEGF in the promotion of periovulatory angiogenesis and vascular permeability. *J Soc Gynecol Investig*. 7: 51-60.
- Li A, Varney ML, Valasek J, Godfrey M, Dave BJ, Singh RK. 2005. Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis*. 8: 63-71.
- Li C, Jackson RM. 2002. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 282: C227-C241.

- Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. 2003. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol.* 73: 713-721.
- Liptrap RM, McNally PJ. 1976. Steroid concentrations in cows with corticotropin-induced cystic ovarian follicles and the effect of prostaglandin F₂alpha and indomethacin given by intrauterine injection. *Am J Vet Res.* 37: 369-375.
- Liu Z, de Matos DG, Fan HY, Shimada M, Palmer S, Richards JS. 2009. Interleukin-6: an autocrine regulator of the mouse cumulus cell-oocyte complex expansion process. *Endocrinology.* 150: 3360-3368.
- López-Díaz MC, Bosu WTK. 1992. A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. *Theriogenology.* 37: 1163-1183.
- López-gatius F, Santolaria P, Yániz J, Fenech M, López-Béjar M. 2002. Risk factors for postpartum ovarian cysts and their spontaneous recovery or persistence in lactating dairy cows. *Theriogenology.* 58: 1623-1632.
- Lorenzen I, Lokau J, Düsterhöft S, Trad A, Garbers C, Scheller J, Rose-John S, Grötzinger J. 2012. The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett.* 586: 1093-1100.
- Loret de Mola JR, Baumgardner GP, Goldfarb JM, Friedlander M.A. 1996. Ovarian hyperstimulation syndrome: Preovulatory serum concentrations of interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha cannot predict its occurrence. *Hum Reprod.* 11: 1377-1380.
- Lotz M, Terkeltaub R, Villiger PM. 1992. Cartilage and joint inflammation: regulation of IL-8 expression by human articular chondrocytes. *J Immunol.* 148: 466-473.
- Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil.* 81: 301-307.
- Machelon V, Emilie D, Lefevre A, Nome F, Durand-Gasselin, Testart J. 1994a. Interleukin-6 biosynthesis in human preovulatory follicles: some of its potential roles at ovulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 79: 633-642.
- Machelon V, Emilie D. 1997. Production of ovarian cytokines and their role in the mammalian ovary. *Eur Cyt Net.* 8: 137-143.

- Machelon V, Nome F, Salesse R. 1994b. Comparative IL-6 effects on FSH- and hCG-induced functions in porcine granulosa cell cultures. *Cell Mol Bio.* 40: 373-380.
- Macmillan KL, Taufa VK, Barnes DR, Day AM. 1991. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. *Anim Reprod Sci.* 26: 25-40.
- Maeda A, Goto Y, Matsuda-Minehata F, Cheng Y, Inoue N, Manabe N. 2007. Changes in expression of interleukin-6 receptors in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. *J Reprod Dev.* 53: 727-736.
- Majewska M, Lee HY, Tasaki Y, Acosta TJ, Szostek AZ, Siemieniuch M, Okuda K, Skarzynski DJ. 2012. Is cortisol a modulator of interferon tau action in the endometrium during early pregnancy in cattle? *J Reprod Immunol.* 93: 82-93.
- Majewska M, Woclawek-Potocka I, Bah MM, Hapunik J, Piotrowska KK, Tasaki Y, Acosta TJ, Okuda K, Skarzynski DJ. 2010. Is interleukin-1 alpha a luteotrophic or luteolytic agent in cattle? *Reproduction.* 139: 665-672.
- Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev.* 42: 601-611.
- Marcinkiewicz JL, Balchak SK, Morrison LJ. 2002. The involvement of tumor necrosis factor-alpha (TNF) as an intraovarian regulator of oocyte apoptosis in the neonatal rat. *Front Biosci.* 7: d1997-d2005.
- Marcinkiewicz JL, Krishna A, Cheung CM, Terranova PF. 1994. Oocytic tumor necrosis factor alpha: localization in the neonatal ovary and throughout follicular development in the adult rat. *Biol Reprod.* 50: 1251-1260.
- Marelli BE, Díaz PU, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. 2014. mRNA expression pattern of gonadotropin receptors in bovine follicular cysts. *Biol Reprod.* 4: 276-281.
- Martin P. 1997. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 276: 75-81.
- Martoriati A, Gérard N. 2003. Interleukin-1 (IL-1) system gene expression in granulosa cells: kinetics during terminal preovulatory follicle maturation in the mare. *Reprod Biol Endocrinol.* 1: 42.
- Martoriati A, Lalmanach AC, Goudet G, Gérard N. 2002. Expression of interleukin-1 (IL-1) system genes in equine cumulus-oocyte complexes and influence of IL-1b during in vitro maturation. *Biol Reprod.* 67: 630-636.

- Matiller V, Stangaferro ML, Díaz PU, Ortega HH, Rey F, Huber E, Salvetti NR. 2014. Altered expression of transforming growth factor-beta isoforms in bovine cystic ovarian disease. *Reprod Domest Anim.* 49: 813-823.
- Matsumi H, Yano T, Osuga Y, Kugu K, Tang X, Xu JP, Yano N, Kurashima Y, Ogura T, Tsutsumi O, Koji T, Esumi H, Taketani Y. 2000. Regulation of nitric oxide synthase to promote cytotaxis in ovarian follicular development. *Biol Reprod.* 63: 141-146.
- McCartney CR, Blank SK, Marshall JC. 2007. Progesterone acutely increases LH pulse amplitude but does not acutely influence nocturnal LH pulse frequency slowing during the late follicular phase in women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292: E900-E906.
- Mcgee E, Hsueh A. 2000. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocr Rev.* 21: 200-214.
- McInnes IB, Schett G. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 429-442.
- McLaughlin EA, McIver SC. 2009. Awakening the oocyte: Controlling primordial follicle development. *Reproduction* 137: 1-11.
- McNeilly AS, Crow W, Campbell BK. 1991. Effect of follicular fluid and inhibin immunoneutralization on FSH-induced preovulatory follicle growth in the ewe. *J Endocrinol.* 131: 401-409.
- Meisterling EM, Dailey RA. 1987. Use of concentrations of progesterone and estradiol-17 beta in milk in monitoring postpartum ovarian function in dairy cows. *J Dairy Sci.* 70: 2154-2161.
- Melov S. 2002. Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. *Int J Biochem Cell Biol.* 34: 1395-1400.
- Michael A, Thurston LM, Rae MT. 2003. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction.* 126: 425-441.
- Mihm M, Austin EJ. 2002. The final stages of dominant follicle selection in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 23: 155-166.
- Mihm M, Baguisi A, Boland MP, Roche JF. 1994. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J Reprod Fertil.* 102: 123-130.

- Mihm M, Baker PJ, Ireland JL, Smith GW, Coussens PM, Evans AC, Ireland JJ. 2006. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. *Biol Reprod.* 74: 1051-1059.
- Mills PC, Higgins AJ. 1997. Oxidant injury, nitric oxide, and pulmonary vascular function: Implications for the exercising horse. *Vet J.* 153: 125-148.
- Moberg GP. 1991. How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *J Dairy Sci.* 74: 304-311.
- Morrison LJ, Marcinkiewicz JL. 2002. Tumor necrosis factor alpha enhances oocyte/follicle apoptosis in the neonatal rat ovary. *Biol Reprod.* 66: 450-457.
- Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E. 1990. Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 3092-3096.
- Mozo L, Gayo a, Suárez a, Rivas D, Zamorano J, Gutiérrez C. 1998. Glucocorticoids inhibit IL-4 and mitogen-induced IL-4R alpha chain expression by different posttranscriptional mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 102: 968-976.
- Mu Y, Liu J, Wang B, Wen Q, Wang J, Yan J, Zhou S, Ma X, Cao Y. 2010. Interleukin 1 beta (IL-1 β) promoter C [-511] T polymorphism but not C [+3953] T polymorphism is associated with polycystic ovary syndrome. *Endocrine.* 37: 71-75.
- Mukaida N, Hishinuma A, Zachariae COC, Oppenheim JJ, Matsushima K. 1991. Regulation of human interleukin 8 gene expression and binding of several other members of the intercrine family to receptors for interleukin- 8. *Adv Exp Med Biol.* 305: 31-38.
- Murayama C, Kaji A, Miyauchi K, Matsui M, Miyamoto A, Shimizu T. 2010. Effect of VEGF (vascular endothelial growth factor) on expression of IL-8 (interleukin-8), IL-1beta and their receptors in bovine theca cells. *Cell Biol Int.* 34: 531-536.
- Murdoch WJ, Colgin DC, Ellis JA. 1997. Role of Tumor Necrosis Factor- α in the Ovulatory Mechanism of Ewes. *J Anim Sci.* 75: 1601-1605.
- Murdoch WJ, Van Kirk EA, Murdoch J. 1999. Plasmin cleaves tumor necrosis factor alpha exodomain from sheep follicular endothelium: Implication in the ovulatory process. *Biol Reprod.* 60: 1166-1171.

- Murphy BD. 2011. La reserva folicular. En: Libro de Resúmenes del IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC). 31-40.
- Myers M, Lamont MC, van den Driesche S, Mary N, Thong KJ, Hillier SG, Duncan WC. 2007. Role of luteal glucocorticoid metabolism during maternal recognition of pregnancy in women. *Endocrinology*. 148: 5769-5779.
- Nadaraja R, Hansel W. 1976. Hormonal changes associated with experimentally produced cystic ovaries in the cow. *J Reprod Fertil*. 47: 203-208.
- Nakamura Y, Kato H, Terranova PF. 1990. Interleukin-1 α increases thecal progesterone production of preovulatory follicles in cyclic hamsters. *Biol Reprod*. 43: 169-173.
- Nakao T, Grünert E. 1990. Effects of dystocia on postpartum adrenocortical function in dairy cows. *J Dairy Sci*. 73: 2801-2806.
- Nash MA, Ferrandina G, Gordinier M, Loercher A, Freedman RS. 1999. The role of cytokines in both the normal and malignant ovary. *Endocr Relat Cancer*. 6: 93-107.
- Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. 1999. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol*. 17: 701-738.
- Nelson ST, Martin AD, Osteras O. 2010. Risk factors associated with cystic ovarian disease in Norwegian dairy cattle. *Acta Vet Scand*. 52: 60.
- Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. 2001. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 33: 960-970.
- Nicol L, Faure MO, McNeilly JR, Fontaine J, Taragnat C, McNeilly AS. 2008. Bone morphogenetic protein-4 interacts with activin and GnRH to modulate gonadotrophin secretion in LbetaT2 gonadotrophs. *J Endocrinol*. 196: 497-507.
- Nilsson EE, Stanfield J, Skinner MK. 2006. Interactions between progesterone and tumor necrosis factor-alpha in the regulation of primordial follicle assembly. *Reproduction*. 132: 877-886.
- Nilsson MB, Langley RR, Fidler IJ. 2005. Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine. *Cancer Res*. 65: 10794-10800.
- Nishimura R, Bowolaksono A, Acosta TJ, Murakami S, Piotrowska K, Skarzynski DJ, Okuda K. 2004. Possible role of interleukin-1 in the regulation of bovine corpus luteum throughout the luteal phase. *Biol Reprod*. 71: 1688-1693.

- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, Mcintosh EW. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 80: 1-29.
- Niu Z, Ye Y, Xia L, Feng Y, Zhang A. 2017. Follicular fluid cytokine composition and oocyte quality of polycystic ovary syndrome patients with metabolic syndrome undergoing in vitro fertilization. *Cytokine.* 91: 180-186.
- Nothnick WB, Pate JL. 1990. Interleukin-1 β is a potent stimulator of prostaglandin synthesis in bovine luteal cells. *Biol Reprod.* 43: 898-903.
- Oakley OR, Kim H, El-Amouri I, Lin PC, Cho J, Bani-Ahmad M, Ko C. 2010. Periovarian leukocyte infiltration in the rat ovary. *Endocrinology.* 151: 4551-4559.
- Odore R, Re G, Badino P, Donn A, Vigo D, Biolatti B, Girardi C. 1999. Modifications of receptor concentrations for adrenaline, steroid hormones, prostaglandin F 2α and gonadotropins in hypophysis and ovary of dairy cows with ovarian cysts. *Pharmacol Res.* 39: 297-304.
- Oktay K, Briggs D, Gosden RG. 1997. Ontogeny of folliclestimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 82: 3748-3751.
- Oktay K, Karlikaya G, Akman O, Ojakian GK, Oktay M. 2000. Interaction of extracellular matrix and activin-A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. *Biol Reprod.* 63: 457-461.
- Oktem O, Urman B. 2010. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod.* 25: 2944-2954.
- Ono M, Nakamura Y, Tamura H, Takiguchi S, Sugino N, Kato H. 1997. Role of interleukin-1beta in superovulation in rats. *Endocr J.* 44: 797-804.
- Opsomer G, Mijten P, Coryn M, Dekruif A. 1996. Post-partum anoestrus in dairy cows. *Vet Quart.* 18: 68-75.
- Orsi NM, Tribe RM. 2008. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J Neuroendocrinol.* 20: 462-469.
- Orsi NM. 2008. Cytokine networks in the establishment and maintenance of pregnancy. *Hum Fertil.* 11: 222-230.

- Ortega HH, Diaz PU, Salvetti NR, Hein GJ, Marelli BE, Rodríguez FM, Stassi AF, Rey F. 2016. Follicular Cysts: A Single Sign and Different Diseases. A View from Comparative Medicine. *Curr Pharm Des.* 22: 5634-5645.
- Ortega HH, Marelli BE, Rey F, Amweg AN, Diaz PU, Stangaferro ML, Salvetti NR. 2015. Molecular aspects of bovine cystic ovarian disease pathogenesis. *Reproduction.* 149: 251-264.
- Ortega HH, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2008. Insulin-like growth factor I in ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous and induced cystic ovarian disease. *Res Vet Sci.* 84: 419-427.
- Ortega HH, Salvetti NR, Müller LA, Amable P, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ. 2007. Characterization of cytoskeletal proteins in follicular structures of cows with cystic ovarian disease. *J Comp Pathol.* 136: 222-230.
- Ortega HH, Salvetti NR, Padmanabhan V. 2009. Developmental programming: prenatal androgen excess disrupts ovarian steroid receptor balance. *Reproduction.* 137: 865-877.
- Ostanin AA, Aizikovitch BI, Aizikovitch IV, Kozhin AY, Chernykh ER. 2007. Role of cytokines in the regulation of reproductive function. *Bull Exp Biol Med.* 143: 75-79.
- Padhy N, Sathya ML, Varma TR. 2009. Antral follicle size in the down regulated cycle and its relation to in vitro fertilization outcome. *J Hum Reprod Sci.* 2: 68-71.
- Palma GA. 2008. *Biotechnología de la Reproducción.* 2ª Edición. *Repro Biotec.* Mar del Plata, Argentina.
- Pancarci ŞM, Ari UÇ, Atakisi O, Güngör Ö, Çiğremiş Y, Bollwein H. 2012. Nitric oxide concentrations, estradiol-17 β progesterone ratio in follicular fluid, and COC quality with respect to perifollicular blood flow in cows. *Anim Reprod Sci.* 130: 9-15.
- Pangas SA, Rajkovic A. 2006. Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Hum Reprod Upd.* 12: 65-76.
- Papacleovoulou G, Critchley HO, Hillier SG, Mason JI. 2011. IL1 β and IL4 signalling in human ovarian surface epithelial cells. *J Endocrinol.* 211: 273-283.
- Papacleovoulou G, Hogg K, Fegan KS, Critchley HOD, Hillier SG, Mason JI. 2009. Regulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 gene expression and

- function in the human ovarian surface epithelium by cytokines. *Mol Hum Reprod.* 5: 379-392.
- Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 4: 617-629.
- Parrott JA, Skinner MK. 1998. Developmental and Hormonal Regulation of Keratinocyte Growth Factor Expression and Action in the Ovarian Follicle. *Endocrinology.* 139: 228-235.
- Passos JRS, Costa JJN, da Cunha EV, Silva AWB, Ribeiro RP, de Souza GB, Barroso PA, Dau AM, Saraiva MV, Gonçalves PB, van den Hurk R, Silva JR. 2016. Protein and messenger RNA expression of interleukin 1 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin 1 β on primordial follicle activation and survival in vitro. *Domest Anim Endocrinol.* 54: 48-59.
- Pate JL, Landis Keyes P. 2001. Immune cells in the corpus luteum: Friends or foes? *Reproduction.* 122: 665-676.
- Peake JM, Della Gatta P, Suzuki K, Nieman DC. 2015. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev.* 21: 8-25.
- Penny LA. 2000. Monocyte chemoattractant protein 1 in luteolysis. *Rev Reprod.* 5: 63-66.
- Peralta MB, Baravalle ME, Belotti EM, Stassi AF, Salvetti NR, Ortega HH, Rey F, Velázquez MML. 2017. Involvement of Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Bovine Cystic Ovarian Disease. *J Comp Pathol.* 156: 191-201.
- Peter AT, Dhanasekaran N. 2003. Apoptosis of granulosa cells: a review on the role of MAPK- signaling modules. *Reprod Dom Anim.* 38: 209-213.
- Peter AT. 2004. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod Domest Anim.* 39: 1-7.
- Peterson CM, Hales HA, Hatasaka HH, Mitchell MD, Rittenhouse L, Jones KP. 1993. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) modulates prostaglandin production and the natural IL-1 receptor antagonist inhibits ovulation in the optimally stimulated rat ovarian perfusion model. *Endocrinology.* 133: 2301-2306.

- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30: 30-36.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 29-45.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. 1998: The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol.* 145: 27-37.
- Pierson RA, Ginther OJ. 1987. Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous cycle. *J Am Vet Med Assoc.* 190: 995-1001.
- Poleć A, Tanbo T, Fedorcsak P. 2009. Cellular interaction regulates interleukin-8 secretion by granulosa-lutein cells and monocytes/macrophages. *Am J Reprod Immunol.* 61:85-94.
- Pretheeban T, Balendran A, Gordon MB, Rajamahendran R. 2010. mRNA of luteal genes associated with progesterone synthesis, maintenance, and apoptosis in dairy heifers and lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 121: 218-224.
- Price JC, Sheldon IM. 2013. Granulosa cells from emerged antral follicles of the bovine ovary initiate inflammation in response to bacterial pathogen-associated molecular patterns via Toll-like receptor pathways. *Biol Reprod.* 89: 119.
- Probo M, Comin A, Mollo A, Cairoli F, Stradaioli G, Veronesi MC. 2011. Reproductive performance of dairy cows with luteal or follicular ovarian cysts after treatment with buserelin. *Anim Reprod Sci.* 127: 135-139.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂alpha and GnRH. *Theriogenology.* 44: 915-923.
- Qazi BS, Tang K, Qazi A. 2011. Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated inflammation and angiogenesis. *Int J Inflam.* 2011: 908468.
- Qiao J, Feng HL. 2001. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Reprod Update.* 7: 17-33.

- Quillard T, Croce K, Jaffer FA, Weissleder R, Libby P. 2011. Molecular imaging of macrophage protease activity in cardiovascular inflammation in vivo. *Thromb Haemost.* 105: 828-836.
- Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. 2004. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci.* 82: E40-E52.
- Rajala PJ, Gröhn YT. 1998. Disease occurrence and risk factor analysis in Finnish Ayrshire cows. *Acta Vet Scan.* 39: 1-13.
- Rashid N, Nigam A, Saxena P, Jain SK, Wajid S. 2017. Association of IL-1 β , IL-1Ra and FABP1 gene polymorphisms with the metabolic features of polycystic ovary syndrome. *Inflamm Res.* 66: 621-636.
- Re F, Sironi M, Muzio M, Matteucci C, Introna M, Orlando S, Penton-Rol G, Dower SK, Sims JE, Colotta F, Mantovani A. 1996. Inhibition of interleukin-1 responsiveness by type II receptor gene transfer: a surface “receptor” with anti-interleukin-1 function. *J Exp Med.* 183: 1841-1850.
- Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hamalainen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K. 2008. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science.* 319: 611-613.
- Refsal KR, Jarrin-Maldonado JH, Nachreiner RF. 1988. Basal and estradiol-induced release of gonadotrofins in dairy cows with naturally occurring ovarian cysts. *Theriogenology.* 30: 679-693.
- Refsal KR, Jarvin-Maldano JH, Nachreiner RF. 1987. Endocrine profiles in cows with ovarian cysts experimentally induced by treatment with exogenous estradiol or adrenocorticotrophic hormone. *Theriogenology.* 28: 871-889.
- Revah I, Butler WR. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil.* 106: 39-47.
- Rey F, Rodríguez FM, Salvetti NR, Palomar MM, Barbeito CG, Alfaro NS, Ortega HH. 2010. Insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor binding proteins in bovine cystic ovarian disease. *J Comp Pathol.* 142: 193-204.

- Ribadu AY, Nakada K, Moriyoshi M, Zhang WC, Tanaka Y, Nakao T. 2000. The role of LH pulse frequency in ACTH induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim Reprod Sci.* 64: 21-31.
- Richards JS, Hedin L. 1988. Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Annu Rev Physiol.* 50: 441-463.
- Richards JS, Liu Z, Shimada M. 2008. Immune-like mechanisms in ovulation. *Trends Endocrinol Metab.* 19: 191-196.
- Richards JS, Pangas SA. 2010. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest.* 120: 63-972.
- Richards JS. 2001. Perspective: the ovarian follicle - a perspective in 2001. *Endocrinology.* 142: 2184-2193.
- Rincon M. 2012. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol.* 33: 571-577.
- Riollet C, Rainard P, Poutrel B. 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milking. Response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J Dairy Sci.* 84: 1077-1084.
- Rippe CA. 2009. El ciclo estral. Dairy Cattle Reproduction Council. Dairy Cattle Reproduction Conference. Minneapolis, Minnesota y Boise, Idaho. 111-115
- Rizzo A, Campanile D, Mutinati M, Minoia G, Spedicato M, Sciorsi RL. 2011. Epidural vs intramuscular administration of leirelin, a GnRH analogue, for the resolution of follicular cysts in dairy cows. *Anim Reprod. Sci.* 126: 19-22.
- Roberson MS, Wolfe MW, Stumpf TT, Kittok RJ, Kinder JE. 1989. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol Reprod.* 41: 997-1003.
- Robert C, Gagne D, Lussier JG, Bousquet D, Barnes FL, Sirard MA. 2003. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterisation of the bovine splicing isoforms. *Reproduction.* 125: 437-446.
- Robinson T, Sutherland A, Sutherland J. 2007. Validation of candidate bovine reference genes for use with realtime PCR. *Vet Immunol Immunopathol.* 115: 160-165.

- Roby K, Terranova P. 1989. Localization of tumor necrosis factor in rat and bovine ovary using immunocytochemistry and cell blot: evidence for granulosa cell production. En: Growth Factors and Ovary, AN Hirshfield, Ed., Plenum Press, New York. 273-278.
- Roby KF, Lyles WR, Terranova PF. 1990. Immunological evidence for a human ovarian tumor necrosis factor- α . J Clin Endocrinol Metab. 71: 1096-1102.
- Roche JF. 1996. Control and regulation of folliculogenesis - a symposium in perspective. Rev Reprod. 1: 19-27.
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. 2010. Morphological classification of bovine ovarian follicles. Reproduction. 139: 309-318.
- Rodríguez FM, Colombero M, Amweg AN, Huber E, Gareis NC, Salvetti NR, Ortega HH, Rey F. 2015. Involvement of PAPP-A and IGFR1 in Cystic Ovarian Disease in Cattle. Reprod Domest Anim. 50: 659-668.
- Rodríguez FM, Salvetti NR, Colombero M, Stangaferro ML, Barbeito CG, Ortega HH, Rey F. 2013. Interaction between IGF1 and IGFBPs in bovine cystic ovarian disease. Anim Reprod Sci. 140: 14-25.
- Rodríguez FM, Salvetti NR, Panzani CG, Barbeito CG, Ortega HH, Rey F. 2011. Influence of insulin-like growth factor-binding proteins-2 and -3 in the pathogenesis of cystic ovarian disease in cattle. Anim Reprod Sci. 128: 1-10.
- Roelofs JB, Van Eerdenburg FJ, Soede NM, Kemp B. 2005. Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. Theriogenology. 63: 1366-1377.
- Rohleder N, Aringer M, Boentert M. 2012. Role of interleukin-6 in stress, sleep, and fatigue. Ann NY Acad Sci. 1261: 88-96.
- Romaniuk J. 1972. The incidence and treatment of ovarian cysts in cows. Bull Vet Inst Pulway. 16: 98-108.
- Ross M, Kaye GY, Pawlina W. 2004. Electronic Image Collection for Histology. A text and Atlas with cell and molecular biology. (Eds. Lippincot Williams and Wilkins) 4ta Edición.
- Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. Hum Reprod Update. 4: 3-24.

- Roth Z, Biran D, Lavon Y, Dafni I, Yakobi S, Braw-Tal R. 2012. Endocrine milieu and developmental dynamics of ovarian cysts and persistent follicles in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci.* 95: 1729-1737.
- Runesson E, Bostrom EK, Janson PO, Brannstrom M. 1996. The human preovulatory follicle is a source of the chemotactic cytokine interleukin-8. *Mol Hum Reprod.* 2: 245-250.
- Rüsse I. 1983. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat.* 24: 77-92.
- Sakumoto R, Komatsu T, Kasuya E, Saito T, Okuda K. 2006. Expression of mRNAs for interleukin-4, interleukin-6 and their receptors in porcine corpus luteum during the estrous cycle. *Domest Anim Endocrinol.* 31: 246-257.
- Sakumoto R, Okuda K. 2004. Possible Actions of Tumor Necrosis Factor- α in Ovarian Function. *J Reprod.* 50: 39-46.
- Salamonsen LA, Hannan NJ, Dimitriadis E. 2007. Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation. *Semin Reprod Med.* 25: 437-444.
- Salmassi A, Lü S, Hedderich J, Oettinghaus C, Jonat W, Mettler L. 2001. Interaction of interleukin-6 on human granulosa cell steroid secretion. *J Endocrinol.* 170: 471-478.
- Salvetti NR, Acosta JC, Gimeno EJ, Müller LA, Mazzini RA, Taboada AF, Ortega HH. 2007b. Estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptors in normal bovine ovarian follicles and cystic ovarian disease. *Vet Pathol.* 44: 373-378.
- Salvetti NR, Gimeno EJ, Lorente JA, Ortega HH. 2004. Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. *Cell Tissues Organs.* 178: 117-125.
- Salvetti NR, Panzani CG, Gimeno EJ, Neme LG, Alfaro NS, Ortega HH. 2009. An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats. *Reprod Biol Endocrinol.* 7: 68.
- Salvetti NR, Rey F, Ortega H H. 2007a. Enfermedad quística ovárica bovina. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias.* 6: 72-87.
- Salvetti NR, Stangaferro ML, Palomar MM, Alfaro NS, Rey F, Gimeno, EJ, Ortega HH. 2010. Cell proliferation and survival mechanisms underlying the abnormal persistence of follicular cysts in bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Anim Reprod Sci.* 122: 98-110.

- Salvetti NS, Alfaro NA, Velazquez MML, Amweg A, Matiller V, Díaz PU, Ortega HH. 2012. Alteration in localization of steroid hormone receptors and coregulatory proteins in follicles from cows with induced ovarian follicular cysts. *Reproduction*. 144: 723-735.
- Samir M, Glister C, Mattar D, Laird M, Knight PG. 2017. Follicular expression of pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor- α (TNF α), interleukin 6 (IL6) and their receptors in cattle: TNF α , IL6 and macrophages suppress thecal androgen production in vitro. *Reproduction*. 154: 35-49.
- Sancho-Tello M, Pérez-Roger I, Imakawa K, Tilzer L, Terranova PF. 1992. Expression of tumor necrosis factor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology*. 130: 1359-1364.
- Sartori R, Barros CM. 2011. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*. 124: 244-250.
- Savio JD, Boland MP, Hynes N, Roche JF. 1990. Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. *J Reprod Fertil*. 88: 569-579.
- Savio JD, Thatcher WW, Morris GR, Entwistle K, Drost M, Mattiacci MR. 1993. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing device on follicular turnover and fertility in cattle. *J Reprod Fertil*. 98: 77-84.
- Schadendorf D, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki B. 1993. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol*. 151: 2667-2675.
- Scheller JA Chalaris D, Schmidt-Arras, Rose-John S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 1813: 878-888.
- Scherzer WJ, Ruutiainen-Altman KS, Putowski LT, Kol S, Adashi EY, Rohan RM. 1996. Detection and in vivo hormonal regulation of rat ovarian type I and type II interleukin-I receptor mRNAs: Increased expression during the periovulatory period. *J Soc Gynecol Investig*. 3: 131-139.
- Schett G, Elewaut D, McInnes IB, Dayer JM, Neurath MF. 2013. How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. *Nat Med*. 19: 822-824.
- Schillo KK. 2008. *Reproductive Physiology of Mammals: From Farm to Field and Beyond*. Ed. Hardcover, Cengage Learning. 142-169.

- Schmidt J, Weijdegård B, Mikkelsen AL, Lindenberg S, Nilsson L, Brännström M. 2014. Differential expression of inflammation-related genes in the ovarian stroma and granulosa cells of PCOS women. *Mol Hum Reprod.* 20: 49-58.
- Schultz GS, Wysocki A. 2009. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair and Regen.* 17: 153-162.
- 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.
- Shaham-Albalancy A, Rosenberg M, Folman Y, Graber Y, Meidan R, Wolfenson D. 2000. Two methods of inducing low plasma progesterone concentrations have different effects on dominant follicles in cows. *J Dairy Sci.* 83: 2771-2778.
- Sheldon M, Cronin JG, Healey GD, Gabler C, Heuwieser W, Strey D, Bromfield JJ, Miyamoto A, Fergani C, Dobson H. 2014. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. *Reproduction.* 148: 41-51.
- Shemesh M, Gurevich M, Mizrahi D, Dombrowsky L, Stram Y, Field MJ, Shore LS. 1997. Expression of functional luteinizing hormone (LH) and its messenger ribonucleic acid in bovine uterine vein. *Endocrinology.* 138: 4844-4851.
- Shimizu T, Imamura E, Magata F, Murayama C, Miyamoto A. 2013. Interleukin-8 stimulates progesterone production via the MEK pathway in ovarian theca cells. *Mol Cell Biochem.* 374: 157-161.
- Shimizu T, Kaji A, Murayama C, Magata F, Shirasuna K, Wakamiya K, Okuda K, Miyamoto A. 2012. Effects of interleukin-8 on estradiol and progesterone production by bovine granulosa cells from large follicles and progesterone production by luteinizing granulosa cells in culture. *Cytokine.* 57: 175-181.
- Silva AWB, Ribeiro RP, Menezes VG, Barberino RS, Passos JRS, Dau AMP, Costa JJN, Melo LRF, Bezerra FTG, Donato MAM, Peixoto CA, Matos MHT, Gonçalves PBD, van den Hurk R, Silva JRV. 2017. Expression of TNF- α system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF- α or dexamethasone on preantral follicle survival, development and ultrastructure in vitro. *Anim Reprod Sci.* 182: 56-68.
- Silvia WJ, Alter TB, Nugent AM, Laranja da Fonseca LF. 2002. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest Anim Endocrinol.* 23: 167-177.

- Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH. 2005. Molecular Biology of the 3β -hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -Isomerase Gene Family. *Endocr Rev.* 26: 525-582.
- Simón C, Frances A, Piquette G, Polan ML. 1994. Immunohistochemical localization of the interleukin-1 system in the mouse ovary during follicular growth, ovulation, and luteinization. *Biol Reprod.* 50: 449-457.
- Sirois J, Fortune JE. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod.* 39: 308-317.
- Sirois J, Fortune JE. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology.* 127: 916-925.
- Sirotkin A. 2011. Cytokines: signalling molecules controlling ovarian functions. *Int J Biochem Cell Biol.* 43: 857-861.
- Sisson S, Grossman JD. 1982. Anatomía de los animales domésticos. 5ta Edición. Salvat Editores S.A. Barcelona, España.
- Sizemore N, Leung S, Stark GR. 1999. Activation of phosphatidylinositol 3- kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol.* 19: 4798-4805.
- Sjogren A, Holmes PV, Hillensjo T. 1991. Interleukin-1 α modulates luteinizing hormone stimulated cyclic AMP and progesterone release from human granulosa cells in vitro. *Hum Reprod.* 6: 910-913.
- Skinner MK. 2005. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update.* 11: 461-471.
- Smith DE, Hanna, R, Della Friend, Moore H, Chen H, Farese AM, MacVittie TJ, Virca GD, Sims JE. 2003. The soluble form of IL-1 receptor accessory protein enhances the ability of soluble type II IL-1 receptor to inhibit IL-1 action. *Immunity.* 18: 87-96.
- Smith MF, McIntush EW, Smith GW. 1994. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci.* 72: 1857-1872.
- Smitz JE, Cortvrindt RG. 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction.* 123: 185-202.

- Smolikova K, Mlynarcikova A, Scsukova S. 2012. Role of interleukins in the regulation of ovarian functions. *Endocr Regul.* 46: 237-253.
- Song J, Wessel GM. 2005. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. *Differentiation.* 73: 1-17.
- Spicer LJ, Alpizar E. 1994. Effects of cytokines on FSH-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: dependence on size of follicle. *Domest Anim Endocrinol.* 11: 25-34.
- Spriggs MK, Nevens PJ, Grabstein K, Dower SK, Cosman D, Armitage RJ, McMahan CJ, Sims JE. 1992. Molecular characterization of the interleukin-1 receptor (IL-1R) on monocytes and polymorphonuclear cells. *Cytokine.* 4: 90-95.
- Stangaferro ML, Matiller V, Díaz PU, Ortega HH, Rey F, Rodríguez FM, Silva MA, Salvetti NR. 2014. Role of activin, inhibin, and follistatin in the pathogenesis of bovine cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci.* 148: 97-108.
- Stock AE, Fortune JE. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology.* 132: 1108-1114.
- Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ. 2008. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development.* 135: 111-121.
- Svensson E. 2000. Regulation of Apoptosis and Steroidogenesis in Ovarian Preovulatory Granulosa Cells. PhD Thesis, Göteborg University, Göteborg, Sweden.
- Symons JA, Young PR, Duff GW. 1995. Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 β precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 1714-1718.
- Taft R, Ahmad N, Inskeep EK. 1996. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *J Anim Sci.* 74: 2985-2991.
- Tanaka N, Espey LL, Stacy S, Okamura H. 1992. Epostane and indomethacin, actions on ovarian kallikrein and plasminogen activator activities during ovulation in the gonadotropin-primed immature rat. *Biol Reprod.* 46: 665-670.

- Tanikawa M, Acosta TJ, Fukui T, Murakami S, Korzekwa A, Skarzynski DJ, Piotrowska KK, Park C, Okuda KK. 2005. Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin-1a in bovine endometrium during the estrous cycle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 78: 279-290.
- Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA Jr, Goeddel DV. 1991. The two different receptors for tumor necrosis factor mediated distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 9292-9296.
- Taylor CC, Terranova PF. 1995. Lipopolysaccharide inhibits rat ovarian thecal-interstitial cell steroid secretion in vitro. *Endocrinology.* 136: 5527-5532.
- Telleria CM, Ou J, Sugino N, Ferguson S, Gibori G. 1998. The expression of interleukin-6 in the pregnant rat corpus luteum and its regulation by progesterone and glucocorticoid. *Endocrinology.* 139: 3597-3605.
- Terranova PF, Rice VM. 1997. Review: Cytokine involvement in ovarian processes. *Am J Reprod Immunol.* 37: 50-63.
- Tetsuka M, Nishimoto H, Miyamoto A, Okuda K, Hamano S. 2010. Gene expression of 11 β -HSD and glucocorticoid receptor in the bovine (*Bos taurus*) follicle during follicular maturation and atresia: the role of follicular stimulating hormone. *J Reprod Dev.* 56: 616-622.
- Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. 1994. Interleukin-6 (IL-6) as an Anti-inflammatory Cytokine: Induction of Circulating IL-1 Receptor Antagonist and Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor p55. *Blood.* 83: 113-118.
- Tobai H, Nishiya I. 2001. Nitric oxide mediates inhibitory effect of interleukin-1 beta on estrogen production in human granulosa-luteal cells. *J Obstet Gynaecol Res.* 27: 53-59.
- Trimberger GW, Hansel W. 1955. Conception rate and ovarian functions following estrus control by progesterone injections in dairy cattle. *J Anim Sci.* 14: 224-232.
- Trundley A, Moffett A. 2004. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens.* 63: 1-12.
- Turner EC, Hughes J, Wilson H, Clay M, Mylonas KJ, Kipari T, Duncan WC, Fraser HM. 2011. Conditional ablation of macrophages disrupts ovarian vasculature. *Reproduction.* 141: 821-831.

- Twomey C, Qian S, McCarthy V. 2009. TRAF6 promotes ubiquitination and regulated intramembrane proteolysis of Il-1R1. *Biochem Biophys Res Commun.* 381: 418-423.
- Ujioka T, Matsukawa A, Tanaka N, Matsuura K, Yoshinaga M, Okamura H. 1998. Interleukin-8 as an essential factor in the human chorionic gonadotropin-induced rabbit ovulatory process: interleukin-8 induces neutrophil accumulation and activation in ovulation. *Biol Reprod.* 58: 526-530.
- Ungerfeld R. 2002. Reproducción en los animales domésticos. Ed. Melibea. Toulouse, Francia.
- Van Den Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology.* 63: 1717-1751.
- Van Snick J. 1990. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol.* 8: 253-278.
- Vanholder T, Opsomer G, De Kruif A. 2006. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nutr Dev.* 46: 105-119.
- Velázquez MM, Salvetti NR, Amweg AN, Díaz PU, Matiller V, Ortega HH. 2013. Changes in the expression of Heat Shock Proteins in ovaries from bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Res Vet Sci.* 95: 1059-1067.
- Velázquez MML, Alfaro NS, Dupuy C, Salvetti NR, Rey F, OrtegaHH. 2010. Heat shock protein patterns in the bovine ovary and their relation with cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci.* 118: 201-209.
- Vgontzas AN, Trakada G, Bixler EO, Lin HM, Pejovic S, Zoumakis E, Chrousos GP, Legro RS. 2006. Plasma interleukin 6 levels are elevated in polycystic ovary syndrome independently of obesity or sleep apnea. *Metabolism.* 55: 1076-1082.
- Volpert OV, Fong T, Koch AE, Peterson JD, Waltenbaugh C, Tepper RI, Bouck NP. 1998. Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *J Exp Med.* 188: 1039-1046.
- Walusimbi SS, Pate JL. 2013. Physiology and Endocrinology Symposium: role of immune cells in the corpus luteum. *J Anim Sci.* 91: 1650-1659.
- Wang LJ, Brannström M, Cui KH, Simula AP, Hart RP, Maddocks S, Norman RJ. 1997. Localisation of mRNA for interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist in the rat ovary. *J Endocrinol.* 152: 11-17.

- Wang LJ, Brannstrom M, Robertson SA, Norman RJ. 1992. Tumor necrosis factor alpha in the human ovary: presence in follicular fluid and effects on cell proliferation and prostaglandin production. *Fertil Steril.* 58: 934-940.
- Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG. 1999. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J Reprod Fertil.* 54: 33-48.
- Webb R, Campbell BK. 2007. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Soc Reprod Fertil.* 64: 141-163.
- Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction.* 61: 71-90.
- Wehrman ME, Roberson MS, Cupp AS, Kojima FN, Stumpf TT, Werth LA, Wolfe MW, Kittok RJ, Kinder JE. 1993. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 β -estradiol and increases conception in cows. *Biol Reprod.* 49: 214-220.
- Wigglesworth K, Lee KB, O'Brien MJ, Peng J, Matzuk MM, Eppig JJ. 2013. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110: E3723-3729.
- Wildt L, Hausler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE, Knobil E. 1981. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology.* 109: 376-385.
- Wiltbank JN. 1966. Modification of ovarian activity in the bovine following injection of oestrogen and gonadotrophin. *Reprod Fert.* 1: 1-10.
- Wiltbank M, Gümen A, Sartori R. 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology.* 57: 21-52.
- Winters TA, Cook DL, Callahan CJ, Allrich RD. 1986. Induction of ovarian cysts in cattle by injection of progesterone and oestradiol-17b. *J Anim Sci (abstr.).* 63:361.
- Wishart DF. 1977. Synchronization of oestrous in heifers using steroid (SC 5914, SC 9880, and SC 21009) treatment for 21 days: 2. The effect of treatment on the ovum collection and fertilisation rate and the development of the early embryo. *Theriogenology.* 8: 249-269.

- Witkin SS, Linhares IM, Bongiovanni AM, Herway C, Skupski D. 2011. Unique alterations in infection-induced immune activation during pregnancy. *BJOG*. 118: 145-153.
- Woloski BM, Fuller GM. 1985. Identification and partial characterization of hepatocyte-stimulating factor from leukemia cell lines: comparison with interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82: 1443-1447.
- Wong KHH, Negishi H, Adashi EY. 2002. Expression, hormonal regulation, and cyclic variation of chemokines in the rat ovary: Key determinants of the intraovarian residence of representatives of the white blood cell series. *Endocrinology*. 143: 784-791.
- Woods AM, Judd AM. 2008. Interleukin-4 increases cortisol release and decreases adrenal androgen release from bovine adrenal cells. *Domest Anim Endocrinol*. 34: 372-382.
- Woolery KT, Kruk PA. 2011. Ovarian epithelial-stromal interactions: role of interleukins 1 and 6. *Obstet Gynecol Int*. 2011: 1-9.
- Wu R, Fujii S, Ryan NK, Van Der Hoek KH, Jasper MJ, Sini I, Robertson SA, Robker RL, Norman RJ. 2007. Ovarian leukocyte distribution and cytokine/chemokine mRNA expression in follicular fluid cells in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 22: 527-535.
- Wu R, Van der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL. 2004. Macrophage contributions to ovarian function. *Hum Reprod Update*. 10: 119-133.
- Xia YH, Yao L, Zhang ZX. 2013. Correlation between IL-1 β , IL-1Ra gene polymorphism and occurrence of polycystic ovary syndrome infertility. *Asian Pac J Trop Med*. 6: 232-236.
- Yang M, Wang X, Wang L, Wang X, Yang Z, Li J. 2017. IL-1 α Up-Regulates IL-6 Expression in Bovine Granulosa Cells via MAPKs and NF- κ B Signaling Pathways. *Cell Physiol Biochem*. 41: 265-273.
- 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 WL, Godwin AK, Xu XX. 2004. Tumor necrosis factor-alpha- induced matrix proteolytic enzyme production and basement membrane remodeling by human ovarian surface epithelial cells: Molecular basis linking ovulation and cancer risk. *Cancer Res*. 64: 1534-1540.

- Yasuda K, Fukuoka M, Taii S, Takakura K, Mori T. 1990. Inhibitory effects of interleukin-1 on follicle-stimulating hormone induction of aromatase activity, progesterone secretion, and functional luteinizing hormone receptors in cultures of porcine granulosa cells. *Biol Reprod.* 43: 905-912.
- Yasukawa K, Hirano T, Watanabe Y, Muratani K, Matsuda T, Nakai S, Kishimoto T. 1987. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J.* 6: 2939-2945.
- Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Yano T, Tsutsumi O, Fujimoto A, Kugu K, Momoeda M, Fujiwara T, Taketani Y. 2003. Upregulation of interleukin-8 by hypoxia in human ovaries. *Am J Reprod Immunol.* 50: 286-290.
- Yoshioka K, Iwamura S, Kamomae H. 1996. Ultrasonic observations on the turnover of ovarian follicular cysts and associated changes of plasma LH, FSH, progesterone and oestradiol-17 β in cows. *Res Vet Sci.* 61: 240-244.
- Yoshizaki K, Nakagawa T, Fukunaga K, Tseng LT, Yamamura Y, Kishimoto T. 1984. Isolation and characterization of B cell differentiation factor (BCDF) secreted from a human B lymphoblastoid cell line. *J Immunol.* 132: 2948-2954.
- Youngquist RS. 1986. Cystic follicular degeneration in the cow. In: Morrow D (Ed), *Current therapy in Theriogenology*, 2nd ed, WB Saunders Co, Philadelphia. 243-246.
- Zackrisson U, Löfman CO, Janson PO, Wallin A, Mikuni M, Brännström M. 2011. Alterations of follicular microcirculation and apex structure during ovulation in the rat. *Eur J of Obstet Gynecol Reprod Biol.* 157: 169-174.
- Zaied AA, Garverick HA, Kesler DJ, Bierschwal CJ, Elmore RJ, Youngquist RS. 1981. Luteinizing hormone response to estradiol benzoate in cows with ovarian cyst. *Theriogenology.* 16: 349-358.
- Zhang T, Tian F, Huo R, Tang A, Zeng Y, Duan Y-G. 2017. Detection of dendritic cells and related cytokines in follicular fluid of patients with polycystic ovary syndrome. *Am J Reprod Immunol.* 78: e12717.
- Zheng Y, Humphry M, Maguire JJ, Bennett MR, Clarke MC. 2013. Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1 α , controlling necrosis-induced sterile inflammation. *Immunity.* 38: 285-295.

- Zhou MH, Galway AB. 1991. Inhibitory effect of interleukin-1 beta on follicle stimulating hormone (FSH) induced estrogen production by cultured rat granulosa cells. *Sheng Li Xue Bao.* 43: 67-72.
- Zolti M, Ben-Rafael Z, Meirom R, Shemesh M, Bider D, Mashiach S, Apte RN. 1991. Cytokine involvement in oocytes and early embryos. *Fertil Steril.* 56: 265-272.
- Zolti M, Meirom R, Shemesh M, Wollach D, Mashiach S, Shore L, Rafael ZB. 1990. Granulosa cells as a source and target organ for tumor necrosis factor-alpha. *FEBS Lett.* 261: 253-255.
- Zulu VC, Penny C. 1998. Risk factors of cystic ovarian disease in dairy cattle. *J Reprod Physiol.* 44: 191-195.
- Zurvarra FM, Salvetti NR, Ian Mason J, Velazquez MML, Alfaro NS, Ortega HH. 2009. Disruption in the expression and immunolocalisation of steroid receptors and steroidogenic enzymes in letrozole-induced polycystic ovaries in rat. *Reprod Fertil Dev.* 21: 827-839.